Multirezidualna analiza i biogeokemijsko ponašanje opioidnih analgetika u vodenom okolišu

Kostanjevečki, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:094445

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Petra Kostanjevečki

MULTIREZIDUALNA ANALIZA I BIOGEOKEMIJSKO PONAŠANJE OPIOIDNIH ANALGETIKA U VODENOM OKOLIŠU

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Senka Terzić

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Petra Kostanjevečki

MULTIRESIDUE ANALYSIS AND BIOGEOCHEMICAL BEHAVIOUR OF OPIOID ANALGESICS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Senka Terzić

Zagreb, 2021

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Senke Terzić, u okviru realizacije projekata COMPASS (IP-2014-09-7031) i PHARMA-RISK (IP-2019-04-9519) financiranih putem Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Senki Terzić na predloženoj temi, stručnom vodstvu i pomoći pri planiranju i realizaciji istraživanja, interpretaciji rezultata, identifikaciji transformacijskih proizvoda te sugestijama i pomoći prilikom pisanja ovoga doktorskog rada. Posebice zahvaljujem na uloženom strpljenju, trudu i podršci.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Marijanu Ahelu, zaslužnom znanstveniku Instituta Ruđer Bošković, na brojnim savjetima pri planiranju i realizaciji istraživanja, interpretaciji rezultata i pisanju ovoga rada.

Zahvaljujem djelatnicima Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu, a posebno glavnom tehnologu dr. sc. Marinu Ganjti na kontinuiranoj višegodišnjoj suradnji prilikom prikupljanja uzoraka.

Hvala prof. dr. sc. Marinu Matošiću i doc. dr. sc. Josipu Ćurku te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju vode Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na pomoći u izvođenju laboratorijskih pokusa ozoniranja, kao i na susretljivosti te ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Ines Sviličić Petrić na suradnji pri provedbi eksperimenata biološke razgradnje te neiscrpnom trudu i pomoći pri tumačenju dobivenih rezultata. Hvala dr. sc. Tvrtku Smitalu i dr. sc. Jovici Lončaru na provedbi ekotoksikoloških analiza u pokusima biološke razgradnje.

Hvala dr. sc. Mavri Lučiću na pripremi i karakterizaciji uzoraka sedimenta rijeke Save.

Neizmjerno hvala dr. sc. Ivoni Krizman-Matasić te dr. sc. Ivanu Senti na nesebičnoj pomoći i strpljenju pri upoznavanju s tehnikama LC-MS/MS, na trudu i brojnim savjetima vezanim uz provođenje pokusa, kao i prilikom pisanja ovoga rada.

Hvala Nenadu Muhinu na prikupljanju uzoraka i pomoći u njihovoj obradi.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva, a posebno Petru Ujčiću, dr. sc. Ivi Mikac i Klaudiji Ivanković na poticajnoj atmosferi te spremnosti na pomoć, bilo da se radi o stručnim savjetima ili podršci.

Na kraju zahvaljujem svojim roditeljima te bratu na razumijevanju i velikoj podršci koju su mi pružali tijekom izrade doktorskog rada. Hvala svim prijateljima i onima koji su na bilo koji način pridonijeli nastanku ovoga rada.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **II**

ABSTRACT ..... **III**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1. Vrste, podjela, upotreba i metabolizam opioidnih analgetika **4**

2.2. Opioidni analgetici kao zagađivala vodenog okoliša **12**

2.2.1. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim vodama *12*

2.2.2. Ponašanje opioidnih analgetika u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda *17*

2.2.3. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u prirodnim vodama *17*

2.2.4. Abiotičke i biotičke transformacije opioidnih analgetika *21*

2.3. Analitičke metode za određivanje opioidnih analgetika u vodenom okolišu **24**

2.3.1. Prikupljanje i priprava uzoraka *24*

2.3.2. Instrumentna analiza *27*

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **35**

3.1. Materijali **35**

3.1.1. Kemikalije *35*

3.1.2. Otopine *37*

3.1.3. Pribor *38*

3.1.4. Uređaji i instrumentacija *40*

3.2. Uzorkovanje otpadnih i prirodnih voda **42**

3.2.1. Prikupljanje uzoraka otpadne vode u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba *42*

3.2.2. Prikupljanje uzoraka rijeke Save i njenih pritoka *43*

3.3. Metode **45**

3.3.1. Određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih proizvoda u okolišnim uzorcima *45*

3.3.1.1. Ekstrakcija tekućih uzoraka i obrada ekstrakata *47*

3.3.1.2. Ekstrakcija čvrstih uzoraka i obrada ekstrakata *48*

3.3.1.3. Analiza opioidnih analgetika i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS) *49*

3.3.2. Analiza opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih proizvoda u modelnim pokusima razgradnje *50*

3.4. Validacija analitičkih metoda **51**

3.5. Određivanje stabilnosti opioidnih analgetika u uzorcima i ekstraktima 54
3.6. Modelni pokusi razgradnje odabranih opioidnih analgetika 55
3.6.1. Adaptacija kultura za pokuse biološke razgradnje tramadola i metadona 55
3.6.2. Modelni pokusi biološke razgradnje tramadola i metadona 56
3.6.3. Modelni pokusi ozoniranja tramadola i metadona 57
3.6.4. Određivanje toksičnosti za alge 58
3.7. Određivanje raspodjelnih koeficijenata 59
3.8. Obrada podataka 60
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 61
4.1. Razvoj analitičkih metoda za određivanje opioidnih analgetika u vodenom okolišu 61
4.1.1. Optimizacija kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta 61
4.1.2. Optimizacija uvjeta ekstrakcije tekućih uzoraka 69
4.1.3. Optimizacija uvjeta ekstrakcije čvrstih uzoraka 75
4.1.4. Stabilnost opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u uzorcima otpadnih voda i njihovim ekstraktima 86
4.1.5. Validacija analitičkih metoda za određivanje opioidnih analgetika u otopljenoj i čvrstoj frakciji otpadnih i površinskih voda 91
4.2. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim i površinskim vodama 97
4.2.1. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim vodama Grada Zagreba 97
4.2.2. Učinkovitost uklanjanja opioidnih analgetika i njihovih metabolita u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem 105
4.2.3. Obrasci i trendovi potrošnje odabranih opioida u Gradu Zagrebu 110
4.2.4. Rasprostranjenost i prostorna raspodjela opioidnih analgetika i njihovih metabolita u površinskim vodama 115
4.2.5. Masena bilanca odabranih opioida u rijeci Savi 120
4.3. Biološka razgradnja tramadola i metadona 126
4.3.1. Učinkovitost i kinetika uklanjanja tramadola i metadona u pokusima biološke razgradnje 126
4.3.2. Identifikacija biotransformacijskih proizvoda tramadola i metadona 130
4.3.3. Ekotoksikološka evaluacija biološke transformacije tramadola i metadona 139
4.4. Uklanjanje tramadola i metadona ozoniranjem 141
4.4.1. Učinkovitost i kinetika uklanjanja tramadola i metadona ozoniranjem 142
4.4.2. Identifikacija transformacijskih proizvoda tramadola i metadona nastalih ozoniranjem 146
§ 5. ZAKLJUČAK 150
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 154
§ 7. LITERATURNI IZVORI 157

§ 8. DODATAK IV
§ 9. ŽIVOTOPIS XXXII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MULTIREZIDUALNA ANALIZA I BIOGEOKEMIJSKO PONAŠANJE OPIOIDNIH ANALGETIKA U VODENOM OKOLIŠU

Petra Kostanjevečki
Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Opioidni analgetici su psihoaktivne tvari koje nakon primjene dospijevaju u otpadne vode putem ljudskih izlučevina. U okviru ove disertacije razvijene su analitičke metode za multirezidualno određivanje tragova 27 terapijskih opioida i njihovih metabolita u otpadnim i površinskim vodama upotrebom vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Razvijene metode primijenjene su za istraživanje njihove rasprostranjenosti i biogeokemijskog ponašanja u vodenom okolišu. Ukupna koncentracija opioida u otpadnim vodama Grada Zagreba premašivala je 1 000 ng L^{-1}. Najzastupljeniji predstavnici bili su tramadol i metadon. Budući da se njihovo uklanjanje u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda pokazalo neučinkovitim, istraženi su alternativni postupci, uključujući biološku razgradnju adaptiranim mješovitim mikrobnim kulturama i abiotičku razgradnju ozoniranjem. Ozoniranjem je uklonjeno do 90 % roditeljskih spojeva, a biološkom razgradnjom do 82 % uz proporcionalno smanjenje toksičnosti za alge. Međutim, i biotičkom i abiotičkom razgradnjom istraženih spojeva nastala je znatna količina stabilnih transformacijskih produkata što treba uzeti u obzir kod sveoubuhvatne procjene njihova utjecaja na okoliš.

(162 stranice, 44 slike, 31 tablica, 111 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biološka razgradnja/ opioidni analgetici/ otpadne vode/ ozoniranje/ površinske vode/ tekućinska kromatografija-spektrometrija masa/ transformacijski produkti/

Mentor: dr. sc. Senka Terzić, znan. savj. u tr. zv.

Rad prihvaćen: 03. rujna 2021.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
2. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, v. zn. sur. i nasl. doc.
3. dr. sc. Vlasta Drevenkar, zn. savj. u mir. i nasl. red. prof.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MULTIRESIDUE ANALYSIS AND BIOGEOCHEMICAL BEHAVIOUR OF OPIOID ANALGESICS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

Petra Kostanjevečki
Ruđer Bošković Institute, Division of Marine and Environmental Research, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Opioid analgesics are a group of psychoactive substances which enter the aquatic environment primarily via human excretion. In this thesis, multiresidue analytical methods for the determination of trace levels of 27 therapeutic opioids in wastewater and surface water matrices were developed, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. These methods were applied to study the occurrence and biogeochemical behaviour of the selected opioids in the aquatic environment. The total concentration of investigated opioids in wastewater of the city of Zagreb exceeded 1 000 ng L^{-1}, with tramadol and methadone being the most prominent ones. Due to their rather inefficient elimination in wastewater treatment plants, two alternative procedures, including biological degradation with enriched mixed microbal cultures and ozonation were investigated. An improved removal of up to 90% and 82% was achieved in the ozonation and biodegradation experiments, respectively, with a proportional decrease of toxicity to algae. However, degradation of parent compounds was associated with the formation of stabile transformation products, which should be taken into account when assessing the overall impact on the environment.

(162 pages, 44 figures, 31 tables, 111 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: biodegradation/ liquid chromatography-mass spectrometry/ opioid analgesics/ ozonation/ surface water/ transformation products/ wastewater/

Supervisor: Dr. Senka Terzić, Senior Scientist

Thesis accepted: 03th September 2021

Reviewers: Dr. Nives Galić, Professor
Dr. Irena Brčić Karačonji, Senior Research Associate, Assistant Professor
Dr. Vlasta Drevenkar, Retired Senior Scientist, Professor

§ 1. UVOD

Opioidni analgetici predstavljaju skupinu psihoaktivnih farmaceutskih lijekova koji se primjenjuju za ublažavanje umjerene do jake boli te u supstitucijskoj terapiji ovisnosti o drogama. Način djelovanja terapijskih opioida temelji se na vezanju na opioidne receptore, koji se prvenstveno nalaze u središnjem i perifernom živčanom sustavu te gastrointestinalnom traktu. Nažalost, uz poželjne analgetičke učinke, terapijska uporaba opioida može dovesti do ovisnosti, zbog čega opioidi pripadaju lijekovima koji se potencijalno mogu zloupotrebljavati. To potvrđuje i podatak da je 2014. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) 10,3 milijuna stanovnika koristilo terapijske opioide u nemedicinske svrhe[1]. Sukladno tome, glavni predstavnici opioida često su uključeni u istraživanja čiji je cilj praćenje potrošnje ilegalnih droga na temelju analize njihovih urinarnih biomarkera u komunalnim otpadnim vodama[2,3,4].

Kao i za druge farmaceutske spojeve, glavni izvori opioidnih analgetika u vodenom okolišu su izlučivanje iz ljudskog organizma i odlaganje neupotrijebljenih lijekova u kanalizacijski sustav. Prema dostupnim farmakokinetičkim podatcima, većina terapijskih opioida se u ljudskom organizmu intenzivno metabolizira, a samo se dijelom izlučuju u nepromijenjenom obliku[5,6,7,8]. Podatci o metabolizmu opioida jasno ukazuju da za sveobuhvatnu procjenu njihova utjecaja na okoliš treba u obzir uzeti i njihove metabolite[9].

Analitika terapijskih opioida i njihovih transformacijskih produkata u vodenom okolišu predstavlja značajan izazov jer zahtijeva pouzdano određivanje vrlo niskih koncentracija u složenim matricama otpadnih i površinskih voda. Stoga se za određivanje opioida u okolišu gotovo isključivo upotrebljavaju metode utemeljene na vezi kromatografskih tehnika i spektrometrije masa. U analitici polarnih spojeva, kao što su opioidi, tekućinskokromatografske metode su često prikladnije od plinskokromatografskih[10], ponajprije zbog činjenice da ne zahtijevaju prethodno derivatiziranje analita. Kada se radi o određivanju opioida u otpadnim i površinskim vodama te u vodi za piće, u literaturi izrazito prevladava upotreba vezanih sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), dok su plinskokromatografske tehnike vrlo rijetko zastupljene[11,12]. Za kvantitativno određivanje opioida i njihovih transformacijskih produkata najčešće se kao analizator masa upotrebljava trostruki kvadrupol (QqQ)[4,13,14] uz primjenu praćenja višestrukih tranzicijskih reakcija (engl.

Multiple Reaction Monitoring, MRM), što omogućuje vrlo osjetljivu detekciju te selektivnu i pouzdanu identifikaciju ciljanih spojeva u složenim okolišnim uzorcima.

Budući da se opioidni analgetici i njihovi metaboliti u okolišnim uzorcima većinom nalaze u vrlo niskim koncentracijama, uzorke prirodnih i otpadnih voda potrebno je ukoncentrirati prije instrumentne analize. U većini istraživanja se u tu svrhu upotrebljava ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase Extraction,* SPE)[3,4,15], dok se za analizu čvrstih uzoraka, kao što su sediment i suspendirane čestice, najčešće upotrebljava ubrzana visokotlačna ekstrakcija otapalom (engl. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE)[16].

Masene koncentracije najvećeg broja opioida u okolišnim uzorcima najčešće su reda veličine ng L^{-1}, međutim, pojedini predstavnici detektirani su i u znatno višim koncentracijama. Primjerice, u istraživanju koje su proveli Baker i Kasprzyk-Hordern[17], u nepročišćenoj otpadnoj vodi zabilježene su povišene masene koncentracije kodeina (2 121 ng L^{-1}), tramadola (2 759 ng L^{-1}) te *N*-demetil-*cis*-tramadola (2 457 ng L^{-1}). Zbog relativno neučinkovitog uklanjanja opioida u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda[18,19,20,21,22] i kontinuiranog unosa u otpadne vode, značajne količine tih spojeva dospijevaju u sustav prirodnih voda te postoji opravdana zabrinutost da bi u tim okolnostima moglo doći do štetnih učinaka za vodene organizme.

Posljednjih se godina čitav niz istraživanja bavio proučavanjem rasprostranjenosti i sudbine različitih farmaceutski aktivnih spojeva u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda. Međutim, literaturni podatci o ponašanju opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u otpadnim i prirodnim vodama su u ovom trenutku nedostatni za procjenu ekološkog rizika povezanog s njihovim unosom u vodeni okoliš. Niti u jednom istraživanju do sada nije u dovoljnoj mjeri stavljen naglasak na sveobuhvatnu analizu opioidnih analgetika. Istraživanja koja su prethodila ovom radu uključivala su analizu ograničenog broja predstavnika opioida, a posebno je zanemaren aspekt istodobnog proučavanja osnovnih opioidnih spojeva i njihovih glavnih humanih metabolita[23]. Uz to, spomenuta istraživanja u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda bila su prvenstveno usmjerena na otopljene spojeve te nisu pružila jasan uvid u mogući doprinos sorpcijskih procesa ukupnoj eliminaciji.

Nadalje, postojeća literaturna saznanja o mogućim transformacijama opioida i njihovih humanih metabolita u vodenom okolišu vrlo su ograničena. Zahvaljujući stalnom napretku analitičkih tehnika, u posljednjih nekoliko godina provedeno je više istraživanja koja su uključivala identifikaciju transformacijskih produkata opioida. Dosadašnja istraživanja su

uglavnom bila usmjerena na abiotičke transformacijske procese, kao što su fototransformacija, fotokatalitička transformacija i kloriranje[24,25,26,27], dok su istraživanja biotransformacije opioida manje zastupljena u literaturi[28,29,30]. O učinkovitosti uklanjanja opioidnih spojeva i ekotoksikološkoj prihvatljivosti transformacijskih proizvoda koji pri tome nastaju postoje različita mišljenja. Postigo i suradnici[24] su zaključili da napredni oksidacijski procesi predstavljaju dobru alternativu za dekontaminaciju voda koje sadrže metadon. Nasuprot tome, Bergheim i suradnici[31] zaključili su da bi fototransformacijski produkti tramadola mogli predstavljati veći rizik za okoliš od samog roditeljskog spoja.

Zaključno, uvidom u postojeću literaturu, utvrđeno je da opioidni analgetici i njihovi transformacijski produkti predstavljaju skupinu nedovoljno istraženih zagađivala farmaceutskog podrijetla. Za sveobuhvatnu procjenu ekološkog rizika od posebnog je interesa proučiti njihovu rasprostranjenost i biogeokemijsko ponašanje u otpadnim i prirodnim vodama te razmotriti moguće pristupe za uklanjanje opioida iz opterećenih otpadnih voda. Stoga su ciljevi ovog doktorskog rada bili:

- razviti analitičke metode za multirezidualno kvantitativno određivanje tragova opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u otpadnim i prirodnim vodama;
- istražiti rasprostranjenost opioidnih tvari u vodenom okolišu;
- proučiti ponašanje i procijeniti učinkovitost uklanjanja opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u konvencionalnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem;
- istražiti abiotičke i mikrobiološke transformacije tramadola i metadona u modelnim laboratorijskim pokusima.

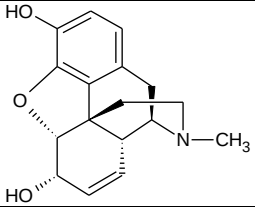
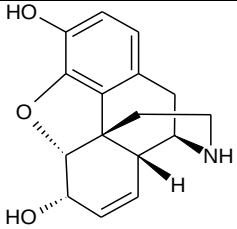
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vrste, podjela, upotreba i metabolizam opioidnih analgetika

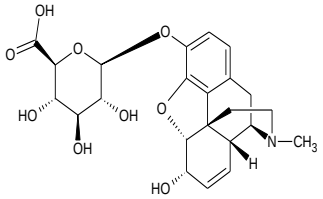
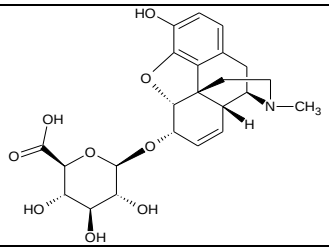
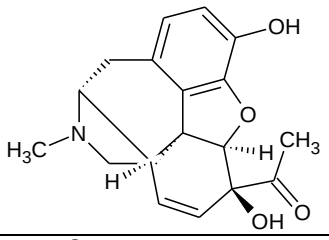
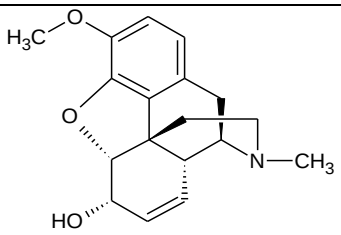
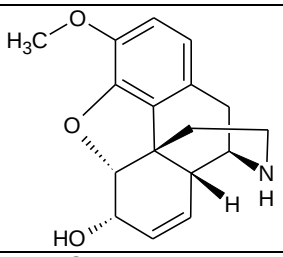
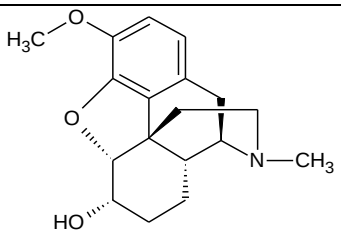
Opioidni analgetici pripadaju skupini kontroliranih psihoaktivnih farmaceutskih tvari koje imaju vrlo široku primjenu. Njihova osnovna terapijska namjena je ublažavanje umjerene do jake boli, ali koriste se i za suzbijanje teškog kašlja, dijareje i akutnih upala pluća te za regulaciju disanja pacijenata kod kojih je rad respiratornog sustava pomognut mehaničkom ventilacijom[32]. Pojedini opioidi, kao što su primjerice metadon i buprenorfin, koriste se u nadomjesnoj terapiji ovisnika o ilegalnim drogama, posebno o heroinu.

Terapijski opioidi se, prema podrijetlu, dijele u tri skupine, a to su prirodni, polusintetski i sintetski[33]. Glavni predstavnici prirodnih opioida su morfin i kodein, koji predstavljaju osnovu za proizvodnju velikog broja polusintetskih opioida poput hidrokodona, oksikodona, oksimorfona, norkodeina i dihidrokodeina. U sintetske opioide ubrajaju se spojevi poput metadona, tramadola, fentanila, norfentanila, propoksifena i buprenorfina. Za razliku od prirodnih i polusintetskih opioida, koji su strukturni srodnici morfina, sintetski opioidi imaju vrlo različite kemijske strukture (Tablica 1), ali s njima dijele svojstvo vezanja na opioidne receptore.

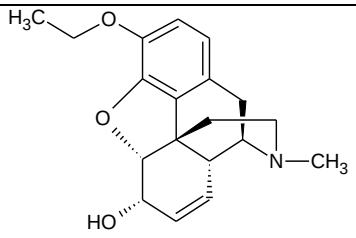
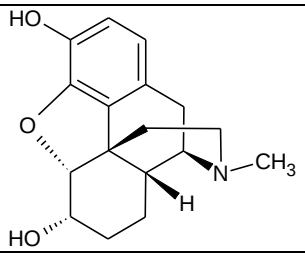
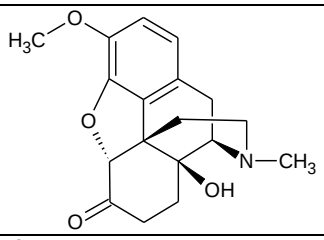
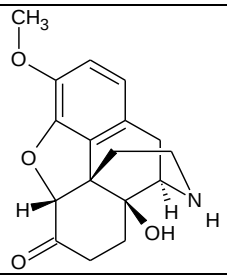
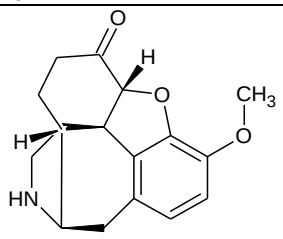
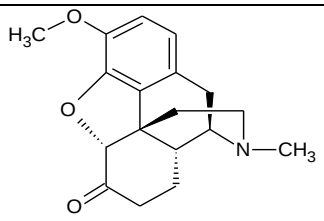
Tablica 1. Opioidni analgetici obuhvaćeni ovim istraživanjem, njihove strukture, elementni sastavi, molekulske mase te pripadajući roditeljski spojevi

Naziv	Struktura	Elementni sastav	$[M+H]^+$	Roditeljski spoj
PRIRODNI OPIOIDI				
Morfin (MOR)		$C_{17}H_{19}NO_3$	286,1444	Metabolit kodeina i heroina
Normorfin (norMOR)		$C_{16}H_{17}NO_3$	272,1288	Metabolit morfina

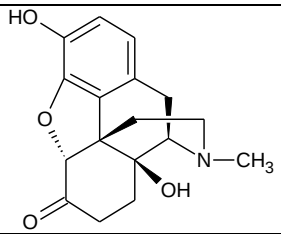
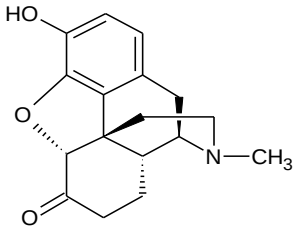
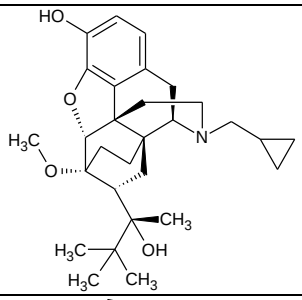
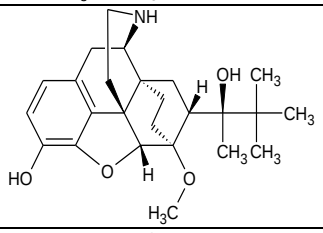
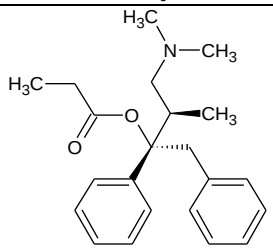
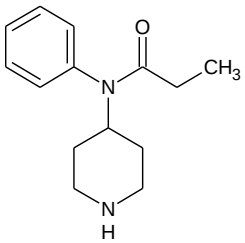
Tablica 1. - nastavak

Naziv	Struktura	Elementni sastav	$[M+H]^+$	Roditeljski spoj
Morfin-3-β-D-glukuronid (M3G)		$C_{23}H_{27}NO_9$	462,1765	Metabolit morfina, kodeina i heroina
Morfin-6-β-D-glukuronid (M6G)		$C_{23}H_{27}NO_9$	462,1765	Metabolit morfina, kodeina i heroina
6–Acetilmorfin (6-AM)		$C_{19}H_{21}NO_4$	328,1550	Metabolit heroina
Kodein (COD)		$C_{18}H_{21}NO_3$	300,1601	Opioidni analgetik
Norkodein (norCOD)		$C_{17}H_{19}NO_3$	286,1444	Metabolit kodeina
Dihidrokodein (DCOD)		$C_{18}H_{23}NO_3$	302,1757	Opioidni analgetik

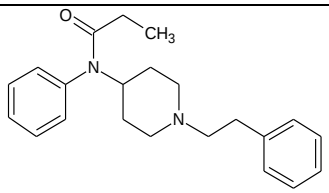
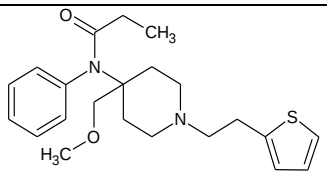
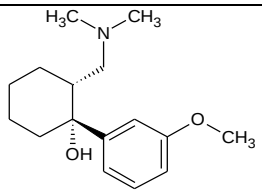
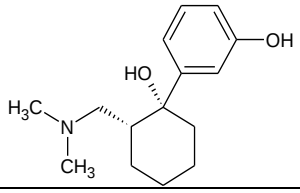
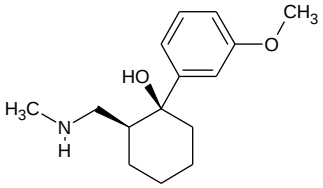
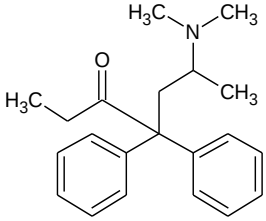
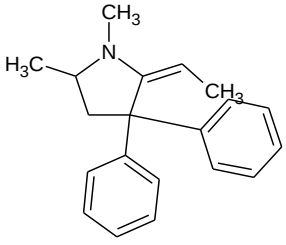
Tablica 1. - nastavak

Naziv	Struktura	Elementni sastav	$[M+H]^+$	Roditeljski spoj
Etilmorfin (EM)		$C_{19}H_{23}NO_3$	314,1757	Opioidni analgetik
Dihidromorfin (DMOR)		$C_{17}H_{21}NO_3$	288,1601	Opioidni analgetik, metabolit dihidrokodeina
POLUSINTETSKI OPIOIDNI ANALGETICI				
Oksikodon (OC)		$C_{18}H_{21}NO_4$	316,1550	Opioidni analgetik
Noroksikodon (NOC)		$C_{17}H_{19}NO_4$	302,1393	Opioidni analgetik
Norhidrokodon (NHC)		$C_{17}H_{19}NO_3$	286,1444	Opioidni analgetik
Hidrokodon (HC)		$C_{18}H_{21}NO_3$	300,1601	Opioidni analgetik

Tablica 1. - nastavak

Naziv	Struktura	Elementni sastav	$[M+H]^+$	Roditeljski spoj
Oksimorfon (OM)		$C_{17}H_{19}NO_4$	302,1393	Opioidni analgetik
Hidromorfon (HM)		$C_{17}H_{19}NO_3$	286,1444	Opioidni analgetik
Buprenorfin (BUP)		$C_{29}H_{41}NO_4$	468,3115	Opioidni analgetik
Norbuprenorfin (norBUP)		$C_{25}H_{35}NO_4$	414,2646	Metabolit buprenorfina
Propoksifen (PP)		$C_{22}H_{29}NO_2$	340,2278	Opioidni analgetik
Norfentanil (NFNT)		$C_{14}H_{20}N_2O$	233,1655	Metabolit fentanila

Tablica 1. - nastavak

Naziv	Struktura	Elementni sastav	$[M+H]^+$	Roditeljski spoj
Fentanil (FNT)		$C_{22}H_{28}N_2O$	337,2281	Opioidni analgetik
Sufentanil (SFNT)		$C_{22}H_{30}N_2O_2S$	387,2107	Opioidni analgetik
Tramadol (TRAM)		$C_{16}H_{25}NO_2$	264,1965	Opioidni analgetik
***O*-demetil-*cis*-tramadol (*O*-DM-TRAM)**		$C_{15}H_{23}NO_2$	250,1808	Metabolit tramadola
***N*-demetil-*cis*-tramadol (*N*-DM-TRAM)**		$C_{15}H_{23}NO_2$	250,1808	Metabolit tramadola
Metadon (MTHD)		$C_{21}H_{27}NO$	310,2177	Opioidni analgetik
2-etildien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin (EDDP)		$C_{20}H_{24}N$	278,1903	Metabolit metadona

Broj propisanih recepata za terapijske opioide u posljednja dva desetljeća u velikom je porastu. Centar za prevenciju i kontrolu bolesti izvijestio je 2018. godine kako je potrošnja opioidnih analgetika na globalnoj razini u razdoblju od 1999. do 2010. godine porasla 14 puta, dok je 2017. godine broj umrlih od predoziranja ušesterostručen u odnosu na 1999. godinu. Najviša potrošnja opioida zabilježena je u SAD-u, Njemačkoj i Australiji, što upućuje na korelaciju visoke razvijenosti zemlje i stope konzumacije opioida. Zbog iznimno visoke primjene i konstantnog porasta potrošnje, u SAD-u je proglašena epidemija zlouporabe i predoziranja opioidima[34].

Bosetti i suradnici[35] izvijestili su kako je u 42 istraživane države konzumacija opioida značajno porasla u razdoblju od 2014. do 2016. godine u usporedbi s razdobljem od 2004. do 2006. godine. Pri tome su, u razdoblju od 2014. do 2016. godine, najvišu stopu potrošnje izraženu kao broj definiranih dnevnih doza (DDD) na milijun stanovnika imale Njemačka (21 346 DDD na milijun stanovnika), Austrija (20 180 DDD na milijun stanovnika) te SAD (16 491 DDD na milijun stanovnika), a najnižu Ukrajina (66 DDD na milijun stanovnika).

U većini zemalja se u terapiji opioidnim analgeticima najviše primjenjuje fentanil, dok se u SAD-u, uz fentanil, u velikim količinama primjenjuje i hidrokodon. Austrija je primjer zemlje u kojoj se, uz fentanil, bilježi iznimno visoka stopa konzumacije morfina. Najviše stope potrošnje metadona 2015. godine zabilježene su u Novom Zelandu (58,0 mg / stanovniku), Mauriciusu (53,0 mg / stanovniku), SAD-u (48,2 mg / stanovniku), Kanadi (47,8 mg / stanovniku), Danskoj (43,9 mg / stanovniku) i Irskoj (41,5 mg / stanovniku), dok su najniže stope potrošnje tog opioida zabilježene u Ujedinjenim Arapskim Emiratima (0,002 mg / stanovniku), Šri Lanki (0,001 mg / stanovniku) i Papui Novoj Gvineji (0,001 mg / stanovniku).

Prema izvještajima Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), od dostupnih podataka o potrošnji pojedinih opioidnih analgetika, u Hrvatskoj su najčešće propisivani opioidi tramadol, buprenorfin i fentanil[36]. Iz Tablice 2 može se uočiti blago smanjenje potrošnje fentanila od 2009. do 2019. godine, dok se za buprenorfin bilježi blagi porast potrošnje. Za tramadol je u 2019. zabilježen porast stope potrošnje u obliku kombiniranog pripravka s paracetamolom, međutim doza tramadola u ovakvim pripravcima je uglavnom višestruko niža nego u onima u kojima je tramadol jedini analgetik.

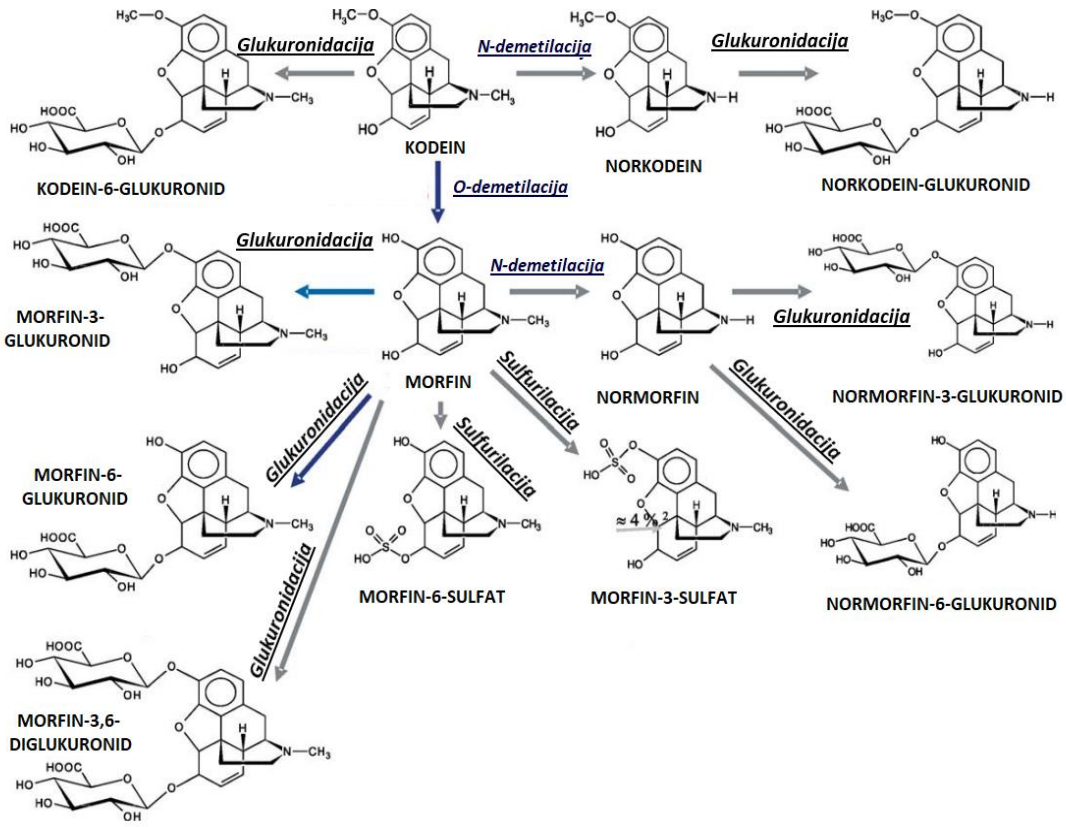
Tablica 2. Potrošnja opioidnih analgetika i njihovih pojedinih predstavnika u Republici Hrvatskoj od 2009. do 2019. godine[36]

		Potrošnja [broj definiranih dnevnih doza (DDD) na 1 000 stanovnika po danu]										
Naziv	**DDD^{unos}**	**2009.**	**2010.**	**2011.**	**2012.**	**2013.**	**2014.**	**2015.**	**2016.**	**2017.**	**2018.**	**2019.**
TRAM[1]	300 mg^{O,P,R}	2,79	2,85	2,84	2,72	2,61	2,46	4,42	2,44	2,28	2,19	2,11
TRAM + PAR[1]	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,92
TRAM + DEK[1]	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BUP[1]	1,2 mg^{P,SL,TD}	0,92	1,08	1,03	1,06	1,08	0,99	1,04	1,13	1,03	1,13	1,17
BUP[2]	2,1 mg^{P} 8 mg^{SL}	0,49	0,45	0,55	0,69	0,81	0,85	0,94	0,96	0,98	1,02	1,05
FNT[1,3]	0,6 mg^{N,SL} 1,2 mg^{TD}	0,59	0,62	0,63	0,65	0,62	0,58	0,63	0,61	0,59	0,60	0,63
MOR[1]	100 mg^{O} 30 mg^{P,R}	0,04	0,07	0,08	0,05	0,06	0,07	0,10	0,08	0,08	0,08	0,08
OC[1]	75 mg^{O} 30 mg^{P}	0,03	0,05	0,06	0,07	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04
OC + NAL[1]	75 mg^{O}	-	-	-	-	-	0,00	0,01	0,03	0,04	0,05	0,05
COD[1]	ND	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00
COD[4]	100 mg^{O}	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
MTHD[2]	25 mg^{O,P}	4,16	4,57	4,49	4,68	4,81	4,35	4,85	5,61	5,26	4,66	5,05

[1]Opioidi**,** [2]Lijekovi za liječenje ovisnosti, [3]Opioidni anestetici**,** [4]Antitusici**, ND** – nije definirano (nedostupno), **TRAM** – tramadol, **TRAM + PAR** – tramadol + paracetamol, **TRAM + DEK** – tramadol + deksketoprofen, **BUP** – buprenorfin, **FNT** – fentanil, **MOR** – morfin, **OC** – oksikodon, **OC + NAL** – oksikodon + naloksen, **COD** – kodein, **MTHD** – metadon, **O** – oralno, **P** – parentalno, **R** – rektalno, **N** – nazalno, **SL** – sublingvalno / bukalno / oromukozno, **TD** – transdermalno

Budući da se opioidni analgetici vrlo često koriste u ilegalne svrhe, njihova se potrošnja ne može pouzdano pratiti samo na temelju statistika o prepisanim količinama. Jedno od mogućih komplementarnih rješenja, koje se u novije vrijeme sve češće primjenjuje, je praćenje potrošnje na temelju određivanja prikladnih urinarnih biomarkera pojedinih lijekova i ilegalnih supstancija u komunalnim otpadnim vodama. Naime, otpadne vode su izvrstan izvor informacija o navikama populacije koja je priključena na kanalizacijski sustav te se njihovom analizom može dobiti pouzdana informacija o sveukupnoj potrošnji opioidnih analgetika[18]. Na temelju podataka dobivenih primjenom pristupa zasnovanog na analizi otpadnih voda i službenih podataka o prepisanim količinama, mogla bi se načiniti kvalitetnija procjena zloupotrebe opioida.

Opioidni analgetici se u ljudski organizam najčešće unose oralnim putem, a u manjem postotku, intravenozno, sublingvalno i inhalacijama. Prema dostupnim farmakokinetičkim podatcima, većina terapijskih opioida se u ljudskom organizmu u velikoj mjeri metabolizira, a samo se dijelom izlučuju u nepromijenjenom obliku[5,37]. Tako, primjerice, humani metabolizam kodeina primarno uključuje *O*- i *N*-demetilaciju, što dovodi do formiranja morfina, normorfina i norkodeina, dok se u manjoj mjeri glukuronidacijom formira kodein-6-glukuronid[6]. Analgetički utjecaj kodeina na μ-opioidne receptore značajno je slabiji u odnosu na morfin. Stoga je Lötsch u svom istraživanju naveo kako analgetičko djelovanje kodeina u velikoj mjeri ovisi o *O*-demetilaciji u morfin[38]. Nadalje, morfin se u ljudskom organizmu intenzivno metabolizira. Nakon konzumacije, 87 % morfina se iz ljudskog tijela izlučuje urinom, od čega 75 % u obliku morfin-3-β-D-glukuronida, a samo 10 % u nepromijenjenom obliku te u manjoj mjeri u obliku morfin-6-β-D-glukuronida, diglukuronida i sulfatnih konjugata (Slika 1).



Slika 1. Metabolički put kodeina i morfina[38]

Metabolički put metadona u ljudskom organizmu uključuje *N*-demetilaciju i ciklizaciju pri čemu nastaju dva osnovna metabolita, 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolin (EDDP) te 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin (EMDP)[7,8]. Glavni urinarni produkti izlučivanja metadona uključuju roditeljski spoj (od 5 % do 50 %) te metabolite EDDP i EMDP (od 3 % do 25 %), dok su konjugirani oblici manje zastupljeni. Dominantan metabolički proces buprenorfina je *N*-dealkiliranje te se na taj način formira niz produkata koji se uglavnom izlučuju kao konjugirani buprenorfin i norbuprenorfin. Prilikom humane metabolizacije tramadola, približno 29 % oralne doze izlučuje se u nepromijenjenom obliku, 20 % kao slobodni ili konjugirani *O*-demetil-*cis*-tramadol, 17 % kao nortramadol te 20 % kao slobodni i konjugirani *O*-demetilnortramadol.

Podatci o metabolizmu terapijskih opioida jasno pokazuju kako za sveobuhvatnu procjenu njihova utjecaja na okoliš nije dovoljno proučavati samo roditeljske spojeve, već u obzir treba uzeti i njihove metabolite[9].

2.2. Opioidni analgetici kao zagađivala vodenog okoliša

2.2.1. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim vodama

Sustavna istraživanja rasprostranjenosti opioida u okolišu započela su tek u najnovije vrijeme. Međutim, zbog vrlo česte zloupotrebe, predstavnici opioidnih analgetika često su uključeni u istraživanja koja se bave određivanjem potrošnje ilegalnih droga na temelju analize njihovih urinarnih biomarkera u komunalnim otpadnim vodama. Stoga u posljednjih desetak godina postoje brojni podatci o koncentracijama pojedinih opioida u otpadnim vodama. U Tablici 3 prikazana je usporedba literaturnih podataka o prosječno izmjerenim masenim koncentracijama opioidnih analgetika u nepročišćenim i pročišćenim komunalnim otpadnim vodama. Iako su masene koncentracije većine opioidnih analgetika u okolišnim uzorcima uglavnom reda veličine ng L^{-1}, pojedini predstavnici detektirani su u koncentracijama reda veličine μg L^{-1}. Najviše koncentracije opioidnih analgetika u otpadnim vodama izmjerene su za tramadol i njegov metabolit *N*-demetil-*cis*-tramadol[17], metadon i njegov metabolit EDDP[39,40] te za morfin[39,40] i kodein[17].

Tablica 3. Usporedba prosječnih masenih koncentracija opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u nepročišćenim i pročišćenim otpadnim vodama. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	Država	God.	Nepročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Pročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Referencija
MTHD	Španjolska	2007.	13	11	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	112	65	Berset i sur.[40]
	Italija	2006.	12	9	Castiglioni i sur.[18]
	Švicarska	2006.	50	36	Castiglioni i sur.[18]
	Ujedinjeno Kraljevstvo (UK)	2010.	88	50	Baker i sur.[17]
	Hrvatska	2009.	52	37	Terzić i sur.[2]
	Španjolska	2016.	26	24	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2010.	45	18	Martínez Bueno i sur.[42]
	SAD	2017.	36	25	Skees i sur.[4]
	Kanada	2014.	1	69	Yargeau i sur.[21]
	UK	2012.	66	42	Baker i sur.[43]
	Francuska	2012.	138	93	Nefau i sur.[39]
	Španjolska	2009.	< GK	< GK	González-Mariño i sur.[12]
	Češka	2011.	16	-	Baker i sur.[44]
	SAD	2007.	34	-	Chiaia i sur.[45]
	Slovačka	2013.	10	-	Mackul′ak i sur.[46]
EDDP	Španjolska	2007.	20	22	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	315	294	Berset i sur.[40]
	Italija	2006.	20	23	Castiglioni i sur.[18]
	Švicarska	2006.	91	72	Castiglioni i sur.[18]
	UK	2010.	193	89	Baker i sur.[17]
	Hrvatska	2009.	128	123	Terzić i sur.[2]
	Španjolska	2016.	65	69	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2010.	138	64	Martínez Bueno i sur.[42]
	Kanada	2014.	8	102	Yargeau i sur.[21]
	Francuska	2012.	133	128	Nefau i sur.[39]
	Češka	2011.	21	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	81	32	Baker i sur.[43]
	Slovačka	2013.	18	-	Mackul′ak i sur.[46]
TRAM	Njemačka	2005.	1 500	610	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	2 759	1 226	Baker i sur.[17]
	Kanada	2014.	< GK	82	Yargeau i sur.[21]
	UK	2012.	1 123	739	Baker i sur.[43]
	Češka	2011.	1 361	-	Baker i sur.[44]
	Slovačka	2013.	850	-	Mackul′ak i sur.[46]

Tablica 3. - nastavak

Analit	Država	God.	Nepročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Pročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Referencija
***N*-DM-TRAM**	UK	2010.	2 457	433	Baker i sur.[17]
	Češka	2011.	557	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	397	145	Baker i sur.[43]
OM	UK	2010.	20	< GK	Baker i sur.[17]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	15	8	Baker i sur.[43]
MOR	Tajvan	2010.	56	< GK	Lin i sur.[48]
	Njemačka	2005.	820	110	Hummel i sur.[47]
	Španjolska	2007.	54	51	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	1 007	929	Berset i sur.[40]
	Italija	2006.	83	< GK	Castiglioni i sur.[18]
	Švicarska	2006.	204	55	Castiglioni i sur.[18]
	UK	2010.	481	131	Baker i sur.[17]
	Hrvatska	2009.	294	56	Terzić i sur.[2]
	Kanada	2014.	10	9	Yargeau i sur.[21]
	Španjolska	2016.	196	31	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2010.	152	73	Martínez Bueno i sur.[42]
	SAD	2017.	92	43	Skees i sur.[4]
	Francuska	2012.	1 637	71	Nefau i sur.[39]
	Španjolska	2009.	137	82	González-Mariño i sur.[12]
	Češka	2011.	12	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	371	59	Baker i sur.[43]
M3G	Italija	2017.	3	< GK	Castiglioni i sur.[18]
	Švicarska	2017.	18	< GK	Castiglioni i sur.[18]
EM	Španjolska	2010.	< GK	< GK	Martínez Bueno i sur.[42]
HM	SAD	2017.	42	22	Skees i sur.[4]
COD	Njemačka	2005.	540	260	Hummel i sur.[47]
	Španjolska	2007.	55	111	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	228	204	Berset i sur.[40]
	UK	2010.	2 121	437	Baker i sur.[17]
	Hrvatska	2009.	262	149	Terzić i sur.[2]
	Španjolska	2016.	969	744	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2010.	845	390	Martínez Bueno i sur.[42]
	Tajvan	2010.	47	44	Lin i sur.[48]
	SAD	2017.	148	28	Skees i sur.[4]
	Kanada	2014.	100	454	Yargeau i sur.[21]
	UK	2012.	1 256	372	Baker i sur.[43]
	Češka	2011.	187	-	Baker i sur.[44]
	Španjolska	2009.	205	111	González-Mariño i sur.[12]
	Slovačka	2013.	82	-	Mackul′ak i sur.[46]

Tablica 3. - nastavak

Analit	Država	God.	Nepročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Pročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Referencija
DCOD	Njemačka	2005.	330	140	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	321	146	Baker i sur.[17]
	Kanada	2014.	< GK	< GK	Yargeau i sur.[21]
	Češka	2011.	137	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	227	118	Baker i sur.[43]
norCOD	UK	2012.	72	24	Baker i sur.[43]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	Španjolska	2007.	6	14	Boleda i sur.[41]
	UK	2010.	112	33	Baker i sur.[17]
6-AM	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[41]
	Italija	2006.	12	< GK	Castiglioni i sur.[18]
	Švicarska	2006.	10	< GK	Castiglioni i sur.[18]
	UK	2010.	22	< GK	Baker i sur.[17]
	Hrvatska	2009.	12	2	Terzić i sur.[2]
	Kolumbija	2015.	< GK	< GK	Bijlsma i sur.[49]
	Španjolska	2010.	< GK	< GK	Martínez Bueno i sur.[42]
	Tajvan	2010.	< GK	< GK	Lin i sur.[48]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	9	2	Baker i sur.[43]
HC	Njemačka	2005.	95	47	Hummel i sur.[47]
	SAD	2007.	70	-	Chiaia i sur.[45]
	SAD	2017.	147	107	Skees i sur.[4]
norMOR	Španjolska	2007.	< GK	31	Boleda i sur.[41]
	UK	2010.	203	62	Baker i sur.[17]
	UK	2012.	131	20	Baker i sur.[43]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
OC	Njemačka	2005.	70	< GK	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	12	12	Baker i sur.[17]
	SAD	2017.	72	38	Skees i sur.[4]
	Kanada	2014.	34	115	Yargeau i sur.[21]
	SAD	2007.	99	-	Chiaia i sur.[45]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	9	7	Baker i sur.[43]
BUP	UK	2010.	33	14	Baker i sur.[17]
	SAD	2017.	14	< GK	Skees i sur.[4]
	UK	2012.	47	15	Baker i sur.[43]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	Francuska	2012.	98	40	Nefau i sur.[39]
PP	UK	2010.	11	7	Baker i sur.[17]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	8	< GK	Baker i sur.[43]

Tablica 3. - nastavak

Analit	Država	God.	Nepročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Pročišćena otpadna voda γ / ng L^{-1}	Referencija
norBUP	UK	2010.	< GK	< GK	Baker i sur.[17]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	19	8	Baker i sur.[43]
FNT	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[41]
	UK	2010.	1,7	< GK	Baker i sur.[17]
	Tajvan	2010.	1,4	< GK	Lin i sur.[48]
	SAD	2017.	1,6	20	Skees i sur.[4]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	1,3	0,5	Baker i sur.[43]
NFNT	UK	2010.	6,9	1,1	Baker i sur.[17]
	Češka	2011.	< GK	-	Baker i sur.[44]
	UK	2012.	< GK	< GK	Baker i sur.[43]

MTHD – metadon, **EDDP –** 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin, **TRAM –** tramadol, ***N*-DM-TRAM –** *N*-demetil-*cis*-tramadol, **OM –** oksimorfon, **MOR –** morfin, **M3G –** morfin-3-β-D-glukuronid, **EM –** etilmorfin, **HM –** hidromorfon, **COD –** kodein, **DCOD –** dihidrokodein, **norCOD –** norkodein, **6-AM –** 6-acetilmorfin, **HC –** hidrokodon, **norMOR –** normorfin, **OC –** oksikodon, **BUP –** buprenorfin, **PP –** propoksifen, **norBUP –** norbuprenorfin, **FNT –** fentanil, **NFNT –** norfentanil, **GK –** granica kvantitativnog određivanja

Iz Tablice 3 može se uočiti kako je od svih opioidnih analgetika najviše istraživanja o zastupljenosti u otpadnim vodama provedeno za morfin (n = 16), kodein (n = 14), metadon (n = 16), EDDP (n = 13) te 6-acetilmorfin (n = 10), dok je najmanji broj istraživanja obuhvaćao etilmorfin i hidromorfon (n = 1) te morfin-3-β-D-glukuronid (n = 2).

Većina objavljenih istraživanja čiji je predmet bio određivanje opioidnih analgetika u otpadnim vodama, obuhvaćala je mali broj roditeljskih spojeva i njihovih metabolita. Lin i suradnici[48] razvili su metodu za analizu 4 terapeutskih opioida u okolišnim uzorcima, dok su Skees i suradnici[8] razvili metodu koja je obuhvaćala 8 opioida. Najopsežnije istraživanje rasprostranjenosti opioida, koje je prethodilo ovom radu, proveli su Baker i Kasprzyk-Hordern[17]. Razvijena analitička metoda obuhvaćala je sumarno 65 farmaceutskih tvari, od kojih je 21 pripadalo skupini opioida i njihovim metabolitima. Međutim, navedeno istraživanje nije obuhvaćalo polarne derivate morfina, kao što su morfin-3-β-D-glukuronid, morfin-6-β-D-glukuronid, dihidromorfin i hidromorfon. Obzirom na važnost i zastupljenost glukuronidnih konjugata prilikom izlučivanja iz ljudskog organizma, njihovo određivanje u otpadnim vodama moglo bi biti vrlo važno za sveobuhvatnu procjenu ponašanja i učinka na okoliš.

2.2.2. Ponašanje opioidnih analgetika u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda

Opioidni analgetici se u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda uklanjaju nepotpuno, a za pojedine teško razgradljive opioide stupanj eliminacije je gotovo zanemarljiv[18,19,20,21,22].

Castiglioni i suradnici[18] zabilježili su potpuno uklanjanje 6-acetilmorfina i morfin-3-β-D-glukuronida u konvencionalnim uređajima za pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem u Italiji. Međutim, u istim uređajima, eliminacija metadona bila je niža od 28 %, dok je za njegov glavni humani metabolit, EDDP, zabilježena negativna eliminacija, odnosno povišenje koncentracije nakon pročišćavanja otpadnih voda za 14 %. U sličnom istraživanju u Španjolskoj[20] utvrđen je, također, visok stupanj uklanjanja morfina i 6-acetilmorfina (88 %). Nasuprot tome, istraživanje koje su u Kanadi proveli Rodayan i suradnici[19] pokazalo je da je stupanj uklanjanja morfina, oksikodona i EDDP-a bio niži od 40 %. Na slabo uklanjanje opioida (6-acetilmorfin 23 %; kodein 37 %) ukazalo je i istraživanje Yorgeaua i suradnika[21]. Očito da postoje značajne razlike između pojedinih uređaja koje se najvjerojatnije mogu protumačiti razlikama u sastavu aktivnih mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju za razgradnju opioidnih tvari, ali i mogućim temperaturnim razlikama na pojedinim lokacijama. Međutim, ne postoje sustavna istraživanja koja bi adekvatno dokumentirala te pretpostavke. Najkontroverzniji literaturni podatci odnose se na izmjereni negativni stupanj eliminacije 6-acetilmorfina[22], kodeina[22], metadona[22], EDDP-a[19,22] i tramadola[19]. Uzrok takvog rezultata mogla bi biti retransformacija nekih nepoznatih prekursora u promatrane opioidne spojeve (npr. dekonjugacijom odgovarajućih glukuronida), ali takav scenarij zasada nije dokazan u literaturi. Drugi razlog može biti sasvim tehničke prirode kao što je nedovoljna usklađenost uzorkovanja ulazne (nepročišćene) i izlazne (pročišćene) otpadne vode. Dakako, to prije svega, dolazi do izražaja kod teže razgradljivih tipova opioida.

2.2.3. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u prirodnim vodama

Nepotpuno uklanjanje opioidnih analgetika u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda ima za posljedicu da se putem pročišćenih otpadnih voda u vodeni okoliš unose znatne količine opioida. Stoga su brojna istraživanja usmjerena na praćenje rasprostranjenosti i zastupljenosti pojedinih opioidnih analgetika u prirodnim vodama. Kao i u otpadnim vodama, najčešće analizirani opioidni spojevi u površinskim vodama bili su kodein, morfin, metadon, EDDP i

6-acetilmorfin. U Tablici 4 prikazan je literaturni pregled najnižih i najviših masenih koncentracija opioida i njihovih metabolita određenih u prirodnim vodama.

Tablica 4. Usporedba raspona masenih koncentracija opioidnih analgetika i njihovih metabolita u prirodnim vodama. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	Država	God.	Najniža masena konc. γ / ng L^{-1}	Najviša masena konc. γ / ng L^{-1}	Referencija
MOR	Italija	2006.	< GK	38	Zuccato i sur.[50]
	Engleska	2005.	< GK	51	Zuccato i sur.[50]
	Njemačka	2005.	-	78	Hummel i sur.[47]
	Španjolska	2007.	4,8	6,3	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	< GK	1,4	Berset i sur.[40]
	Španjolska	2007.	< GK	31	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	36	Baker i sur.[17]
	Španjolska	2010./11.	-	22	Mastroianni i sur.[52]
	Španjolska	2015.	-	3,0	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2009.	-	89	González-Mariño i sur.[12]
	Španjolska	2010.	12	19	Martínez Bueno i sur.[42]
	Tajvan	2010.	-	108	Lin i sur.[48]
	SAD	2017.	< GK	6,2	Skees i sur.[4]
	Španjolska	2007./08.	6,5	11	Postigo i sur.[20]
	UK	2011.	0,5	32	Baker i sur.[43]
	Španjolska	2010.	2,6	21	Jurado i sur.[53]
	Španjolska	2012.	21	148	Mendoza i sur.[54]
	Nizozemska	2009.	< GK	7,0	Van der Aa i sur.[55]
	Kina	2015.	< GK	< GK	Wang i sur.[56]
COD	Italija	2006.	1	51	Zuccato i sur.[50]
	Njemačka	2005.	-	94	Hummel i sur.[47]
	Španjolska	2007.	19	27	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	< GK	18	Berset i sur.[40]
	Španjolska	2007.	< GK	251	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	342	Baker i sur.[17]
	Španjolska	2015.	-	7,0	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2009.	-	149	González-Mariño i sur.[12]
	Španjolska	2010.	32	174	Martínez Bueno i sur.[42]
	Francuska	2013.	7,9	8,9	Brieudes i sur.[14]
	Tajvan	2010.	-	57	Lin i sur.[48]
	SAD	2017.	< GK	34	Skees i sur.[4]
	UK	2011.	3,2	341	Baker i sur.[43]
	Nizozemska	2009.	1	23	Van der Aa i sur.[55]
	Kina	2015.	0,8	1,8	Wang i sur.[56]

Tablica 4. - nastavak

Analit	Država	God.	Najniža masena konc. γ / ng L^{-1}	Najviša masena konc. γ / ng L^{-1}	Referencija
HC	Njemačka	2005.	-	28	Hummel i sur.[47]
	SAD	2017.	5,0	126	Skees i sur.[4]
EM	Španjolska	2010.	< GK	< GK	Martínez Bueno i sur.[42]
HM	SAD	2017.	< GK	9,1	Skees i sur.[4]
MTHD	Švicarska	2009.	< GK	4,6	Berset i sur.[40]
	Španjolska	2007.	< GK	18	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	18	Baker i sur.[17]
	Španjolska	2010./11.	-	20	Mastroianni i sur.[52]
	Španjolska	2015.	-	25	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2009.	-	< GK	González-Mariño i sur.[12]
	Španjolska	2010.	2,0	14	Martínez Bueno i sur.[42]
	Francuska	2013.	< GK	0,6	Brieudes i sur.[14]
	SAD	2017.	2,4	18	Skees i sur.[4]
	UK	2011.	0,2	24	Baker i sur.[43]
	Španjolska	2010.	6,4	52	Jurado i sur.[53]
	Španjolska	2012.	7,7	55	Mendoza i sur.[54]
	Nizozemska	2009.	1,0	2,0	Van der Aa i sur.[55]
	Kina	2015.	0,1	0,3	Wang i sur.[56]
	Italija	2006.	0,2	8,6	Zuccato i sur.[50]
	Španjolska	2007.	4,9	10	Boleda i sur.[41]
EDDP	Italija	2006.	0,6	18	Zuccato i sur.[50]
	Španjolska	2007.	9,6	18	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	0,6	12	Berset i sur.[40]
	Španjolska	2007.	2,0	64	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	38	Baker i sur.[17]
	Španjolska	2010./11.	-	50	Mastroianni i sur.[52]
	Španjolska	2015.	-	< GK	Andrés-Costa i sur.[3]
	Španjolska	2010.	31	40	Martínez Bueno i sur.[42]
	Francuska	2013.	1,7	1,9	Brieudes i sur.[14]
	UK	2011.	0,5	41	Baker i sur.[43]
	Španjolska	2010.	12	95	Jurado i sur.[53]
	Španjolska	2012.	21	151	Mendoza i sur.[54]
	Nizozemska	2009.	< GK	< GK	Van der Aa i sur.[55]
	Kina	2015.	0,2	0,3	Wang i sur.[56]
DCOD	Njemačka	2005.	-	79	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	1,0	97	Baker i sur.[43]

Tablica 4. - nastavak

Analit	Država	God.	Najniža masena konc. γ / ng L^{-1}	Najviša masena konc. γ / ng L^{-1}	Referencija
OC	Njemačka	2005.	-	< GK	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	-	7,1	Baker i sur.[17]
	SAD	2017.	2,9	27	Skees i sur.[4]
	UK	2011.	< GK	6,5	Baker i sur.[43]
PP	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	< GK	< GK	Baker i sur.[43]
TRAM	Njemačka	2005.	-	52	Hummel i sur.[47]
	UK	2010.	-	441	Baker i sur.[17]
	Francuska	2013.	61	65	Brieudes i sur.[14]
	UK	2011.	1,1	539	Baker i sur.[43]
norMOR	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[41]
	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	< GK	5,7	Baker i sur.[43]
norCOD	Španjolska	2007.	< GK	8,5	Boleda i sur.[41]
	Španjolska	2007.	< GK	10	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	20	Baker i sur.[17]
	Francuska	2013.	1,3	1,5	Brieudes i sur.[14]
	UK	2011.	< GK	20	Baker i sur.[43]
6-AM	Španjolska	2007.	< GK	3,4	Boleda i sur.[41]
	Švicarska	2009.	< GK	1,2	Berset i sur.[40]
	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	Španjolska	2010./11.	-	3,0	Mastroianni i sur.[52]
	Španjolska	2010.	< GK	< GK	Martínez Bueno i sur.[42]
	Tajvan	2010.	-	< GK	Lin i sur.[48]
	Španjolska	2007./08.	< GK	< GK	Postigo i sur.[20]
	UK	2011.	< GK	< GK	Baker i sur.[43]
	Španjolska	2012.	< GK	< GK	Mendoza i sur.[54]
	Nizozemska	2009.	< GK	< GK	Van der Aa i sur.[55]
	Kina	2015.	< GK	< GK	Wang i sur.[56]
FNT	Španjolska	2007.	< GK	< GK	Boleda i sur.[41]
	Španjolska	2007.	< GK	2,3	Boleda i sur.[51]
	UK	2010.	-	1,0	Baker i sur.[17]
	Tajvan	2010.	-	< GK	Lin i sur.[48]
	SAD	2017.	< GK	1,5	Skees i sur.[4]
	UK	2011.	< GK	< GK	Baker i sur.[43]
	Nizozemska	2009.	< GK	< GK	Van der Aa i sur.[55]

Tablica 4. - nastavak

Analit	Država	God.	Najniža masena konc. γ / ng L^{-1}	Najviša masena konc. γ / ng L^{-1}	Referencija
NFNT	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	< GK	< GK	Baker i sur.[43]
OM	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	< GK	3,5	Baker i sur.[43]
norBUP	UK	2010.	-	< GK	Baker i sur.[17]
	UK	2011.	< GK	3,4	Baker i sur.[43]
BUP	UK	2010.	-	90	Baker i sur.[17]
	SAD	2017.	< GK	< GK	Skees i sur.[4]
	UK	2011.	< GK	14	Baker i sur.[43]

MOR – morfin, **COD –** kodein, **HC –** hidrokodon, **EM –** etilmorfin, **HM –** hidromorfon, **MTHD –** metadon, **EDDP –** 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin, **DCOD –** dihidrokodein, **OC –** oksikodon, **PP –** propoksifen, **TRAM –** tramadol, **norMOR –** normorfin, **norCOD –** norkodein, **6-AM –** 6-acetilmorfin, **FNT –** fentanil, **NFNT –** norfentanil, **OM –** oksimorfon, **norBUP –** norbuprenorfin, **BUP –** buprenorfin, **GK –** granica kvantitativnog određivanja

Očekivano, najviše koncentracije zabilježene su za one opioide koji imaju najvišu upotrebu i koji se najslabije uklanjaju u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda. Najviša masena koncentracija u površinskim vodama (rijeke Temza u UK-u i Manzanares u Španjolskoj) izmjerena je za tramadol[43] (Temza 539 ng L^{-1}), kodein[17] (Calder, 342 ng L^{-1}), morfin[54] (Manzanares, 148 ng L^{-1}), metadon[54] (Manzanares, 55 ng L^{-1}) i EDDP[54] (Manzanares, 151 ng L^{-1}).

2.2.4. Abiotičke i biotičke transformacije opioidnih analgetika

Transformacijski procesi imaju značajan utjecaj na biogeokemijsko ponašanje opioidnih anagetika te procjenu ekološkog rizika. Oni neposredno utječu na koncentracijske razine i kemijski oblik u kojem će se neki opioidni sastojak pojaviti u okolišu. Prema podrijetlu i načinu nastanka, razlikuje se nekoliko kategorija transformacijskih produkata opioida. Jedna kategorija već je spomenuta ranije i obuhvaća transformacijske proizvode koji nastaju metaboličkim transformacijama u ljudskom organizmu (humani metaboliti). Drugu skupinu predstavljaju transformacijski proizvodi koji nastaju glavnim transformacijskim procesima u okolišu, uključujući mikrobnu transformaciju, fotokemijsku razgradnju te redoks reakcije i hidrolizu, a treća obuhvaća transformacijske proizvode koji nastaju primjenom naprednih tehnologija za pročišćavanje otpadnih voda (npr. oksidacijski procesi, poput kloriranja,

ozoniranja te kombinacije ultraljubičastog zračenja i vodikovog peroksida). Pri tom treba naglasiti da transformacijski produkti koji pripadaju spomenutim kategorijama ne moraju nužno biti kemijski različiti. Ukoliko su transformacijski procesi učinkoviti, oni dovode do smanjenja izloženosti roditeljskim spojevima i do smanjenja ekološkog rizika. Međutim, pri tome često nastaje vrlo široki spektar stabilnih transformacijskih proizvoda, koji mogu značajno doprinositi ukupnoj koncentraciji spojeva poteklih od opioida, a čiji su učinci u okolišu uglavnom nepoznati[9].

Stoga je, za sveobuhvatnu procjenu ekološkog rizika opioidnih analgetika u vodenom okolišu, potrebno u obzir uzeti i njihove transformacijske produkte. Pri tom pozornost treba posvetiti onim transformacijskim proizvodima koji iz roditeljskog spoja nastaju u visokom postotku te onima koji pokazuju povišenu toksičnost u odnosu na roditeljski spoj[9]. U tom kontekstu, posebnu važnost imaju modelna simulacijska istraživanja pojedinih biotičkih (biološka razgradnja) i abiotičkih procesa (fotokemijska razgradnja, oksidacija ili hidroliza) pri čemu se ispitivanja provode kombinacijom metoda kemijske analize i biotestova. Upotrebom biotestova prate se promjene ukupne toksičnosti medija u kojem se provodi neka transformacija (na koju, dakle, utječu i toksičnost roditeljskog spoja i toksičnost nastalih transformacijskih produkata) te se dobiveni rezultat uspoređuje s rezultatima detaljne kemijske analize. Ocjena ekotoksikološke relevantnosti transformacijskog procesa dobiva se usporedbom promjene (smanjenja) toksičnosti sa smanjenjem koncentracije roditeljskog spoja. Očigledno, očekivani ekotoksikološki rizik je viši za roditeljske spojeve koji se slabo uklanjaju, ali najnepovoljniji ishod predstavlja transformacija osnovnih spojeva u stabilne produkte koji su toksičniji od početnog spoja. Sveobuhvatnim analizama uz upotrebu analiza usmjerenih učincima (engl. *effect-directed analysis*, EDA) moguće je komplementarnom primjenom vrlo naprednih identifikacijskih kemijskih tehnika i bioloških analitičkih alata otkriti novonastale sastojke odgovorne za povećanu toksičnost[57].

Prema dostupnim literaturnim podatcima, postojeća saznanja o mogućim transformacijama opioidnih analgetika i njihovih humanih metabolita u vodenom okolišu vrlo su ograničena. Zahvaljujući stalnom napretku analitičkih tehnika, u posljednjih nekoliko godina provedeno je više istraživanja koja su uključivala identifikaciju formiranih transformacijskih produkata. Istraživanja su uglavnom bila usmjerena na abiotičke transformacijske procese, kao što su fototransformacija, fotokatalitička transformacija i

kloriranje[24,25,26,27], dok su biotransformacijska istraživanja bila rjeđa i usmjerena samo na roditeljske spojeve[28,29,30].

U istraživanju fotolitičke i fotokatalitičke transformacije metadona u vodenoj otopini djelovanjem sunčeva zračenja, Postigo i suradnici[24] karakterizirali su nekoliko glavnih međuprodukata primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa na temelju vremena leta (UHPLC-Q/ToF MS). Autori su zaključili da istraživani napredni oksidacijski procesi predstavljaju dobru alternativu za dekontaminaciju voda koje sadrže metadon. Abiotičku transformaciju metadona istraživali su i Gonzalez-Marino i suradnici[58] te Hsieh i suradnici[27], koji su pokazali da fotorazgradnjom i kloriranjem vodenih otopina metadona nastaju znatne količine EDDP-a, koji je poznat i kao glavni humani metabolit metadona.

Za razliku od abiotičkih transformacija metadona, literaturni podatci o njegovoj biotransformaciji su vrlo oskudni. Neki autori ukazali su na veoma visoku stabilnost metadona u otpadnim vodama[59,60], dok su druga istraživanja[30,61] sugerirala da se metadon dobro uklanja u kanalizacijskom sustavu. Međutim, pouzdanost spomenutih zaključaka je relativno ograničena jer su ta istraživanja temeljena isključivo na određivanju roditeljskih spojeva.

Mnogo detaljnije istraživanje provedeno je na biotransformaciji kodeina. Wick i suradnici[28] proveli su sveobuhvatno istraživanje biotransformacije kodeina, što je dovelo do identifikacije 18 različitih transformacijskih proizvoda, uključujući kodeinon, 14-hidroksikodeinon, neopin i izoneopin. Ti su transformacijski proizvodi pronađeni i u realnim uzorcima pročišćene otpadne vode. Rúa-Gómez i Püttmann[62] istraživali su fotorazgradnju i biološku razgradnju tramadola i njegovog metabolita *O*-demetil-*cis*-tramadola u površinskim vodama, praćenjem uklanjanja istraživanih spojeva. U provedenim modelnim pokusima određene su srazmjerno niske brzine izravne fotorazgradnje ($\leq 0{,}0027\ h^{-1}$), kao i mikrobne razgradnje ($\leq 0{,}00029\ h^{-1}$). Brzina razgradnje bila je značajno viša ($0{,}0341\ h^{-1}$) u pokusima indirektne fotorazgradnje. Međutim, Bergheim i suradnici[31] su zaključili da bi fototransformacijski proizvodi tramadola mogli predstavljati veći rizik za okoliš od samog roditeljskog spoja jer je inhibicija rasta bakterije *Pseudomonas putida* za tramadol bila 7 %, a za njegove fototransformacijske produkte 22 %.

2.3. Analitičke metode za određivanje opioidnih analgetika u vodenom okolišu

Ubrzani razvoj novih hibridnih analitičkih tehnika posljednjih dvadesetak godina, posebice vezanih sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa, omogućio je snažan razvoj visokospecifičnih metoda za istraživanje pojavnosti i ponašanja znatno šireg spektra organskih zagađivala nego što je to ranije bilo moguće. Taj je napredak bio posebno značajan u području analitike polarnih, termolabilnih i nehlapljivih tvari, što je omogućilo da se otkriju brojni novi tipovi zagađivala (engl. *emerging contaminants*, EC) kao što su, primjerice, aktivne tvari iz farmaceutskih proizvoda te sastojci iz sredstava za osobnu njegu i higijenu. Unatoč tome što u literaturi postoji velik broj analitičkih metoda namijenjenih određivanju tragova farmaceutskih spojeva u okolišu[63,64,65], zbog izrazito velikog broja i raznorodnih kemijskih značajki tih spojeva, i dalje postoji potreba za kontinuiranim razvojem novih metoda s ciljem istraživanja njihova unosa, raspodjele, ponašanja i ekotoksikoloških učinaka u vodenom okolišu.

2.3.1. Prikupljanje i priprava uzoraka

Prilikom prikupljanja uzoraka nužno je osigurati njihovu reprezentativnost te strategiju uzorkovanja adekvatno prilagoditi ciljevima istraživanja. Kada se radi o analizama komunalnih otpadnih voda s ciljem procjene stupnja uklanjanja ili određivanja masene bilance istraživanih spojeva u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda, nužno je prikupljati 24-satne kompozitne uzorke. Međutim, kada to iz tehničkih razloga nije moguće, mogu se prikupiti i trenutni uzorci, ali pri tome treba računati na manju pouzdanost procjena koje proizlaze iz analitičkih rezultata. U prvim preliminarnim istraživanjima u području epidemiologije otpadnih voda 2005. i 2006. godine, Zuccato i suradnici prikupljali su 2-satne kompozitne uzorke[50], dok danas usvojeni protokol predviđa obavezno prikupljanje 24-satnih kompozitnih uzoraka[3,4,13]. Kada je riječ o prikupljanju riječne vode, kompozitno uzorkovanje predstavlja, također, optimalan pristup, međutim, zbog tehničkih ograničenja, najčešće se prikupljaju trenutni uzorci[3,14]. Osim toga, prilikom uzorkovanja na vodotocima posebno treba voditi računa o hidrološkim uvjetima te lokacijama glavnih izvora unosa zagađenja.

Kao alternativnu tehniku prikupljanju kompozitnih uzoraka automatskim uzorkivačem, neki su autori[19,21,66] upotrijebili vremenski-integrirano uzorkovanje uz primjenu diskova sa sorbensima prikladnim za ekstrakciju polarnih organskih tvari (engl. *Polar organic integrative samplers,* POCIS). Pasivno uzorkovanje na polarnim sorbensima predloženo je kao ekonomski isplativa, tehnološki niskozahtijevna te ekološki prihvatljiva tehnika uzorkovanja. Akumulacija analita na sorbense odvija se difuzijom, a nakon određenog vremena izlaganja (najčešće nekoliko dana) analiti se sa sorbensa eluiraju prikladnim otapalom. Određivanje koncentracija ciljanih analita u vodi upotrebom tehnike POCIS nije izravno, već se procjenjuje na temelju akumulirane količine, a sama procjena ovisi o nizu čimbenika koji utječu na difuziju kao što su temperatura, protok, vrsta matrice te biološki obraštaj. Rodayan i suradnici[19] su usporedili masene koncentracije sedam opioida u trenutnim i 24-satnim kompozitnim uzorcima otpadne vode s uzorcima prikupljenim uzorkovanjem tehnikom POCIS i dobili su vrlo slične rezultate, osim za 6-acetilmorfin. Nasuprot tome, Yorgeau i suradnici[21] su izvijestili da su koncentracije tramadola, metadona i EDDP-a u uzorcima prikupljenim pasivnim uzorkovanjem bile sustavno niže nego u kompozitnom 24-satnom uzorku nepročišćene otpadne vode. Autori su zaključili da je složena matrica otpadne vode nepovoljno utjecala na sorpciju analita na POCIS-sorbens. Zbog navedenih problema danas ipak prevladava klasično prikupljanje kompozitnih uzoraka automatskim uzorkivačima.

Ukoliko se uzorci obrađuju istog dana kada se provodi uzorkovanje, tada se najčešće prikupljaju u tamne staklene ili plastične boce te se čuvaju u hladnjaku (T = + 4 °C) do obrade i analize. Međutim, ponekad sve uzorke nije moguće analizirati neposredno nakon uzorkovanja, posebice kada je riječ o velikim kampanjama prikupljanja uzoraka te se u tim slučajevima uzorci najčešće prikupljaju u boce izrađene od polietilentereftalata (PET) te zamrzavaju i čuvaju na – 20 °C do daljnje obrade i analize.

Detaljnu analizu stabilnosti širokog spektra opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata (n = 21) tijekom skladištenja uzoraka proveli su Baker i Kasprzyk-Hordern[67]. Ključni parametri istraživanja bili su temperatura skladištenja (2 °C i 19 °C), vrijednosti pH (1,8 i 7,4) te vrijeme skladištenja (12 h, 24 h, 72 h). Najveći broj obuhvaćenih opioida (kodein, norkodein, oksikodon, dihidrokodein, buprenorfin, norbuprenorfin, metadon i EDDP) bio je vrlo stabilan, čak i u uvjetima originalnog pH i temperature skladištenja od 19 °C (smanjenje do 20 %). Međutim, kod tih je uvjeta uočen

značajan gubitak morfin-3-β-D-glukuronida (80,5 %) uz istovremeno nastajanje morfina. Postojanost opioida u uzorcima značajno se povećala zakiseljavanjem uzoraka te skladištenjem na sniženoj temperaturi (2 °C). Ti rezultati upućuju na važnost odabira uvjeta skladištenja uzoraka za očuvanje integriteta originalnog uzorka, što treba uzeti u obzir i tijekom prikupljanja 24-satnih kompozitnih uzoraka (prikupljanje u uzorkivaču s mogućnošću hlađenja uzoraka).

Prvi korak u obradi uzoraka je njihova filtracija s ciljem uklanjanja suspendiranih čestica (engl. *suspended particulate matter,* SPM) čime se, prije svega, olakšava ekstrakcija na čvrstoj fazi. U skladu s tim, većina koncentracija objavljenih u literaturi odnosi se na otopljene opioide, dok su podatci o opioidima adsorbiranim na suspendiranu tvar znatno rjeđi. Volumen ovisi o tipu uzorka, odnosno očekivanim koncentracijama te je najčešće u rasponu od 50 mL do 1 000 mL.

Postupak priprave tekućeg uzorka prije ekstrakcije može uključivati i podešavanje pH uzorka te dodatak izotopno obilježenih unutarnjih standarada (surogata) koji imaju gotovo identična svojstva kao i analiti te se jednako ponašaju u svim fazama analitičkih postupaka. Na taj se način mogu uspješno kompenzirati mogući gubitci analita tijekom analize kao i promjene intenziteta signala zbog prisustva matrice.

Budući da se opioidni analgetici u okolišnim uzorcima javljaju u relativno niskim koncentracijama, uzorke je prije analize potrebno ukoncentrirati. U tu svrhu se za uzorke vode najčešće primjenjuje ekstrakcija na čvrstoj fazi, pri čemu se uglavnom upotrebljavaju kolonice punjene odgovarajućim sorbensom koji ima sposobnost vezanja ciljanih analita. Izbor sorbensa ovisi ponajprije o svojstvima analita i stoga, prilikom analize velikog broja spojeva različitih fizikalno-kemijskih svojstava, pronalaženje optimalnih uvjeta za ekstrakciju predstavlja poseban izazov. Za ekstrakciju terapijskih opioida iz uzoraka vode najčešće se koriste kolonice punjene sorbensom mješovitog hidrofilno-lipofilnog karaktera, primjerice Oasis HLB. Alternativno, koriste se i kolonice punjene mješovitom fazom koja se sastoji od hidrofobnog polimernog materijala djelomično modificiranog sulfonskim skupinama što omogućavaju jaku kationsku izmjenu (npr. Oasis MCX). Nešto rjeđe se upotrebljavaju i kolonice punjene nepolarnim sorbensom C_{18}.

U posljednje vrijeme za analizu opioida se koristi i automatizirana ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *online SPE*) povezana s analizom LC-MS-om[68,69,70]. Najveće prednosti ove metode su kraće vrijeme priprave uzorka te manji volumeni originalnih uzoraka (od 1 mL do 10 mL)

koji su potrebni za ekstrakciju. Tom tehnikom mogu se postići granice određivanja za morfin, 6-acetilmorfin, oksikodon, kodein, metadon, EDDP i dihidrokodein u rasponu od 0,5 ng L^{-1} do 5,97 ng L^{-1}.

Analitika opioida u čvrstim uzorcima, kao što su suspendirana tvar, aktivni mulj i sediment, podrazumijeva prethodnu ekstrakciju uzoraka organskim otapalom pri čemu se upotrebljavaju različite tehnike, uključujući ekstrakciju pomognutu ultrazvukom, izmućkivanje s otapalom na tresilici te ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju otapalom[16,44.71]. Dobivene ekstrakte najčešće je potrebno dodatno pročistiti pri čemu se u pravilu primjenjuju postupci srodni ekstrakciji na čvrstoj fazi. Kao što je ranije spomenuto, većina literaturnih podataka o analitici opioida odnosi se na otopljenu frakciju, dok su radovi o njihovom određivanju u čvrstim uzorcima okoliša vrlo rijetki. Baker i Kasprzyk-Hordern[71] razvili su najopsežniju metodu za određivanje različitih psihoaktivnih tvari u partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda, koja je obuhvaćala i 21 opioidni analgetik te njihove transformacijske produkate. Kao otapalo za PLE upotrebljavali su smjesu metanola i vode [ψ (CH_3OH, H_2O) = 1 : 1] podešenu na pH 2 dodatkom octene kiseline. Primjenom na realne uzorke ovi su autori utvrdili da se oko 10 % metadona i EDDP-a nalazilo u partikulatnoj frakciji te su ukazali da se udio opioida koji je vezan na suspendirane čestice ne smije zanemariti u sveobuhvatnoj evaluaciji tih spojeva.

2.3.2. Instrumentna analiza

Sve instrumentne tehnike za analizu opioida u okolišnim matricama uključuju dvije sastavnice: kromatografsko odjeljivanje i visokospecifičnu detekciju. Za uspješnu identifikaciju i kvantitativno određivanje u složenim matricama prvo je potrebno provesti što uspješnije odjeljivanje komponenata smjese koja se nalazi u ekstraktu, a zatim selektivno detektirati ciljane analite s visokom osjetljivošću. U analitici polarnih spojeva, uključujući i opioidne analgetike, najčešće se za odjeljivanje primjenjuju tekućinskokromatografske tehnike (engl. *liquid chromatography*, LC), ali za neke manje polarne opioidne spojeve upotrebljavaju se i plinskokromatografske tehnike (engl. *gas chromatography*, GC). Tehnike GC-a imaju značajnu upotrebu u forenzici[72,73]. Prednost tehnika GC-MS je povoljnija cijena instrumentacije te slabiji utjecaj matrice na ionizaciju analita. Međutim, primjena tehnika GC-a u analitici opioidnih analgetika u pravilu uključuje prethodno derivatiziranje uzoraka

koje je često dugotrajno, a ponekad i nedovoljno ponovljivo te može dovesti do neželjenih kontaminacija. Stoga je, od 25 izdvojenih istraživanja (Tablica 5), čiji je predmet bio određivanje opioidnih analgetika u otpadnim i površinskim vodama te u vodi za piće, samo u dva upotrijebljena tehnika GC-MS[11,12].

González-Mariño i suradnici[12] razvili su i primijenili metodu GC-MS za određivanje kodeina, metadona i morfina u nepročišćenoj i pročišćenoj otpadnoj vodi te u riječnoj vodi, dok se metoda pokazala manjkavom za određivanje EDDP-a. Mari i suradnici[11] razvili su metodu za određivanje ukupno triju opioida u otpadnim vodama, uključujući i morfin. Na temelju tih literaturnih podataka može se zaključiti da tehnike GC-MS imaju značajna ograničenja u pogledu primjenjivosti za sveobuhvatnu multirezidualnu analizu opioidnih analgetika.

Stoga su u većini provedenih istraživanja opioidnih spojeva u okolišu primijenjene tehnike LC-MS pri čemu snažno prevladava upotreba tekućinske kromatografije vezane s tandemnom spektrometrijom masa (Tablica 5). Za analizu opioida mogu se upotrijebiti HPLC i UHPLC (engl. *Ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) kolone, punjene različitim nepokretnim fazama. Najučestalija je upotreba kolona HPLC Synergi polar (150 mm x 3 mm, 4 μm) (Tablica 5). U posljednje se vrijeme za analizu okolišnih uzoraka sve češće koristi UHPLC-tehnika[74,75,76] uz upotrebu kolona UHPLC Acquity BEH C_{18} (150 mm x 1 mm, 1,7 μm). Iako su kapitalni troškovi UHPLC-a veći u odnosu na HPLC, dugoročno gledano je primjena UHPLC-a povoljnija zbog kraćeg trajanja analize, što ujedno znači i manju potrošnju otapala koja se koriste za pokretnu fazu[77]. Kao pokretne faze se od organskih otapala najčešće upotrebljavaju acetonitril i metanol uz dodatak mravlje kiseline, octene kiseline te amonijevog formijata.

Nakon kromatografskog odjeljivanja opioidnih analita prisutnih u smjesi slijedi njihova detekcija spektrometrijskim metodama. Iako je UV spektrofotometrija (engl. *Ultraviolet-visible spectrophotometry*) robusna, relativno rasprostranjena i jednostavna tehnika za analizu farmaceutskih spojeva[78], masenospektrometrijske metode postale su dominantne u analizi niskih koncentracija analita u uzorcima sa složenom matricom. Spektrometrija masa s jednim kvadrupolom pokazala se nedovoljno selektivnom te je, u posljednje vrijeme, u potpunosti zamijenjena tandemnom spektrometrijom masa. Tehnike LC-MS/MS imaju niz prednosti u pogledu selektivnosti, osjetljivosti i pouzdanosti. Standardni način rada primjenom tehnika LC-MS/MS je praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija. U tom načinu rada obično se

promatraju po jedan ion-prekursor i dva iona-produkta za svaki analit, odnosno dvije tranzicije. Pri tome prva tranzicija služi za kvantitativno određivanje ciljanih spojeva, dok druga omogućuje dodatnu potvrdu identiteta analita.

Prilikom provođenja analiza masenospektrometrijskim metodama, vrlo je važno odabrati prikladnu tehniku ionizacije, a taj izbor ponajprije ovisi o vrsti uzorka i ciljanim analitima. Za analizu farmaceutskih spojeva, uključujujući opioide, najčešće se primjenjuje ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionisation,* ESI)[15,17,58], a mnogo je rjeđa upotreba alternativnih ionizacijskih tehnika kao što su kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization,* APCI) i fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure photoionisation,* APPI). Jedan od glavnih nedostataka tehnike ESI je visoka osjetljivost na utjecaj matrice, što u konačnici može dovesti do smanjenja ili povećanja signala analita u odnosu na čiste standardne otopine. Kako bi se kompenzirala promjena odziva signala zbog utjecaja matrice, u većini istraživanja se primjenjuje dodatak izotopno obilježenih unutarnjih standarda.

Za kvantitativno određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u okolišnim uzorcima najčešće se kao analizator masa primjenjuje trostruki kvadrupol (engl. *Triple quadrupole,* QqQ)[4,13,14], a nešto rjeđe hibrid kvadrupola i linearne stupice za ione[74] ili analizatora masa temeljenog na vremenu leta (engl. *Quadrupole/Time of Flight,* Q/ToF)[25,26]. Treba naglasiti da se za kvantitativno određivanje najbolji rezultati postižu analizatorima masa s trostrukim kvadrupolom, ali u novije vrijeme sve veću važnost zauzimaju tehnike koje uključuju spektrometriju masa visokog razlučivanja[79,80], koje omogućuju identifikaciju nepoznatih sastojaka na temelju točne mase. Primjena ove tehnike posebno se pokazala korisnom u pretražnim analizama te za identifikaciju novih tipova transformacijskih produkata opioida[10].

U Tablici 5 prikazana je usporedba analitičkih metoda za određivanje opioidnih analgetika dostupnih u literaturi pri čemu su uzeti u obzir način ekstrakcije, primijenjeni volumeni uzoraka, primijenjena instrumentna tehnika, sastav nepokretne i pokretne faze te osnovni pokazatelji kvalitete analitičkog postupka, uključujući granice kvantifikacije i postignuti analitički povrat. Podatci su prikazani za određivanje opioidnih analgetika u otopljenoj i partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda, pročišćenih otpadnih voda, površinskih voda i vodi za piće.

Tablica 5. Usporedba objavljenih metoda za određivanje opioidnih analgetika u nepročišćenim i pročišćenim otpadnim vodama, površinskim vodama te vodi za piće

Matrica	Ciljani spojevi	Ekstrakcija (volumen)	Instrumentna tehnika[ref]	Kolone i pokretne faze	Granica kvantifikacije
Nepročišćena otpadna voda	MOR, OC, 6-AM, HC	SPE (200 mL), Direktna infuzija uzorka (5 μL)	LC-MS/MS[81]	▪13 različitih kolona **A**: *ψ* (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1 **B**: *ψ* (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena otpadna voda (SPE): 0,11 – 7,7 ng L^{-1}, Nepročišćena otpadna voda (direktna infuzija uzorka): 10 – 670 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda	MOR	SPE (1 500 mL)	GC-MS/MS[11]	▪5 % fenil-95 % metilpolisiloksan (5MS) (12 m x 0,2 mm, 0,33 μm debljina filma), helij 99,9999 %	Nepročišćena otpadna voda: 3,7 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	MOR, 6-AM, EM, MTHD, EDDP, COD	Direktna infuzija uzorka (10 μL)	LC-MS/MS[42]	▪ZORBAX Eclipse XDB-C_8 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) **A**: *ψ* (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1 **B**: acetonitril	Nepročišćena otpadna voda: 10 – 70 ng L^{-1}, Pročišćena otpadna voda: 10 – 60 ng L^{-1}, Površinska voda: 2 – 30 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, M3G, 6-AM, MTHD, EDDP	SPE (50 mL)	LC-MS/MS[18]	▪XTerra MS C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 3,5μm) **A**: *ψ* (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 0,5 **B**: acetonitril	Nepročišćena otpadna voda: 0,63 – 5,3 ng L^{-1}, Pročišćena otpadna voda: 0,48 – 3,2 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, 6-AM, MTHD, COD, FNT	SPE (100 – 200 mL)	LC-MS/MS[82]	▪XBridge C_{18} (150 mm x 2,1 mm, 3,5 μm) **A**: *ψ* (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 0,5 **B**: *ψ* (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 0,5	Nepročišćena otpadna voda: 4 – 360 ng L^{-1}, Pročišćena otpadna voda: 2 – 125 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda	COD, DCOD, MOR, 6-AM, MTHD, TRAM, OC, EDDP	SPE (100 – 200 mL)	LC-MS/MS[21]	▪Genesis C_{18} (150 mm x 2,1 mm, 4 μm) **A**: *ψ* (10 mmol L^{-1} amonijev acetat u H_2O, HCOOH) = 1 000:1 **B**: acetonitril	Nepročišćena otpadna voda: 0,01 – 16,8 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda, Voda za piće	COD, DCOD, HC, MTHD, MOR, OC, TRAM	SPE (100 – 1 000 mL)	LC-MS/MS[47]	▪Synergi Polar (150 mm x 3 mm, 4 μm) **A**: acetonitril, **B**: 10 mmol L^{-1} amonijev formijat	Nepročišćena otpadna voda: 10 – 50 ng L^{-1}, Pročišćena otpadna voda: 5 – 25 ng L^{-1}, Površinska voda: 1 – 10 ng L^{-1}, Voda za piće: 1 – 10 ng L^{-1}

Tablica 5. – nastavak

Matrica	Ciljani spojevi	Ekstrakcija (volumen)	Instrumentna tehnika[ref]	Kolone i pokretne faze	Granica kvantifikacije
Nepročišćena otpadna voda, Površinska voda	FNT	SPE (100 mL)	LC-MS/MS[83]	▪Acquity UPLC BEH C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) **A**: ψ (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 1, **B**: 30 mmol L^{-1} HCOOH u amonijevom formijatu	Nepročišćena otpadna voda: 4 ng L^{-1}, Površinska voda: 1,5 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	6-AM, COD, EDDP, MTHD, MOR	SPE (250 mL)	LC-HRMS[3]	▪Kinetex XB-C_{18} (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) **A**: ψ (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1, **B**: ψ (metanol, HCOOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena otpadna voda: 15 – 100 ng L^{-1} Pročišćena otpadna voda: 10 – 120 ng L^{-1} Površinska voda: 1 – 100 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda	MOR, 6-AM, M3G, M6G	Automatska SPE (5 mL)	LC-MS/MS[68]	▪Purospher STAR RP-18 (125 mm x 2,0 mm, 5 μm) **A**: H_2O, **B**: acetonitril	Nepročišćena otpadna voda: 2,7 – 5,97 ng L^{-1}
Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	MOR, COD, 6-AM, FNT	SPE (200 mL)	LC-MS/MS[48]	▪ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) **A**: ψ (10 mmol L^{-1} amonijev acetat u H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1, **B**: ψ (10 mmol L^{-1} amonijev acetat u metanolu, HCOOH) = 1 000 : 1)	Pročišćena otpadna voda: 0,5 – 5 ng L^{-1}, Površinska voda: 0,25 – 3,5 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	COD, MOR, MTHD	SPE (100 – 500 mL)	GC-MS/MS[12]	▪5 % fenil-95 % metilpolisiloksan (HP-5MS) (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm debljina filma) helij 99,9999 %	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda: 4 – 15 ng L^{-1}, Površinska voda: 1 – 13 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	MOR, 6-AM, COD, MTHD, EDDP	Direktno injektiranje uzorka (100 μL)	LC-MS/MS[40]	▪Hydro RP C_{18} (150 mm x 2 mm, 2,5 μm) **A**: ψ (2 mmol L^{-1} amonijev acetat u H_2O, HCOOH) = 1 000 : 2, **B**: acetonitril	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda: 20 ng L^{-1}, Površinska voda: 0,2 – 1 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, 6-AM, MTHD, EDDP, COD	SPE (250 – 500 mL)	LC-MS/MS[2]	▪Synergi polar (150 mm x 3 mm, 4 μm) **A**: ψ (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 1 **B**: ψ (metanol, CH_3COOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda: 0,2 – 53 ng L^{-1}

Tablica 5. – nastavak

Matrica	Ciljani spojevi	Ekstrakcija (volumen)	Instrumentna tehnika[ref]	Kolone i pokretne faze	Granica kvantifikacije
Nepročišćena otpadna voda, Površinska voda	COD, DCOD, EDDP, MOR, MTHD, 6-AM	SPE (100 – 500 mL)	LC-MS/MS[84]	▪Fused-CoreTM Ascentis Expres C_{18} (50 mm x 4,6 mm, 2,7 μm), **A**: CH_3COOH u H_2O (pH = 2,8), **B**: acetonitril	Nepročišćena otpadna voda: 1 – 5 ng L^{-1}, Površinska voda: 0,5 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, MTHD, EDDP, BUP	SPE (250 – 500 mL)	LC-MS/MS[39]	▪XBridge Phenyl (150 mm x 3 mm, 3,5 μm) **A**: acetonitril, **B**: 5 mmol L^{-1} amonijev formijat	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda: 5 – 40 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Površinska voda	6-AM, COD, norCOD, OC, OM, MOR, norMOR, DCOD, BUP, norBUP, MTHD, EDDP, FNT, NFNT, PP, TRAM, *N*-DM-TRAM	SPE (100 mL)	LC-MS/MS[17]	▪Acquity BEH C_{18} (150 mm x 1 mm, 1,7 μm) **A**: *ψ* (H_2O, metanol, CH_3COOH) = 79,7 : 20 : 0,3, **B**: *ψ* (metanol, CH_3COOH) = 99,7 : 0,3	Nepročišćena otpadna voda: 0,6 – 154,2 ng L^{-1}, Površinska voda: 0,5 – 10 ng L^{-1}
Partikulatna frakcija nepročišćene otpadne vode	6-AM, COD, norCOD, OC, OM, MOR, norMOR, DCOD, BUP, norBUP, MTHD, EDDP, FNT, NFNT, PP, TRAM, *N*-DM-TRAM	PLE (100 mL), SPE (500 mL)	LC-MS/MS[71]	▪Acquity BEH C_{18} (150 mm x 1 mm, 1,7 μm) **A**: *ψ* (H_2O, metanol, CH_3COOH) = 79,7 : 20 : 0,3, **B**: *ψ* (metanol, CH_3COOH) = 99,7 : 0,3	Partikulatna frakcija nepročišćene otpadne vode: 0,1 – 2,53 ng g^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, MTHD, EDDP, COD, OC, BUP	SPE (50 mL)	LC-MS/MS[85]	▪Kinetex PFP (50mm x 2,1 mm, 1,7 μm) **A**: *ψ* (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 0,5, **B**: *ψ* (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 0,5	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda: 0,9 – 58,8 ng L^{-1}

Tablica 5. – nastavak

Matrica	Ciljani spojevi	Ekstrakcija (volumen)	Instrumentna tehnika[ref]	Kolone i pokretne faze	Granica kvantifikacije
Nepročišćena otpadna voda	6-AM, COD, EDDP, MTHD, MOR	SPE (100 mL)	LC-MS/MS[86]	▪Phenomenex Gemini – NX C_{18} column (100 mm x 2,0 mm, 3 μm) **A**: 10 mmol L^{-1} amonijev acetat, **B**: ψ (metanol, HCOOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena otpadna voda: 0,3 – 300 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda	MOR, 6-AM, COD	SPE (100 mL)	LC-MS/MS[87]	▪Acquity BEH C_{18} (100 mm x 2.1 mm, 1,7 μm) **A**: 5 mmol L^{-1} amonijev acetat u H_2O, **B**: metanol	Nepročišćena otpadna voda: 5 – 43 ng L^{-1} Pročišćena otpadna voda: 2 – 10 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda	MOR, 6-AM, FNT, EDDP, MTHD, BUP	SPE (100 mL)	LC-HRMS[15]	▪Acquity UPLC HSS C_{18} (150 mm x 2,1 mm, 1,8 μm) **A**: 5 mmol L^{-1} amonijev formijat, **B**: ψ (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena otpadna voda: 0,4 – 187 ng L^{-1}
Površinska voda	COD, norCOD, MTHD, EDDP, TRAM	SPE (500 mL)	LC-MS/MS[14]	▪Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) **A**: ψ (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 1, **B**: ψ (acetonitril, CH_3COOH) = 1 000 : 1	Površinska voda: 0,18 – 3,54 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda	COD, HC, HM, 6-AM, MOR, NHC, OC, OM	SPE	LC-MS/MS[79]	▪Synergi polar (150 mm x 3 mm, 4 μm) **A**: ψ (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1, **B**: ψ (acetonitril, HCOOH) = 1 000 : 1	Nepročišćena otpadna voda: 625 ng L^{-1}
Nepročišćena otpadna voda, Pročišćena otpadna voda, Površinska voda	COD, FNT, OC, HC, HMOR, BUP, 6-AM, MOR, MTHD	SPE (100 – 200 mL)	LC-MS/MS[4]	▪Force Biphenyl (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μm) **A**: ψ (H_2O, HCOOH) = 1 000 : 1, **B**: metanol	Nepročišćena i pročišćena otpadna voda, površinska voda: 0,5 – 16 ng L^{-1}

MOR – morfin, **OC** – oksikodon, **6-AM** – 6-acetilmorfin, **HC** – hidrokodon, **EM** – etilmorfin, **MTHD** – metadon, **EDDP** – 2-etildien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin, **COD** – kodein, **M3G** – morfin-3-β-D-glukuronid, **FNT** – fentanil, **DCOD** – dihidrokodein, **TRAM** – tramadol, **OC** – oksikodon, **M6G** – morfin-6-β-D-glukuronid, **norCOD** – norkodein, **OM** – oksimorfon, **norMOR** – normorfin, **BUP** – buprenorfin, **norBUP** – norbuprenorfin, **NFNT** – norfentanil, **PP** – propoksifen, ***N*-DM-TRAM** – *N*-demetil-*cis*-tramadol, **HMOR** – hidromorfon, **SPE** – ekstrakcija na čvrstoj fazi, **PLE** – ubrzana visokotlačna ekstrakcija otapalom, **LC** – tekućinska kromatografija, **GC** – plinska kromatografija, **MS** – spektrometrija masa, **HRMS** – spektrometrija masa visokog razlučivanja

Iz Tablice 5 vidi se da postoje velike razlike između metoda objavljenih u literaturi, kako u pogledu kvalitete i pouzdanosti analitičkih postupaka, tako i u pogledu njihove prikladnosti za rutinsku primjenu. Iz prikazanih podataka sumarno se može zaključiti da je vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa prikladna tehnika za visokospecifičnu i osjetljivu analizu opioidnih analgetika u vodenim okolišnim uzorcima.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za analitičko određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u ovom istraživanju korištene su referencijske tvari proizvođača Lipomed AG (Švicarska) čiji popis je prikazan u Tablici 6. Pojedinačne otopine pripravljene su u metanolu čistoće za LC-MS te su masene koncentracije otopina analita bile 1 g L^{-1}, dok su masene koncentracije izotopno obilježenih surogata bile 0,1 g L^{-1}.

Tablica 6. Referencijske tvari korištene za analitičko određivanje opioidnih analgetika

Naziv spoja	**Kratica**	**Čistoća / %**
Analiti (γ = 1 g L^{-1})		
Morfin-3-β-D-glukuronid	M3G	> 98,5
Normorfin	norMOR	> 98,5
Morfin-6-β-D-glukuronid	M6G	> 98,5
Dihidromorfin	DMOR	> 98,5
Morfin	MOR	> 98,5
Oksimorfon	OM	> 98,5
Hidromorfon	HM	> 98,5
Norkodein	norCOD	> 98,5
Dihidrokodein	DCOD	> 98,5
O-demetil-*cis*-tramadol	*O*-DM-TRAM	> 98,5
Kodein	COD	> 98,5
Noroksikodon	NOC	> 98,5
Norhidrokodon	NHC	> 98,5
Oksikodon	OC	> 98,5
6-Acetilmorfin	6-AM	> 98,5
Hidrokodon	HC	> 98,5
Etilmorfin	EM	> 98,5
Norfentanil	NFNT	> 98,5
Tramadol	TRAM	> 98,5
N-demetil-*cis*-tramadol	*N*-DM-TRAM	> 98,5
Norbuprenorfin	norBUP	> 98,5
Fentanil	FNT	> 98,5
Buprenorfin	BUP	> 98,5
2-etilidien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin	EDDP	> 98,5
Propoksifen	PP	> 98,5
Sufentanil	SFNT	> 98,5
Metadon	MTHD	> 98,5

Tablica 6. - nastavak

Naziv spoja	Kratica	Čistoća / %
Izotopno obilježeni surogati (γ = 0,1 g L^{-1})		
Morfin-3-β-D-glukuronid-d_3	M3G-d^3	> 98,0
Morfin-d_3	MOR-d^3	> 98,5
Oksimorfon-d_3	OM-d^3	> 98,5
Hidromorfon-d_3	HM-d^3	> 98,5
Dihidrokodein-d_3	DCOD-d^3	> 98,5
Kodein-d_3	COD-d^3	> 98,5
Norhidrokodon-d_3	NHC-d^3	> 98,0
Oksikodon-d_6	OC-d^6	> 98,5
6-Acetilmorfin-d_3	6-AM-d^3	> 98,5
Hidrokodon-d_3	HC-d^3	> 98,5
Norfentanil-d_5	NFNT-d^5	> 98,5
Tramadol-O-Cd_3	TRAM-O-Cd^3	> 98,5
Norbuprenorfin-d_3	norBUP-d^3	> 98,5
Fentanil-d_5	FNT-d^5	> 98,5
Buprenorfin-d_4	BUP-d^4	> 98,5
2-etilidien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin-d_3	EDDP-d^3	> 98,5
Propoksifen-d_5	PP-d^5	> 98,5
Sufentanil-d_5	SFNT-d^5	> 98,5
Metadon-d_3	MTHD-d^3	> 98,5

Uz referencijske tvari u ovom istraživačkom radu korištene su i sljedeće kemikalije:

- Metanol, čistoća za LC-MS, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Metanol, čistoća za HPLC, VWR, BDH Prolabo (UK)
- Acetonitril, čistoća za LC-MS, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Ultračista voda, Elix-Milli-Q system, Millipore, Bedford (MA, SAD)
- Amonijak, vodena otopina, 25 %, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Bezvodna otopina amonijaka, u metanolu, 7 mol L^{-1}, ThermoFisher (Kandel, Njemačka)
- Fenol, čistoća ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Octena kiselina, čistoća za LC-MS, Fluka (Buchs, Švicarska)
- Mravlja kiselina, čistoća za LC-MS, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Mravlja kiselina, čistoća ≥ 96 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Fosforna kiselina, čistoća 85 %, Fluka (Buchs, Švicarska)
- Sumporna kiselina, čistoća 95 – 97 %, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Argon 5.0, φ > 99,999 %, Messer Croatia Plin (Zaprešić, Hrvatska)
- Dušik 5.0, φ > 99,999 %, Messer Croatia Plin (Zaprešić, Hrvatska)
- Kisik 2.6, φ > 99,5 %, Messer Croatia Plin (Zaprešić, Hrvatska)

- Sintetski zrak, φ (O_2) = 20 %, φ (N_2) = 80 %, Messer Croatia Plin (Zaprešić, Hrvatska)
- Amonijev acetat, čistoća za LC-MS, Fluka (Bushs, Švicarska)
- Amonijev formijat, čistoća ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Tramadol, čistoća ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin (EMDP), čistoća ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Etilendiamintetraoctena kiselina, natrijev dihidrat (Na_2EDTA x 2 H_2O), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Glukoza, čistoća ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Amonijev klorid, čistoća > 99,5 %, Fluka (Buchs, Švicarska)
- Natrijev sulfit, čistoća ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Kalijev fosfat, čistoća ≥ 99,5 %, Fluka (Buchs, Švicarska)
- Kalijev hidrogenfosfat, čistoća > 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka).

3.1.2. Otopine

Izvorne standardne otopine analita opioidnih analgetika masenih koncentracija 1 g L^{-1} te izotopno obilježenih surogata masenih koncentracija 0,1 g L^{-1} prenesene su iz staklenih ampula Pasteurovom pipetom u bočice s navrtnim čepom volumena 2 mL (Supelco, Bellefonte, SAD) te su pohranjene na - 20 °C.

Iz izvornih standardnih otopina analita pripravljena je smjesa analita masene koncentracije 10 mg L^{-1} u metanolu čistoće za LC-MS za sve pojedinačne opioidne sastojke. Iz te početne otopine opioidne smjese pripravljene su radne otopine u metanolu masenih koncentracija 1 mg L^{-1} i 0,1 mg L^{-1}. Svaki put, neposredno prije instrumentnih analiza, iz radnih su otopina, pripravljane svježe standardne otopine za konstruiranje umjerne krivulje pri čemu je sastav otapala standardnih otopina [ψ (H_2O, CH_3OH) = 8 : 2] uz dodatak 50 mmol L^{-1} amonijevog acetata bio prilagođen početnim kromatografskim uvjetima. Standardne otopine za konstruiranje umjerne krivulje pripravljene su u koncentracijskom rasponu od 0,5 μg L^{-1} do 1 500 μg L^{-1}.

Na sličan način, iz pojedinačnih izvornih otopina izotopno obilježenih surogata pripravljena je u metanolu čistoće za LC-MS smjesa svih surogata masene koncentracije 2 mg L^{-1}. Alikvot tako pripravljane otopine dodan je u okolišne uzorke prije njihove obrade te

u standardne otopine za konstruiranje umjerne krivulje, tipično u količini od 30 ng (15 μL x 2 ng μL^{-1}) svakog pojedinog izotopno obilježenog surogata.

Prilikom analiza medija iz pokusa biološke razgradnje i ozoniranja, koji su sadržavali povišene koncentracije opioida, analize su provedene izravnim injektiranjem medija. Osnovne otopine tramadola (γ = 10 g L^{-1}), metadona, EDDP-a i EMDP-a (γ = 1 g L^{-1}) za te analize pripravljane su otapanjem točnih odvaga spomenutih čistih tvari u metanolu čistoće za LC-MS. Standardne otopine za kvantitativnu analizu u tim su pokusima pripravljene u koncentracijskom rasponu od 20 μg L^{-1} do 2 500 μg L^{-1}, s tim da je kao otapalo poslužila vodena otopina 50 mmol L^{-1} amonijevog formijata radi što bolje prilagodbe otapalu u kojem su bili uzorci.

U uzorke dobivene u pokusima ozoniranja dodana je otopina natrijeva sulfita, molarne koncentracije 8,33 mmol L^{-1} u četverostrukom višku radi uklanjanja zaostalog ozona. Pokusi ozoniranja provedeni su u fosfatnom puferu pripravljenom u čistoj vodi, pri čemu je vrijednost pH medija (pH = 5, 7, 8 i 9) podešena različitim omjerima kalijeva fosfata i kalijeva dihidrogenfosfata.

Referencijska otopina Leucin-Enkefalina (Leu-Enk) za umjeravanje Q/ToF MS-a, pripravljena je kod masene koncentracije 2 mg L^{-1}. Za analize u negativnom ionizacijskom polaritetu, točna odvaga čistog Leu-Enk otopljena je u smjesi ultračiste vode i acetonitrila čistoće za LC-MS [ψ (H_2O, C_2H_3N) = 1 : 1], dok je za snimanje u pozitivnom polaritetu ionizacije otopina pripravljena na isti način, uz dodatak mravlje kiseline [ψ (H_2O, C_2H_3N = 1 : 1, HCOOH) = 100 : 1].

3.1.3. Pribor

Svi uzorci otpadnih voda prikupljeni su u polietilenske boce volumena 1 L, dok su uzorci riječne vode prikupljeni u tamne staklene boce volumena 2,5 L.

Za pripravu radnih otopina te dodatak izotopno obilježenih surogata opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih proizvoda korištene su automatske pipete s promjenjivim nastavcima (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka).

Direktna infuzija otopina opioidnih analgetika za optimizaciju instrumentne analitičke metode načinjena je pomoću injekcijske šprice volumena 0,5 mL (Hamilton, Reno, Nevada,

SAD), dok je infuzija Leucin-Enkefalina tijekom analiza upotrebom sustava UPLC-Q/ToF MS postignuta primjenom injekcijske šprice istog proizvođača volumena 10 mL.

Za filtraciju uzoraka otpadne i riječne vode upotrebljen je stakleni vakuumski uređaj, uz primjenu filtara sa staklenim vlaknima (GF/D) promjera 47 mm te veličine pora 2,7 μm (Whatman, Springfield, UK).

U preliminarnim pokusima optimizacije postupka ekstrakcije tekućih uzoraka korištene su kolonice Oasis HLB (Waters, Milford, SAD) volumena 6 mL koje sadrže 200 mg polimernog punjenja. Za ekstrakcije tekućih uzoraka na čvrstoj fazi upotrijebljene su kolonice Oasis MCX (Waters, Milford, SAD) koje sadržavaju 150 mg polimernog punjenja, ukupnog volumena 6 mL. U svrhu pročišćavanja ekstrakata pokusa biološke razgradnje za ekotoksikološku karakterizaciju upotrijebljene su kolonice Oasis HLB (punjenje 60 mg, volumen 3 mL, Waters, Milford, SAD). Za pročišćavanje partikulatne frakcije aktivnog mulja upotrijebljene su kolonice Strata NH_2 (Phenomenex, Torrance, California, SAD) volumena 3 mL s 200 mg polimernog punjenja.

Referencijske tvari su pohranjene u tamnim bočicama s navrtnim čepom volumena 2 mL (Supelco, Bellefonte, SAD). U svim eksperimentima upotrijebljeno je stakleno laboratorijsko posuđe koje je prethodno oprano kromsumpornom kiselinom, isprano ultračistom vodom, osušeno u sušioniku na 200 °C, a neposredno prije analiza isprano organskim otapalom visoke čistoće te osušeno u struji dušika. Smjese otopina analita i izotopno obilježenih surogata pripravljene su u staklenim bočicama s navrtnim čepom zaštićenim teflonskom brtvom volumena 4 mL (Supelco, Bellefonte, SAD). Ekstrakti u modelnim pokusima stabilnosti opioida prikupljeni su i čuvani u staklenim bočicama s navrtnim čepom volumena 7 mL (Supelco, Bellefonte, SAD).

Za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju otapalom korišteni su celulozni filtri D 28 promjera 1,98 cm (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, SAD) koji su stavljeni na dno metalnih ćelija, dok je prazan prostor ćelija popunjen inertnim punilom Hydromatrix (ChemTube, Agilent, Kalifornija, SAD). Za optimizaciju postupka filtracije konačnih ekstrakata prije instrumentnih analiza, korišteni su sljedeći filtri: regenerirani celulozni filtri (promjer 30 mm, veličina pora 0,45 μm, ThermoFisher Scientific, SAD), filtri sa staklenim vlaknima (promjer 30 mm, veličina pora 0,70 μm, ThermoFisher Scientific, SAD), polietersulfonski filtri (promjer 17 mm, veličina pora 0,45 μm, ThermoFisher Scientific, SAD), politetrafluoroetilen filtri (promjer 30 mm, veličina pora 0,45 μm, ThermoFischer Scientific, SAD),

polivinildienski filtri (promjer 17 mm, veličina pora 0,45 μm, ThermoFischer Scientific, SAD), polipropilenski filtri (promjera 17 mm, veličina pora 0,45 μm, ThermoFischer Scientific, SAD), filtri PTFE Minispike (promjer 13 mm, veličina čestica 0,2 μm, Waters, SAD) te politetrafluoroetilenski filtri (promjer 17 mm, veličina pora 0,45 μm) na injekcijsku špricu volumena 1 mL (Hamilton, Reno, Nevada, SAD).

Pokusi biološke razgradnje tramadola i metadona provedeni su u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 50 mL koje su prethodno sterilizirane.

Spektrofotometrijska mjerenja ozona provedena su kivetnim testovima LCK 310 za određivanje klora / ozona / klordioksida (Hach Lange, Düsseldorf, Njemačka). Radni koncentracijski raspon mjerenja ozona bio je od 0,05 mg L^{-1} do 2,0 mg L^{-1}. Uzorci pokusa ozoniranja izuzeti su u polietilenske bočice s navrtnim čepom volumena 4 mL.

Ultrazvučne ekstrakcije opioidnih analgetika iz uzoraka sedimenta provedene su u plastičnim epruvetama s konusnim dnom volumena 50 mL (Falcon, Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka).

3.1.4. Uređaji i instrumentacija

Tijekom eksperimentalnog rada upotrijebljeni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga ALC 201,4 (Acculab, Bradford, SAD)
- Tehnička vaga PB 3002 (Delta Range, Metler Toledo, SAD)
- Ultrazvučna kupelj Branson 3800 (Missouri, SAD)
- Vakuumski uređaj za višestruko propuštanje uzoraka s nastavkom za sušenje (Supelco, Bellefonte, SAD)
- Uređaj za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju otapalom ASE 200 (Dionex corporation, Sunnyvale, SAD)
- Uređaj za uparavanje u struji dušika (Turbovap, Caliper Life Science, Hopkinton, Massachusetts, SAD)
- Laboratorijska tresilica Edmunt Bühler GmbH (Bodelshausen, Njemačka)
- Rotacijska laboratorijska tresilica Innova 2300, New Brunswick (New York, SAD)
- Generator ozona Ozotech Inc. (Yreka, SAD)
- pH sonda s konusnim završetkom BlueLine (SI Analytics GmbH, Mainz, Njemačka)
- Laboratorijska centrifuga SIGMA 3-16 (SciQuip, UK)

- Uređaj za proizvodnju ultračiste vode (Elix-Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, SAD)
- Spektrofotometar Varian Cary 50 probe UV-Visible Spectrophotometer (Walnut Creek, Kalifornija, SAD)
- Spektrofotometar DR 3900 (Hach Lange, Düsseldorf, Njemačka)
- Liofilizator Labconco (Kansas City, Missouri, SAD).

Analize opioidnih spojeva načinjene su upotrebom dvaju tipova instrumenata LC-MS/MS.

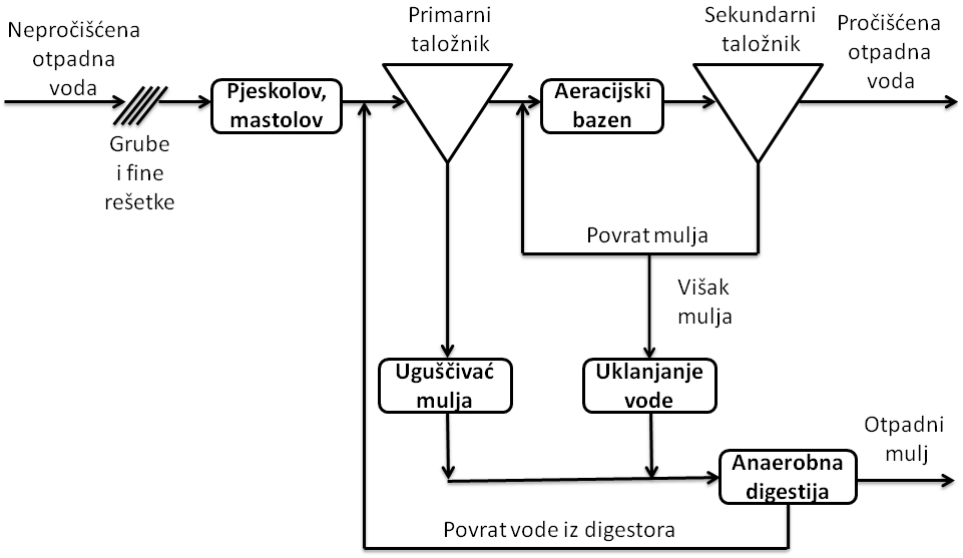
- Za analize uzoraka prirodnih i otpadnih voda upotrijebljen je vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (Thermo Electron Corporation, San Jose, SAD). LC dio mjernog instrumenta se sastojao od kvarterne visokotlačne crpke (Surveyor MS Pump) opremljene uređajem za uklanjanje plinova i automatskog injektora s grijačem kolone (Surveyor autosampler). Kao detektor poslužio je spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (TSQ Quantum AM), opremljen ionskim izvorom za ionizaciju elektroraspršenjem. Tijekom rada, ovaj sustav LC-MS/MS bio je opremljen sljedećim HPLC-kolonama : Synergi Polar (4 μm, 150 mm x 3 mm, Phenomenex, SAD), Gemini C_{18} (5 μm, 150 mm x 3 mm, Phenomenex, SAD), YMCPro C_{18} (3 μm, 150 mm x 2,1 mm, YMC Europe, Njemačka) i ACE C_{18}-PFP (3 μm, 150 mm x 3 mm, Advanced Chromatography Technologies Ltd, UK).

- Za analizu uzoraka iz modelnih pokusa koji su sadržavali povišene koncentracije opioida te za identifikaciju nepoznatih sastojaka upotrijebljen je vezani sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti Waters Acquity UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, SAD) i tandemnog spektrometra masa koji je uključivao analizator visokog razlučivanja temeljen na mjerenju vremena leta (Q/ToF Premier instrument; Waters Micromass, Manchester, UK). Sustav UPLC sastojao se od binarne visokotlačne pumpe te automatskog injektora, a bio je opremljem UPLC-kolonama (100 x 4 mm) s nepokretnom fazom BEH C_{18} (Waters Corp., Milford, SAD). Ionizacija sastojaka u ionskom izvoru prije analize u masenom analizatoru načinjena je elektroraspršenjem.

3.2. Uzorkovanje otpadnih i prirodnih voda

3.2.1. Prikupljanje uzoraka otpadne vode u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba

Istraživanje ponašanja opioida u otpadnim vodama načinjeno je u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba (CUPOVZ) koji je shematski prikazan na Slici 2. CUPOVZ je klasični konvencionalni uređaj za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda maksimalnog kapaciteta od 1,2 milijuna ekvivalenata stanovnika (ES) koji uključuje mehaničku obradu (grube rešetke, pjeskolov, mastolov i primarni taložnik) te biološku obradu u postupku s aktivnim muljem (aeracijski bazen i sekundarni taložnik). Opremljen je automatskim uzorkivačima za prikupljanje kompozitnih 24-satnih uzoraka nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda koje se uzorkuju svakih 15 minuta (V = 220 mL) u polietilenske boce smještene u termostatiranom prostoru (T = 4 °C). Osim pročišćavanja vode, u uređaju se odvija i obrada mulja koji nastaje miješanjem primarnog mulja i viška mulja u aeracijskim bazenima te uključuje zgušnjavanje i anaerobnu digestiju. Pročišćena otpadna voda ispušta se u gradski odvodni kanal (GOK) te rijeku Savu, a stabilizirani mulj odlaže se na deponij. U ovom radu pozornost je posvećena prvenstveno procesima tijekom pročišćavanja vodene faze.



Slika 2. Shematski prikaz Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba

Istraživanja u CUPOVZ-u su provedena u razdoblju od 4 godine (od 15. 01. 2017. do 15. 12. 2020.). Plan uzorkovanja uključivao je prikupljanje 1 L 24-satnih kompozitnih uzoraka nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda u polietilenske boce koje su do laboratorija

transportirane u prijenosnim hladnjacima. Tijekom cijelog razdoblja, uzorkovanje je provođeno učestalošću od dva puta mjesečno (osim u travnju 2020.), nedjeljom i utorkom. Na taj način prikupljeno je ukupno 188 uzorka nepročišćene i pročišćene otpadne vode koji su bili obrađeni unutar 4 sata od dovršetka prikupljanja kompozitnih uzoraka.

Dodatno, istraživanje je uključilo i dvokratno uzorkovanje 24-satnih kompozitnih uzoraka nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda tijekom 7 uzastopnih dana (od 21. 03. 2017. do 27. 03. 2017. te od 13. 03. 2018. do 19. 03. 2018.). Uzorci prikupljeni u sedmodnevnim kampanjama uzorkovanja su zamrznuti u polietilenskim bocama na - 20 °C do dana obrade i analize.

Stupanj uklanjanja opioidnih analgetika u promatranom uređaju izražen u postocima izračunat je na temelju razlike masenih koncentracija analita u pročišćenoj u odnosu na nepročišćenu komunalnu otpadnu vodu.

Kako bi se ispitala zastupljenost opioida u patrikulatnoj suspendiranoj frakciji otpadnih voda, tijekom 2019. godine prikupljeno je ukupno 24 uzorka (V = 1 L) u razdoblju od 12. 01. 2019. do 09. 12. 2019. godine. Uzorci su profiltrirani unutar 1 sata nakon uzorkovanja te su filtri zamrznuti do dana obrade i analize.

Uzorci otopljene i suspendirane frakcije aktivnog mulja (V = 2 L) zagrabljeni su i pohranjeni u polietilenskim bocama na 4 °C do analize. Prikupljanje uzoraka provedeno je 04. 06. 2018., 08. 06. 2020. te 20. 06. 2020.

3.2.2. Prikupljanje uzoraka rijeke Save i njenih pritoka

Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata sustavno je istražena na odsječku rijeke Save od slovenske granice (Otok Samoborski) do Siska u ukupno 10 terenskih izlazaka. U dvije kampanje, prikupljanje uzoraka prošireno je na odsječak rijeke Save od Ljubljane do Siska. Uzorkovanje je provedeno na način da se pokrije čitav godišnji hidrološki ciklus. Osim toga, uzorkovanje riječne vode bilo je usklađeno s istovremenim praćenjem glavnih unosa otpadnih voda na promatranom segmentu rijeke Save. U Tablici 7 prikazani su datumi i postaje (u nizvodnom smjeru) na kojima je provedeno uzorkovanje rijeke Save (Šentjakob (S 1), Jevnica (S 2), Brežice (S 3), Otok Samoborski (S 4), Jankomir (S 5), Petruševec (S 6), Oborovo (S 7) i Sisak (S 8)) te njenih pritoka (Gradna (P 1) i Krapina (P 2)).

Tablica 7. Postaje te datumi uzorkovanja rijeke Save i njenih pritoka

Postaja	Oznaka	Koordinate	24.05. 2017.	12.07. 2017.	29.11. 2017.	18.12. 2017.	27.03. 2018.	25.04. 2018.	27.06. 2018.	11.07. 2018.	18.09. 2018.	20.11. 2018.
Šentjakob	S 1	46°05'04.4"N 14°34'57.5"E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Jevnica	S 2	46°05'16.7"N 14°40'42.1"E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Brežice	S 3	45°53'52.6"N 15°35'32.1"E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Otok S.	S 4	45°50'35.2"N 15°43'43.8"E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gradna	P 1	45°50'11.9"N 15°45'37.8"E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Krapina	P 2	45°49'56.1"N 15°49'19.1"E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Jankomir	S 5	45°47'36.9"N 15°51'10.1"E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Petruševec	S 6	45°46'15.8"N 16°04'21.8"E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oborovo	S 7	45°41'11.5"N 16°14'48.8"E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sisak	S 8	45°26'48.5"N 16°25'05.2"E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Otok S. – Otok Samoborski

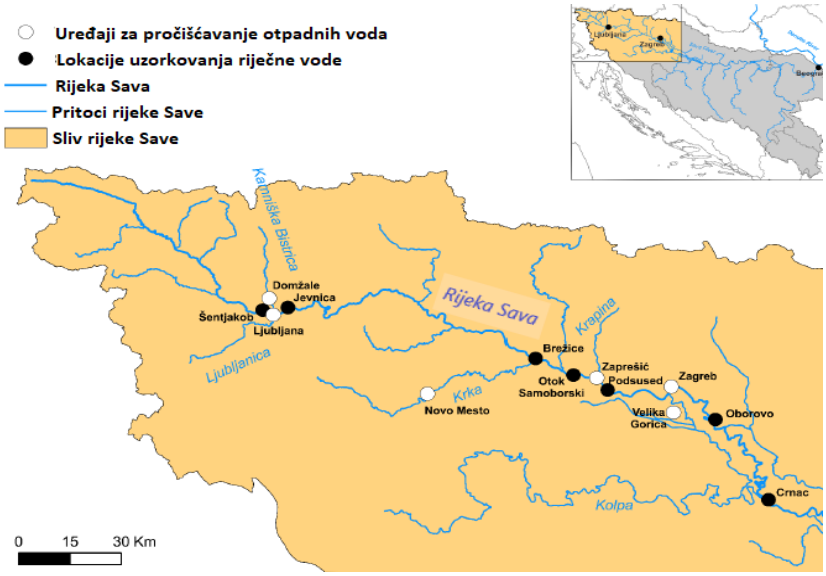
Prikupljeni uzorci riječne vode bili su trenutni (uzorkovanje s obale, uzorci su zagrabljeni te pohranjeni u zatamnjene staklene boce volumena 2 L), dok su uzorci otpadne vode, osim onih iz Zaprešića, bili 24-satni kompozitni. Uzorci efluenata otpadnih voda prikupljeni su u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) u Ljubljani, Domžale-Kamniku, Novom Mestu, Zaprešiću, Zagrebu i Velikoj Gorici, čiji efluenti se ulijevaju u rijeku Savu na istraživanom odsječku. Treba napomenuti da svi uređaji na kojima su prikupljeni sekundarni efluenti, osim onog u Zaprešiću, uključuju biološko pročišćavanje otpadnih voda. U Tablici 8 prikazane su lokacije, kapaciteti izraženi u ekvivalentima stanovnika, vrste pročišćavanja te hidrauličko vrijeme zadržavanja otpadnih voda na UPOV-ima čiji su efluenti prikupljeni.

Tablica 8. Karakteristike uređaja za pročišćavanje otpadnih voda na kojima su prikupljeni uzorci tijekom prikupljanja uzoraka rijeke Save i njenih pritoka

Lokacija	**Kapacitet / ES**	**Vrsta pročišćavanja**	**Hidrauličko vrijeme zadržavanja / h**
Ljubljana	360 000	Mehaničko i biološko	18
Domžale-Kamnik	149 000	Mehaničko i biološko	16
Novo Mesto	55 000	Mehaničko i biološko	22
Zaprešić	60 000	Mehaničko	24
Zagreb	1 200 000	Mehaničko i biološko	10 – 12
Velika Gorica	35 000	Mehaničko i biološko	20

ES – ekvivalent stanovnika

Na Slici 3 prikazane su postaje na kojima je uzorkovana rijeka Sava te lokacije uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Sloveniji i Hrvatskoj.



Slika 3. Lokacije uzorkovanja rijeke Save i efluenata uređaja za pročišćavanje otpadnih voda[88]

Osim uzoraka vode, na postajama Otok Samoborski, Jankomir, Oborovo i Crnac prikupljeni su i uzorci sedimenta rijeke Save (datum uzorkovanja 24. 05. 2017.). Uzorkovanje je provedeno s obale, grabljenjem lopaticom u polietilenske vrećice te su uzorci do laboratorija transportirani u prijenosnom hladnjaku.

3.3. Metode

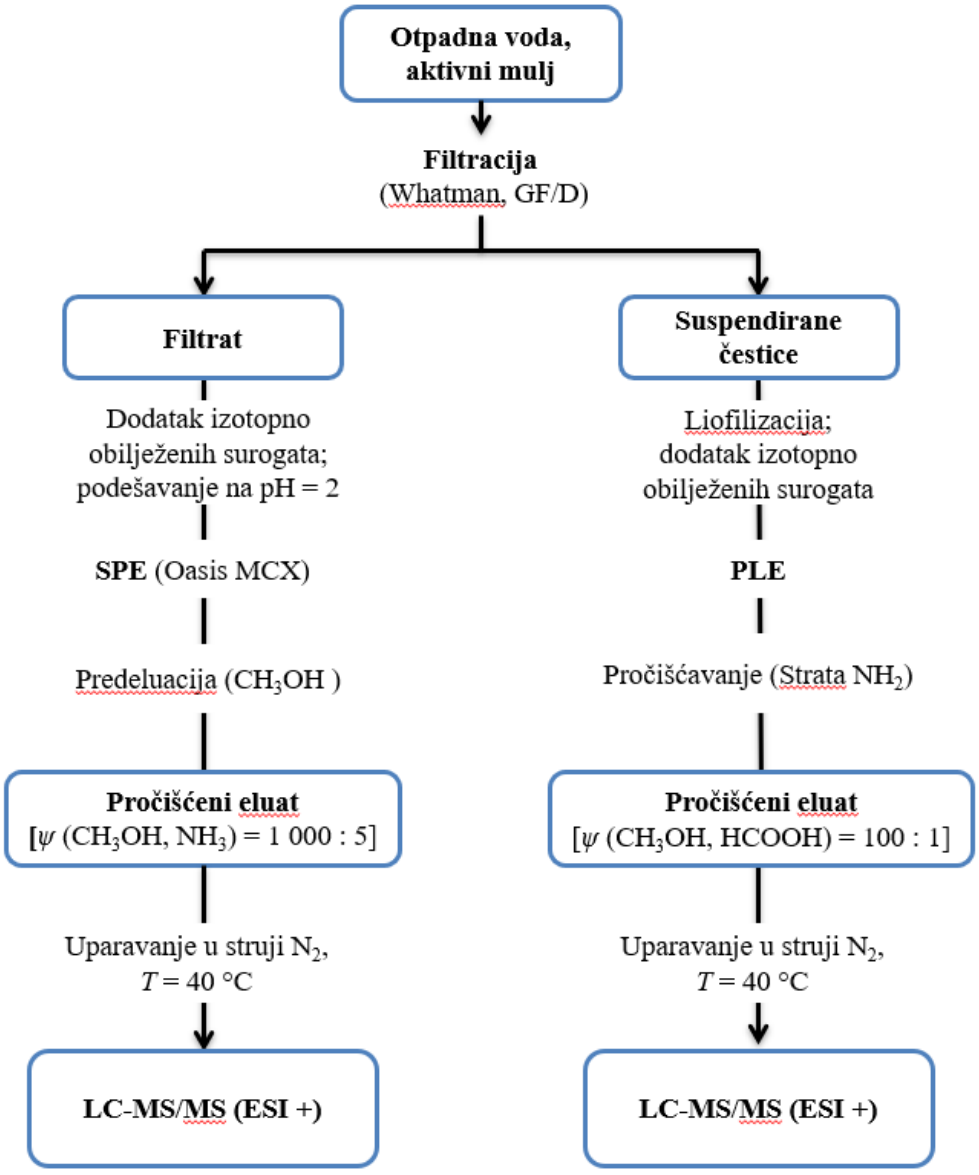
3.3.1. Određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih proizvoda u okolišnim uzorcima

Analitički postupci za određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u okolišnim uzorcima prikazani su na Slici 4. Protokol generalno obuhvaća tri osnovna koraka, a to su predobrada uzoraka filtracijom, ukoncentriravanje analita primjenom odgovarajuće ekstrakcijske tehnike te instrumentna analiza primjenom sustava LC-MS/MS.

Redosljed provođenja pojedinih koraka prilikom analize otopljene i partikulatne frakcije dosta su slični, a najvažnija razlika odnosi se na fazu ekstrakcije te dodatno pročišćavanje

ektrakata čvrstih uzoraka nepročišćene otpadne vode i aktivnog mulja propuštanjem kroz kolonice punjene slabim anionskim izmjenjivačem (Strata NH_2).

Treba napomenuti da je protokol za analizu sedimenta vrlo sličan protokolu za analizu suspendiranog materijala iz otpadne vode i aktivnog mulja te se razlikuje samo u fazi priprave uzorka i izostanku proćišćavanja ekstrakta.



Slika 4. Shematski prikaz protokola za određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u otopljenoj i suspendiranoj frakciji otpadnih voda i aktivnog mulja

3.3.1.1. Ekstrakcija tekućih uzoraka i obrada ekstrakata

Ekstrakcija svih tekućih uzoraka provedena je primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi prema protokolu prikazanom na Slici 4. Volumeni uzoraka otopljene frakcije nepročišćenih otpadnih voda i aktivnog mulja bili su 125 mL, pročišćenih otpadnih voda 250 mL, a riječne vode 500 mL. Svi su uzorci, prije ekstrakcije, profiltrirani kroz GF/D filtre (Whatman) promjera 47 mm, veličine pora 2,7 μm primjenom vakuumskog sustava za filtraciju. Kao matrica za slijepu probu postupka te za modelne pokuse određivanja analitičkog povrata prilikom validacije metode korištena je izvorska voda.

Poslije filtracije, u otopljenu frakciju svakog uzorka dodano je po 30 ng izotopno obilježenih surogata te je nakon ekvilibracije u trajanju od 15 minuta pH podešen na 2 dodatkom koncentrirane fosforne kiseline.

Za obogaćivanje otopljenih opioidnih spojeva u uzorcima otpadnih i prirodnih voda primijenjene su kolonice punjene miješanim sorbensom Oasis MCX (200 mg, volumen 6 mL). Kolonice su prije nanošenja uzoraka kondicionirane s 5 mL metanola, 5 mL ultračiste vode te 5 mL 25 mmol L^{-1} fosforne kiseline. Brzina propuštanja uzoraka (približno 5 mL min^{-1}) regulirana je ventilom na vakuumskom uređaju za višestruko propuštanje uzoraka. Nakon ukoncentriravanja opioida na SPE-sorbensu, kolonice su isprane sa 6 mL ultračiste vode, kako bi se uklonile interferirajuće soli iz matrice, a potom su osušene u struji dušika (φ > 99,999 %) u trajanju od 30 minuta. Kolonice su nakon sušenja dodatno isprane sa 6 mL metanola radi uklanjanja dijela koekstrahiranih tvari te su pohranjene na - 20 °C do dana analize.

Na dan instrumentne analize, kolonice su odmrznute i temperirane na sobnu temperaturu te gravitacijski eluirane sa 6 mL amonijačnog metanola [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5]. Eluati su upareni do suha u struji ekstračistog dušika pri temperaturi od 40 °C, a suhi ostatak otopljen u odgovarajućem volumenu (0,5 mL za otpadne vode i aktivni mulj; 0,1 mL za riječnu vodu) u smjesi vode i metanola [ψ (H_2O, CH_3OH) = 8 : 2] uz dodatak 50 mmol L^{-1} amonijevog acetata, uz pospješivanje desorpcije analita sa staklenih stijenki epruveta pomoću vibracijskog homogenizatora. Tako dobiveni završni ekstrakti preneseni su Pasteurovom pipetom u bočice s navrtnim čepom volumena 2 mL i septumom dizajniranim za automatski injektor te analizirani uređajem LC-MS/MS s trostrukim kvadrupolom.

Svi uzorci nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda koji su prikupljeni u okviru redovitog godišnjeg monitoringa (nedjelja i utorak), obrađeni su unutar 4 sata od uzorkovanja,

dok su uzorci prikupljeni tijekom sedmodnevnih kampanja uzorkovanja čuvani u zamrzivaču (- 20 °C) u polietilenskim bocama do dana analize. Uzorci su odmrznuti na dan ekstrakcije laganim zagrijavanjem u vodenoj kupelji pri temperaturi od 33 °C. Uzorci riječne vode obrađeni su neposredno nakon prikupljanja, odnosno unutar 24 sata, a do tada su skladišteni u tamnim bocama na temperaturi od + 4 °C.

3.3.1.2. Ekstrakcija čvrstih uzoraka i obrada ekstrakata

Za ekstrakciju svih čvrstih uzoraka, uključujući liofilizirane uzorke suspendirane tvari prikupljene filtracijom (filtar GF/D) nepročišćene otpadne vode (V = 375 mL) i aktivnog mulja (V = 60 mL) te homogenizirane i usitnjene uzorke riječnog sedimenta (m = 1 g), osušenog na zraku, upotrijebljena je ubrzana visokotlačna ekstrakcija otapalom. Prije ekstrakcije, u uzorak je dodano 30 ng izotopno obilježenih surogata. Nakon ekvilibracije od 30 min, čvrsti uzorci su preneseni u ekstrakcijsku ćeliju i prekriveni inertnim punilom. Kao otapalo za ekstrakciju upotrijebljen je bezvodni amonijak u metanolu [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5], a ekstrakcija je načinjena na temperaturi od 80 °C pri tlaku od 103,4 bara u jednom ciklusu u ukupnom trajanju od 15 minuta bez predzagrijavanja ćelije. Vrijeme grijanja ćelije na 80 °C bilo je 5 minuta, trajanje statičke faze 10 minuta, a vrijeme eluiranja 1 minutu uz volumen ispiranja od 60 % volumena ćelije.

Dobiveni ekstrakti (V ~ 15 mL) preneseni su u staklene epruvete za uparavanje te upareni u struji dušika do približno 6 mL. U tako uparene ekstrakte dodano je 60 µL koncentrirane mravlje kiseline te je sadržaj homogeniziran primjenom vibracijskog homogenizatora. Zakiseljeni ekstrakti pročišćeni su propuštanjem kroz prethodno kondicionirane kolonice Strata NH_2 (200 mg punila, volumen 3 mL). Kondicioniranje kolonica provedeno je s ukupno 4 mL zakiseljenog metanola [ψ (CH_3OH, HCOOH) = 100 : 1]. Nakon prolaska ekstrakta kolonica je dodatno isprana s 2 mL zakiseljenog metanola kojim su prethodno isprane stijenke epruvete, u kojoj je bio sakupljen ekstrakt. Udruženi eluati s kolonice (ukupnog volumena oko 8 mL) tretirani su u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 5 min kako bi se pospješila desorpcija analita i surogata sa stijenki. Tako pročišćeni ekstrakti upareni su do suha u struji dušika pri temperaturi od 40 °C.

Otapanje suhog ostatka provedeno je u 1 mL zakiseljene smjese vode i metanola [ψ (H_2O, CH_3OH : HCOOH) = 100 : 1] s dodatkom 50 mmol L^{-1} amonijevog acetata, uz pospješivanje

desorpcije analita i surogata u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 15 minuta. Završni ekstrakti filtrirani su kroz PTFE-filtre (promjer 17 mm, veličina čestica 0,45 μm), preneseni Pasteurovom pipetom u bočicu od 2 mL s navrtnim poklopcem i analizirani uređajem LC-MS/MS s tri kvadrupola. U analizi slabo opterećenih riječnih sedimenata može se ispustiti korak pročišćavanja na kolonicama Strata NH_2.

3.3.1.3. Analiza opioidnih analgetika i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Za analizu opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u okolišnim uzorcima upotrijebljen je sustav LC-MS/MS s 3 kvadrupola koji je opisan ranije (poglavlje 3.1.4.).

U ranoj fazi razvoja metode najprije je analizom standardnih otopina opioida provedena optimizacija kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta za analizu uzoraka pri čemu su testirane 4 različite kolone s obrnutom fazom (poglavlje 3.1.4.) te različite kombinacije pokretnih faza i eluacijskih gradijenata.

Za daljnji rad je odabrana HPLC-kolona Synergi Polar, a odjeljivanje je provedeno u gradijentnom načinu rada s binarnim sustavom otapala za eluaciju. Pokretna faza A bila je voda uz dodatak octene kiseline [ψ (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 1], dok je pokretna faza B bio metanol uz dodatak octene kiseline [ψ (CH_3OH, CH_3COOH) = 1 000 : 1]. Protok pokretne faze bio je 0,4 mL min^{-1}, a temperatura kolone 25 °C. Uvjeti kod kojih je provedena gradijentna eluacija prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Uvjeti gradijentne eluacije analita na koloni Synergi Polar

Vrijeme / min	Pokretna faza A (φ / %)	Pokretna faza B (φ / %)
0	90	10
20	50	50
21	35	65
26	15	85
31	12	88
32	5	95
33	5	95
34	90	10
44	90	10

A – ψ (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 1, **B** – ψ (CH_3OH, CH_3COOH) = 1 000 : 1

Za analizu ciljanih spojeva upotrijebljena je ionizacija elektroraspršenjem, a detekcija je provedena u pozitivnom ionizacijskom polaritetu. Napon kapilare bio je 3 500 V, a temperatura 300 °C. Kao pomoćni plin za desolvataciju i elektroraspršenje upotrijebljen je dušik, dok je kao kolizijski plin upotrijebljen argon (0,2 Pa).

Identifikacija i kvantitativno određivanje opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata provedeno je praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija pri čemu su za svaki ispitivani analit i izotopno obilježeni surogat praćene po dvije tranzicijske reakcije (Tablica 12). Prva tranzicija korištena je za kvantitativnu analizu, dok je druga tranzicija služila za dodatnu potvrdu. Uvjeti snimanja na spektrometru masa za svaki su analit i surogat optimizirani podešavanjem kolizijskih energija te napona na otvoru leće.

Za kvantitativnu analizu opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata primijenjena je metoda unutarnjeg standarda uz upotrebu izotopno obilježenih surogata. Sve kvalitativne i kvantitativne analize provedene su upotrebom programa Xcalibur 2.0.5.

3.3.2. Analiza opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih proizvoda u modelnim pokusima razgradnje

Kvalitativne i kvantitativne analize roditeljskih spojeva te njihovih transformacijskih produkata formiranih u pokusima biološke razgradnje i ozoniranja provedene su uređajem UPLC-Q/ToF koji je opisan ranije (poglavlje 3.1.4.) pri čemu su analize provedene i u pozitivnom i u negativnom ionizacijskom polaritetu.

Za kromatografsko odjeljivanje upotrijebljena je UPLC-kolona Acquity BEH C_{18} (1,7 μm, 50 x 2,1 mm, Waters), a eluacija analita provedena je binarnim gradijentnim eluiranjem, kao što je prikazano u Tablici 10. U pozitivnom polaritetu ionizacije kao pokretne faze korišteni su voda i acetonitril uz dodatak mravlje kiseline u oba eluensa (ψ = 1 000 : 1), dok su u negativnom polaritetu ionizacije upotrebljavane iste pokretne faze bez dodatka kiseline.

Tablica 10. Sastav pokretne faze za analizu tramadola i metadona te njihovih razgradnih produkata vezanim sustavom UPLC-Q/ToF MS

Vrijeme / min	Pokretna faza A (φ / %)	Pokretna faza B (φ / %)
1	95	5
8	50	50
8,5	5	95
10	5	95

A – ψ (H_2O, CHOOH) = 1 000 : 1, **B** – ψ (CH_3CN, CHOOH) = 1 000 : 1

Za desolvataciju i raspršenje primijenjen je dušik (protok od 700 L h^{-1}) pri temperaturi od 300 °C, a argon kao kolizijski plin. Temperatura ionskog izvora bila je podešena na 120 °C. U pozitivnom ionizacijskom polaritetu napon kapilare bio je 3 500 V, a u negativnom 3 000 V. Analize su provedene u rasponu *m*/*z* od 50 Da do 1 000 Da uz kolizijsku energiju od 4 eV. Svi spektri masa snimljeni su uz primjenu opcije proširenog dinamičkog raspona. Vrijeme skeniranja bilo je 0,08 s, a vrijeme međuskeniranja 0,02 s. Kako bi se osigurala točnost i ponovljivost određivanja vrijednosti *m*/*z,* sve analize provedene su uz kontinuirani unos referencijske tvari (Leucin-Enkefalin). Identifikacija formiranih transformacijskih produkata provedena je na temelju određivanja točne mase i MS/MS-eksperimenata uz primjenu različitih kombinacija kolizijskih energija i napona u ionskom izvoru (engl. *sample cone voltage*).

Prije instrumentne analize, uzorci medija iz pokusa biološke razgradnje su razrijeđeni 5 do 10 puta u amonijevom formijatu (50 mmol L^{-1}). Kvantitativna analiza provedena je upotrebom vanjskog umjeravanja. Standardne otopine za konstruiranje umjerne krivulje pripravljene su u 50 mmol L^{-1} amonijevom formijatu u rasponu koncentracija od 0,02 mg L^{-1} do 2,5 mg L^{-1}. U slučaju kada referencijske tvari za pojedine spojeve nisu bile dostupne, provedena je semikvantitativna analiza, uz pretpostavku da su molarni odzivi roditeljskog spoja i formiranog transformacijskog produkta bili jednaki. Sve kvalitativne i kvantitativne analize provedene su upotrebom programa MassLynx 4.1.

3.4. Validacija analitičkih metoda

Validacija metode za određivanje terapijskih opioida i njihovih transformacijskih produkata u okolišnim uzorcima uključila je određivanje područja linearnosti, granica detekcije, granice kvantitativnog određivanja, analitičkih povrata ekstrakcije, utjecaja matrice te točnosti metode. Svi validacijski pokusi provedeni su u kvadriplikatu.

Linearnost metode za određivanje opioidnih analgetika u okolišnim uzorcima određena je injektiranjem 12 standardnih otopina u masenom koncentracijskom rasponu analita od 0,5 μg L^{-1} do 1 500 μg L^{-1} uz dodatak izotopno obilježenih surogata od 15 μg L^{-1}. Masene koncentracije analita u standardnim otopinama redom su bile 0,5 μg L^{-1}, 1 μg L^{-1}, 2 μg L^{-1}, 5 μg L^{-1}, 10 μg L^{-1}, 30 μg L^{-1}, 50 μg L^{-1}, 100 μg L^{-1}, 200 μg L^{-1}, 500 μg L^{-1}, 1 000 μg L^{-1},

1 500 μg L^{-1}. Linearnost je prema preporukama IUPAC-a (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) potvrđena F-testom uz razinu pouzdanosti od 95 %. Linearnost metode kojom su određeni tramadol i metadon te njihovi razgradni produkti formirani u pokusima razgradnje određena je konstruiranjem umjerne krivulje koja se sastojala od 8 točaka te su masene koncentracije injektiranih standardnih otopina bile 20 μg L^{-1}, 50 μg L^{-1}, 100 μg L^{-1}, 250 μg L^{-1}, 500 μg L^{-1}, 1 000 μg L^{-1}, 2 000 μg L^{-1}, 2 500 μg L^{-1}.

Granica određivanja opioida primjenom sustava HPLC-MS/MS definirane su kao minimalne koncentracije ciljanih analita u standardnim otopinama koje se mogu izmjeriti i ispunjavaju sljedeće kriterije: odstupanje od umjerne krivulje je manje od 25 % do 30 %, prihvatljiv oblik kromatografskog pika, omjer intenziteta odziva signala i šuma (S / N) manji je od 8, a relativna standardna devijacija (engl. *Standard deviation*, SD) niža od 20 %, uzimajući u obzir točnost metode te volumen uzorka za svaku matricu. Granica detekcije metode korištena za određivanje opioida primjenom UPLC-Q/ToF MS-a određena je kao točka najniže masene koncentracije umjerne krivulje.

Instrumentne granice detekcije određene su višestrukim injektiranjem standardnih otopina niskih koncentracija sve dok omjer signala i šuma nije bio oko 3.

Analitički povrati opioidnih analgetika za pojedine faze analitičkog postupka određeni su u modelnim eksperimentima metodom standardnog dodatka. Iznosi analitičkog povrata su dobiveni usporedbom odziva analita u modelnim uzorcima u koje su analiti dodani prije i nakon istraživanog postupka. Dodatak opioida u nepročišćenu otpadnu vodu bio je 1 μg L^{-1} (pojedinačna koncentracija), u pročišćenu otpadnu vodu 500 ng L^{-1}, a u riječnu vodu 50 ng L^{-1}. Kod validacije metoda za određivanje opioida u čvrstim uzorcima, dodatak pojedinih analita bio je 50 ng po uzorku za suspendiranu frakciju nepročišćene otpadne vode i sediment te 30 ng po uzorku za aktivni mulj. Odzivi analiziranih opioida, određeni u ekstraktima uzoraka obogaćenih prije (A_{pe}) i nakon ekstrakcije (A_e), umanjeni su za odzive tih analita u originalnim uzorcima (A_{orig}) te su analitički povrati ekstrakcije izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Analitički povrati ekstrakcije } (\%) = \frac{A_{pe} - A_{orig}}{A_e - A_{orig}} \text{ x } 100$$

Točnost metoda određena je u modelnim pokusima u kojima su različiti tipovi uzoraka dodatno obogaćeni točnim dodatcima analita i njihovih izotopno obilježenih surogata. U uzorke nepročišćene otpadne vode dodano je 1 μg L^{-1}, u uzorke pročišćene otpadne vode

500 ng L^{-1}, a u riječnu vodu 50 ng L^{-1} analita opioida, dok je dodatak izotopno obilježenih unutarnjih standarda u sve uzorke bio 15 ng. U uzorke partikulatne frakcije nepročišćene otpadne vode i sedimenta dodano je 50 ng smjese analita opioida, a u uzorke čvrste frakcije aktivnog mulja 30 ng, dok je dodatak izotopno obilježenih unutarnjih standarda u sve uzorke bio 30 ng. U modelnom pokusu analizirani su i originalni uzorci kako bi se napravila korekcija za analite koji su prisutni u neobogaćenim uzorcima. Točnost metode određena je prema jednadžbi:

$$\text{Točnost (\%)} = \frac{\gamma_2 - \gamma_1}{\gamma_0} \text{ x } 100$$

u kojoj je γ_0 nominalna koncentracija opioida u uzorku, γ_2 koncentracija analita u uzorcima nakon obogaćivanja, a γ_1 nativna koncentracija opioida u originalnom uzorku.

Preciznost metode u analitičkim metodama za određivanje opioida izražena je kao relativna standardna devijacija određivanja koncentracije analita u obogaćenim uzorcima u kvadriplikatu, i to za slučaj kad je analiza obuhvaćala cjelokupni analitički postupak.

Utjecaj matrice, odnosno supresija ili povećanje intenziteta odziva signala, određen je usporedbom srednje vrijednosti intenziteta signala analita dodanih u ekstrakt dobiven nakon ekstrakcija i uparavanja (Ae) sa srednjom vrijednošću odziva analita u standardnoj otopini (A_{STD}) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Utjecaj matrice (\%)} = \frac{A_e - A_{orig} - A_{STD}}{A_{STD}} \text{ x } 100$$

Standardni dodatci bili su u tom pokusu identični kao u pokusu kad su analiti dodani u originalni uzorak. Prisutnost ciljanih spojeva u originalnim uzorcima (A_{orig}) uzeta je u obzir prilikom izračuna utjecaja matrice na odziv intenziteta signala.

Ponovljivost instrumentne analize izražena je kao relativna standardna devijacija kontrolne standardne otopine koncentracije 2 mg L^{-1} koja je injektirana nakon svakih 10 do 12 analiziranih uzoraka.

3.5. Određivanje stabilnosti opioidnih analgetika u uzorcima i ekstraktima

Kako bi se ispitala stabilnost opioidnih analgetika tijekom potencijalnog skladištenja uzoraka otpadnih voda, proveden je modelni pokus u ukupnom trajanju od 100 dana. Pokus je proveden u uzorku nepročišćene otpadne vode podrijetlom s CUPOVZ-a. Nepročišćena otpadna voda filtrirana je primjenom sustava za filtraciju kroz filtre sa staklenim vlaknima (GF/D, 47 mm, 2,7 μm) te je filtrat obogaćen dodatkom 1 μg L^{-1} smjese analita opioidnih analgetika. Takav uzorak je homogeniziran i razdijeljen na 5 jednakih poduzoraka. Prvi poduzorak obrađen je odmah u triplikatu standardnim protokolom za određivanje opioidnih analgetika koji uključuje ekstrakciju na čvrstoj fazi, uparavanje te instrumentnu analizu. Ostala 4 poduzorka čuvana su u zamrzivaču (- 20 °C) 7, 30, 70 i 100 dana te nakon toga odmrznuta i obrađena na isti način kao i prvi poduzorak. Svi pokusi provedeni su u triplikatu.

U drugom modelnom pokusu ispitivana je stabilnost opioidnih analgetika nakon ekstrakcije za dva načina skladištenja: a) skladištenjem (- 20 °C) kolonica Oasis MCX sa sorbiranim analitima odmah nakon sušenja (u tom slučaju kolonice se eluiraju tek na dan instrumentne analize) te b) skladištenjem (- 20 °C) ekstrakata dobivenih eluacijom kolonica odmah nakon propuštanja uzoraka vode (ekstrakt se odmrzava tek na dan instrumentne analize). Pokus je proveden na modelnom uzorku koji je pripravljen dodatkom opioida (γ = 1 μg L^{-1}) u 800 mL ultračiste vode. Uzorak je potom homogeniziran te razdijeljen na 15 poduzoraka volumena 50 mL. U svaki poduzorak dodano je po 15 ng izotopno obilježenih surogata. Svi uzorci su zakiseljeni na vrijednost pH 2 dodatkom koncentrirane fosforne kiseline te ekstrahirani na kolonicama Oasis MCX. Tri su poduzorka eluirana, uparena i analizirana na dan provedbe pokusa (0-ti dan). Ostalih 12 uzoraka je razdijeljeno u dva seta, jedan za pohranu u sorbiranom obliku, a drugi u obliku eluata (ekstrakata). U ovom pokusu uskladišteni uzorci su analizirani nakon 7 i 30 dana. Svi su pokusi provedeni u triplikatu.

3.6. Modelni pokusi razgradnje odabranih opioidnih analgetika

U modelnim laboratorijskim pokusima istražena je razgradnja dvaju odabranih opioidnih analgetika, tramadola i metadona, pri čemu je detaljno proučeno njihovo ponašanje tijekom mikrobne razgradnje i ozoniranja. Osim kinetike i stupnja uklanjanja roditeljskih spojeva, u ovim je pokusima praćeno i formiranje transformacijskih produkata te je načinjena njihova identifikacija upotrebom sustava UPLC-Q/ToF MS.

3.6.1. Adaptacija kultura za pokuse biološke razgradnje tramadola i metadona

Modelni pokusi biološke razgradnje provedeni su na rotacijskoj laboratorijskoj tresilici pomoću adaptiranih mikrobnih kultura podrijetlom s CUPOVZ-a. Početna kultura aktivnog mulja uzeta je iz aeracijskog bazena (masena koncentracija suspendiranih čestica 3,5 g L^{-1}).

Kao osnovni medij u pokusima biološke razgradnje upotrijebljena je tekuća mineralna podloga čiji je sastav prikazan u Tablici 11. Najprije je pripravljen medij koji je sadržavao fosfatni pufer i kvaščev ekstrakt te je steriliziran u autoklavu na temperaturi od 120 °C (t = 20 min), a zatim je u njega dodana 10 %-tna otopina soli koja je prethodno profiltrirana kroz sterilini filtar (veličina pora 0,2 μm).

Tablica 11. Sastav mineralne podloge upotrijebljene u modelnim pokusima biološke razgradnje

Sastav podloge		**Otopina soli**		**Dodatni izvori ugljika i dušika**	
K_2HPO_4	γ = 4,4 g L^{-1}	$MgSO_4$ x 7 H_2O	γ = 19,5 g L^{-1}	NH_4Cl	γ = 170 mg L^{-1}
KH_2PO_4	γ = 1,7 g L^{-1}	$MnSO_4$ x 4 H_2O	γ = 6,6 g L^{-1}		
		$FeSO_4$ x 7 H_2O	γ = 1 g L^{-1}	$C_6H_{12}O_6$	γ = 1 g L^{-1}
Kvaščev ekstrakt	γ = 50 mg L^{-1}	$CaCl_2$ x 6 H_2O	γ = 0,447 g L^{-1}		
		Konc. H_2SO_4	Nekoliko kapi		

Selekcija mikrobnih vrsta koje imaju sposobnost razgradnje / transformacije tramadola provedena je dugotrajnim (~ 12 mjeseci) višestrukim precjepljivanjem mješovite kulture u mineralnom mediju koji je sadržavao visoku koncentraciju tramadola (γ = 20 mg L^{-1}). Obogaćivanje mikrobne kulture provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 50 mL, u koje je najprije dodan tramadol (γ = 20 mg L^{-1}) u obliku otopine u metanolu. Metanol je

prije dodatka tekuće podloge otparen kako bi se izbjegao mogući utjecaj metanola na rast biomase. Nakon otparavanja metanola, u Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 30 mL podloge koja je bila nacijepljena s 3 mL kulture aktivnog mulja. Nakon nacjepljivanja, u podlogu su dodani amonijev klorid i glukoza u omjeru ugljika i dušika C : N = 10 : 1.

Tikvice su smještene na rotacijskoj laboratorijskoj tresilici čija je brzina rotacije podešena na 9 279 g u termostatiranom prostoru u kojem je temperatura održavana na 30 °C. Svakih 7 do 10 dana, 10 % mikrobne kulture je izuzeto i nacijepljeno na 30 mL svježe podloge obogaćene tramadolom, a daljnji uzgoj nastavljen je kod istih uvjeta. Sposobnost kulture za razgradnju tramadola istražena je periodično nakon 2, 4, 7, 8 i 12 mjeseci praćenjem promjena koncentracije roditeljskog spoja i pojave transformacijskih proizvoda u mediju pomoću pretražne tehnike UPLC-Q/ToF MS (analiza uzoraka u ukupnoj ionskoj struji (*m*/*z* od 50 Da do 1 000 Da) uz primjenu pozitivnog i negativnog ionizacijskog polariteta).

Mikrobna kultura koja je na prethodno opisani način adaptirana na povišene koncentracije tramadola, pokazala je i umjerenu sposobnost uklanjanja metadona (33 %) te je, na način prethodno opisan za tramadol, naknadno adaptirana na povišenu koncentraciju metadona (γ = 10 mg L^{-1}). Međutim, u pokusima s metadonom koncentracija glukoze bila je 0,5 g L^{-1}, a amonijevog klorida 100 mg L^{-1}. Postupak naknadne adaptacije trajao je 4 mjeseca, uz povremeno testiranje stupnja eliminacije metadona i pojave transformacijskih proizvoda u mediju. Tako adaptirane mješovite kulture upotrijebljene su za provedbu pokusa biološke razgradnje.

3.6.2. Modelni pokusi biološke razgradnje tramadola i metadona

Inokulum za pokuse biološke razgradnje pripreman je trodnevnim uzgojem adaptirane mikrobne kulture u optimiziranom mediju (C : N = 10 : 1) koji je sadržavao tramadol (γ = 20 mg L^{-1}), odnosno metadon (γ = 10 mg L^{-1}). Inokulum je izdvojen centrifugiranjem (8 944 g; t = 5 min) i nacijepljen u svježi medij (V = 30 mL). Svi nacijepljeni mediji su kao dodatni izvor dušika sadržavali amonijev klorid, a polovica ih je kao dodatni izvor ugljika sadržavao i glukozu. Početni omjer ugljika i dušika u tikvicama koje su sadržavale amonijev klorid i glukozu bio je približno 10 : 1.

U pokusu biorazgradnje metadona načinjena je i modifikacija osnovnog postupka na način da je nakon 2 dana u jednu od 2 tikvice ponovo dodan amonijev klorid kako bi se istražio mogući utjecaj dostupnosti dušika na kinetiku razgradnje.

Pokusi biološke razgradnje provedeni su na tresilici kod uvjeta ranije opisanih za postupak adaptacije kultura. Svi su pokusi provedeni u duplikatu u trajanju od 14 dana i uključivali su abiotičku kontrolu (nenacijepljena podloga koja je sadržavala 20 mg L^{-1} tramadola, odnosno 10 mg L^{-1} metadona).

Tijekom 14 dana trajanja pokusa, u svakoj je vremenskoj točci (0., 1., 2., 3., 4., 6., 7., 9., 11. i 14. dan) izuzet po 1 mL uzorka za analizu UPLC-Q/ToF MS-om. Uzorci su centrifugirani na 8 944 g te je bistri supernatant zamrznut na - 20 °C do dana analize. Osim koncentracije roditeljskih spojeva i formiranih transformacijskih produkata, praćen je i rast biomase na temelju mjerenja optičke gustoće (λ = 600 nm), a u pokusu biološke razgradnje tramadola određena je i koncentracija glukoze. Na početku i na kraju eksperimenta, izuzeto je po 5 mL uzorka za ekotoksikološku analizu.

Koncentracija glukoze u uzorcima biološke razgradnje tramadola određena je spektrofotometrijski, metodom s fenolom i sumpornom kiselinom[89].

Brzina uklanjanja roditeljskog spoja određena je na temelju kinetičkog modela prvog reda prema sljedećoj jednadžbi:

$$c(t) = c_0 \, \mathrm{x} \, \mathrm{e}^{(-kt)}$$

u kojoj je c (t) koncentracija tramadola, odnosno metadona u vremenu t, c_o početna koncentracija tramadola, odnosno metadona na početku eksperimenta, k konstanta brzine reakcije (d^{-1}), a t vrijeme razgradnje izraženo u danima. Konstanta brzina razgradnje određena je linearnom regresijom metodom najmanjeg kvadrata u kojoj je točnost određivanja potvrđena pomoću koeficijenta determinacije (r^2). Vrijeme polurazgradnje ($t_{1/2}$) izračunato je primjenom sljedeće jednadžbe:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

3.6.3. Modelni pokusi ozoniranja tramadola i metadona

Modelni pokusi ozoniranja tramadola i metadona provedeni su u polietilenskoj menzuri volumena 250 mL u koju je ozon uvođen pomoću difuzora. U generatoru ozona, kisik iz sintetskog zraka prevođen je u ozon. U slučajevima kada je bilo potrebno proizvesti više od

0,2 mg L^{-1} ozona, za njegovu je proizvodnju korišten komprimirani kisik 99,5 %-tne čistoće. Pokusi ozoniranja odabranih opioidnih analgetika provedeni su pri masenim koncentracija ozona od 0,05 mg L^{-1}, 0,2 mg L^{-1} i 0,5 mg L^{-1}.

Pokusi su provedeni u različitim matricama, uključujući čistu vodu, fosfatne pufere različitih vrijednosti pH (pH = 5, 7, 8 i 9) i kompozitni 24-satni uzorak pročišćene otpadne vode (sekundarni efluent) koji je sakupljen 27. 09. 2017. u CUPOVZ-u.

Svi pokusi provedeni su na način da je u odabranoj matrici postignuta željena koncentracija ozona koja je provjerena spektrofotometrijski pomoću kivetnih testova (LCK 310, Hach Lange). Osim toga, prije i nakon provedbe pokusa, izmjereni su pH te vodljivost medija. Kada su svi željeni uvjeti bili postignuti, u matricu je dodano 2 mg L^{-1} tramadola, odnosno metadona. Promjena koncentracije istraživanih opioida praćena je izuzimanjem uzoraka (V = 2 mL) u odabranim vremenskim razmacima: 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 1,5 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 7 min i 10 min. Uzorci su izuzeti u polipropilenske bočice s navrtnim čepom volumena 4 mL u koje je, prije izuzimanja uzoraka, prethodno dodano po 20 µL 8,33 mmol L^{-1} Na_2SO_3 koji služi za prekid reakcije. U bočice s uzorkom je dodano i po 100 µL 1 mol L^{-1} amonijeva formijata te je sadržaj bočice dobro homogeniziran. Nulti uzorci (t = 0 min) pripravljeni su na način da je u matricu dodana otopina promatranog opioida (γ = 2 mg L^{-1}) te je difuzorom umjesto ozona uvođen zrak, odnosno kisik. Uzorak je izuzet približno nakon 1 minute, odnosno kada je postignuta dobra homogenizacija sustava. Svi uzorci su odmah nakon provedbe pokusa zamrznuti i pohranjeni na - 20 °C do dana analize. Analiza UPLC-Q/ToF MS-om načinjena je u odmrznutim uzorcima bez prethodnog razrjeđivanja.

3.6.4. Određivanje toksičnosti za alge

Uzorci medija iz pokusa biološke razgradnje tramadola i metadona, koji su izuzeti na početku i kraju provedbe pokusa analizirani su testom toksičnosti za alge. Prije testa, uzorke je bilo potrebno pripraviti na način da se uklone preostale soli koje interferiraju s testom. Postupak pročišćavanja proveden je na kolonicama Oasis HLB (60 mg, 3mL) koje su prethodno kondicionirane s po 3 mL metanola i ultračiste te izvorske vode. Nakon obogaćivanja opioida na sorbensu, soli su uklonjene ispiranjem s 3 mL ultračiste vode, a zatim su adsorbirani analiti

eluirani s 2 mL metanola. Metanol je uparen u uparivaču u struji dušika pri temperaturi od 40 °C te je suhi ostatak otopljen u 0,5 mL medija ISO / FDIS 8 692.

Ekotoksikološka analiza medija koji je sadržavao tramadol i metadon te njihove transformacijske produkate provedena je *in vivo* primjenom testa toksičnosti za alge *Desmodesmus subspicatus* (86.81 SAG). Kultura algi uzgojena je u mediju ISO / FDIS 8 692 u prisutnosti hranjivih soli na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Stanice algi prvo su transportirane iz tekuće kulture u mikroploču s 96 jamica kapaciteta 2 x 10^4 stanica / jamici. Serijska razrjeđenja (γ (TRAM) = 0,1 – 20 mg L^{-1}; γ (MTHD) = 0,1 – 15 mg L^{-1}) uzoraka pokusa biološke razgradnje pripravljena su u mediju za rast algi, a potom su dodani u jamice mikroploča s algama. Deionizirana voda korištena je kao negativna, a kalijev dikromat kao pozitivna kontrola provođenja pokusa. Inicijalna gustoća algi na početku pokusa određena je mjerenjem fluorescencije staničnog pigmenta klorofila a (λ / λ = 440 / 680 nm) uz pomoć čitača za mikroploče. Alge su potom inkubirane u prisutnosti testnih uzoraka 96 sati na sobnoj temperaturi te je nakon inkubacije ponovno određena gustoća algi.

Ovom metodom određena je prosječna specifična stopa rasta iz koje je potom izračunata inhibicija algi u odnosu na kontrolnu skupinu algi koja nije izlagana testiranim ekstraktima (negativna kontrola), odnosno u odnosu na nulte uzorke izuzete prilikom pokusa biološke razgradnje (pozitivna kontrola).

3.7. Određivanje raspodjelnih koeficijenata

Određivanje raspodjelnih koeficijenata opioidnih analgetika između između tekuće i čvrste frakcije aktivnog mulja načinjeno je u modelnim pokusima provedenim u kvadriplikatu na tresilici. Kao modelni uzorak korišten je aktivni mulj uzet iz aeracijskog bazena CUPOVZ-a (uzorkovanje 04. 06. 2018.).

Pokus je proveden u polipropilenskoj boci volumena 250 mL koja je sadržavala 120 mL aktivnog mulja uz dodatak smjese opioida koja je sadržavala po 240 ng svakog pojedinačnog analita. Tri opioidna analita, uključujući 6-acetilmorfin, morfin-3-β-D-glukuronid te morfin-6-β-D-glukuronid, nisu bili uključeni u ovaj pokus kako bi se isključila mogućnost njihove transformacije u morfin. Ekvilibracija tako obogaćenih modelnih uzoraka provedena je na laboratorijskoj tresilici u trajanju od 3 sata, nakon čega je uzorak aktivnog mulja razdijeljen u

4 poduzorka (alikvoti po 25 mL). Uzorci su zatim centrifugirani na 7 888 g u trajanju od 5 minuta. Supernatant (otopljena frakcija) je odvojen dodatnim filtriranjem kroz filtre GF/D (promjer 47 mm, veličina pora 2,7 μm). U filtrat je dodano 25 ng izotopno obilježenih surogata opioida. Obrada uzoraka otopljene frakcije provedena je prema prethodno razvijenom analitičkom protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.1., a obrada čvrstih uzoraka prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.2.

Raspodjelni koeficijent za pojedine opioide izračunat je kao omjer koncentracija prema izrazu:

$$K_d = w_s / \gamma_o$$

gdje je w_s maseni udio opioida u određen u suspendiranoj tvari, izražen u ng kg^{-1}, a γ_o masena koncentracija u vodi (otopljena frakcija), izražena u ng L^{-1}.

3.8. Obrada podataka

Kvalitativna i kvantitativna analiza opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u okolišnim uzorcima primjenom sustava LC-MS/MS s tri kvadrupola provedena je upotrebom programa Xcalibur 2.0.5. koji je integrirani dio instrumenta.

Za identifikaciju i kvantifikaciju tramadola i metadona te njihovih razgradnih produkata UPLC-Q/ToF MS-om upotrijebljen je integrirani softverski program MassLynx 4.1.

Statistička obrada rezultata eksperimenata stabilnosti opioida u uzorcima i ekstraktima provedena je upotrebom programa SigmaPlot.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj analitičkih metoda za određivanje opioidnih analgetika u vodenom okolišu

4.1.1. Optimizacija kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta

Kada se radi o određivanju tragova organskih spojeva u okolišnim uzorcima, zahtjevi u pogledu osjetljivosti i selektivnosti su vrlo visoki pa je često, i za najsuvremenije instrumentne tehnike poput LC-MS/MS-a, prije primjene potrebno provesti pažljivu optimizaciju postupka. To se posebno odnosi na multirezidualne metode kojima se istovremeno određuje i po nekoliko desetaka sastojaka. U tom kontekstu vrlo je važno optimirati kromatografsko odjeljivanje ciljnih analita prije konačne detekcije spektrometrijom masa. Također, optimizacija kromatografskog odjeljivanja iznimno je važna kod analiza visokoopterećenih uzoraka, kao što su primjerice otpadne vode, jer može značajno smanjiti nepovoljne utjecaje matrice u analizatoru masa.

Za analizu opioidnih analgetika sustavom LC-MS/MS primijenjena je kromatografija obrnutih faza pri čemu su testirane 4 različite kromatografske kolone: Gemini C_{18}, YMCPro C_{18}, ACE C_{18}-PFP i Synergi Polar-RP. Selektivnost kolona YMCPro C_{18} i Gemini C_{18} poglavito se temelji na hidrofobnim interakcijama dugog alkilnog lanca, dok kolona ACE C_{18}-PFP, uz izrazito hidrofobni karakter, sadrži i pentafluorfenilne skupine što rezultira dodatnim π-π interakcijama tijekom kromatografskog odjeljivanja spojeva koji sadrže aromatsku jezgru. Kolona Synergi Polar sadrži najsloženiju nepokretnu fazu, koja uz hidrofobni alkilni lanac sadrži i fenilnu skupinu te eterski vezani kisik kao heteroatomski centar, čime se poboljšavaju polarne interakcije koje pružaju dodatnu selektivnost za odjeljivanje različitih tipova polarnih spojeva.

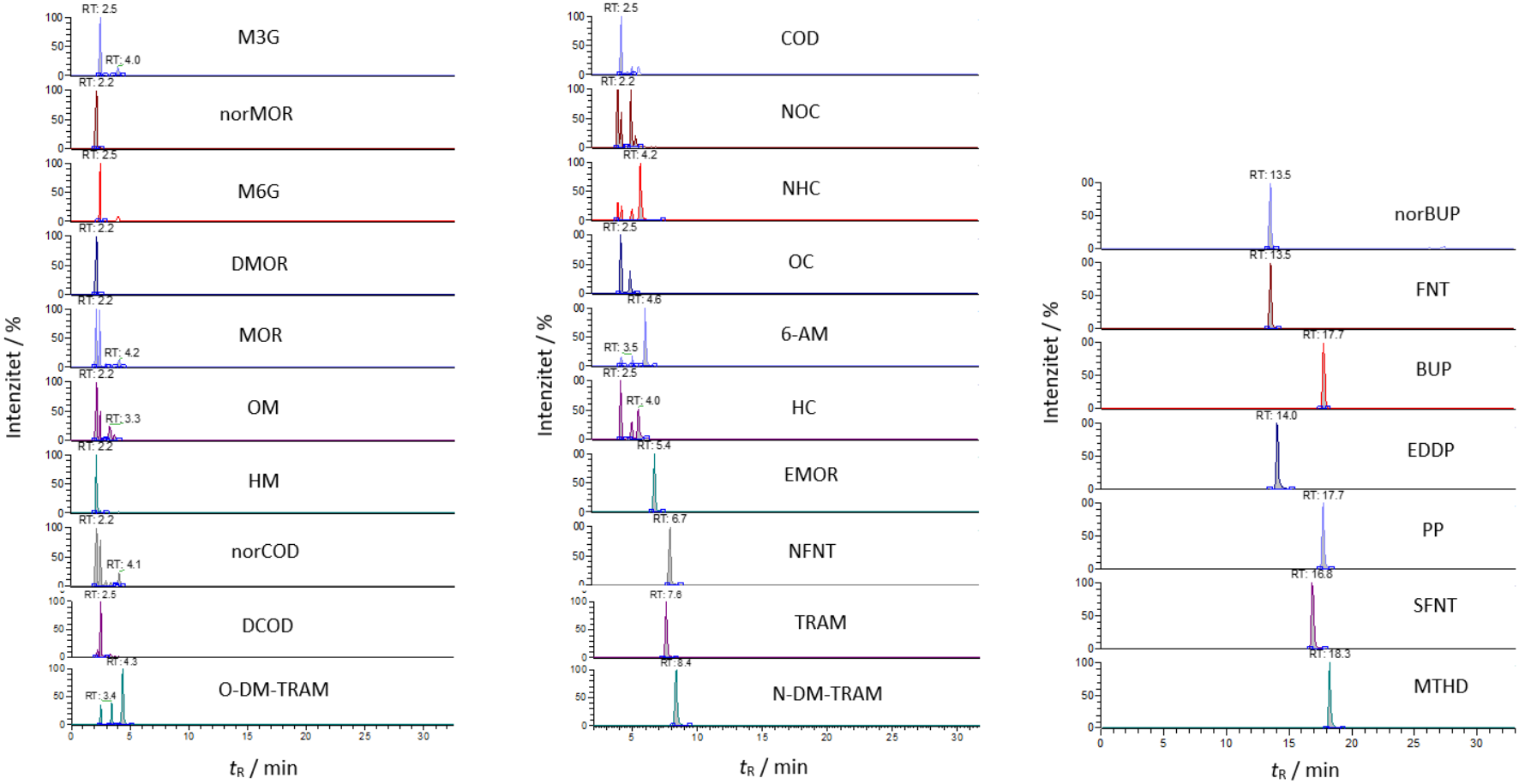
Prilikom optimizacije kromatografskog procesa testirane su i različite vrste pokretnih faza, uključujući različite kombinacije ultračiste vode, metanola i acetonitrila uz dodatak octene ili mravlje kiseline kao kiselog modifikatora. Kiseli uvjeti ujedno pogoduju protoniranju bazičnih spojeva kao što su opioidi te se tako povećava intenzitet odziva detekcijskog sustava. Preliminarni pokusi su pokazali da je metanol pogodniji eluens u odnosu na acetonitril. Također, nakon preliminarne usporedbe, octena kiselina je odabrana kao kiseli modifikator pokretne faze. Za konačnu optimizaciju metode kao eluens A odabrana je voda koja je

sadržavala 0,1 % octene kiseline [ψ (H_2O, CH_3COOH) = 1 000 : 1], a kao eluens B metanol koji je sadržavao 0,1 % octene kiseline [ψ (CH_3OH, CH_3COOH) = 1 000 : 1].

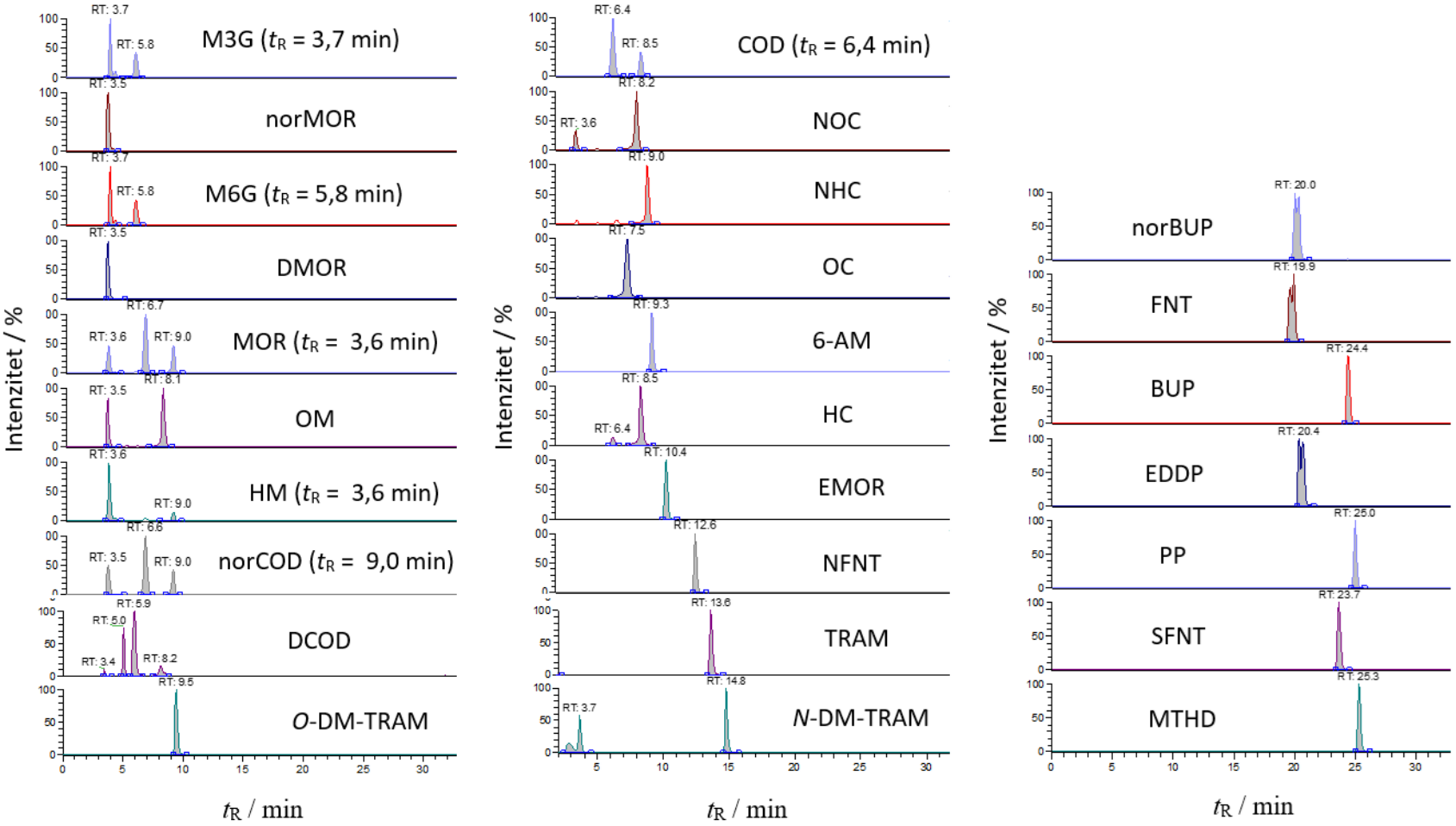
Kromatografsko odjeljivanje standardne smjese opioida na koloni Gemini C_{18} prikazano je na Slici 5. Kao što se vidi na slici, kolona Gemini C_{18} pokazala se prikladnom samo za odjeljivanje lipofilnijih opioidnih spojeva, dok je za hidrofilne predstavnike, poput morfina, morfin-3-β-D-glukuronida, morfin-6-β-D-glukuronida i normorfina postignuto vrlo slabo zadržavanje što je rezultiralo slabim odjeljivanjem tih spojeva. Usprkos tome, u literaturi je dosta česta primjena oktadecilnih kolona za analizu spojeva srodnih opioidima[3,14,15,17,18,21,48,71]. Tako su Vuori i suradnici[86] primjenom takve kolone postigli zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje nekih predstavnika opioidnih analgetika (morfina, 6-acetilmorfina, kodeina, EDDP-a i metadona), međutim, zbog visokog šuma osnovne linije na početku kromatograma, granica određivanja morfina je bila vrlo visoka (40 ng L^{-1}). Mogući razlog za loše zadržavanje spomenutih opioida na koloni Gemini C_{18} mogao bi biti njezin relativno nizak sadržaj ugljika (14 %).

Stoga je testirana alternativna oktadecilna kolona YMCPro C_{18} koja sadrži 16 % ugljika (Slika 6). Iako je za većinu analita postignuto poboljšano kromatografsko odjeljivanje, došlo je do koeluacije izobarnih spojeva, poput morfina i hidromorfona te norkodeina i norhidrokodona, što je onemogućavalo njihovo pouzdano selektivno određivanje.

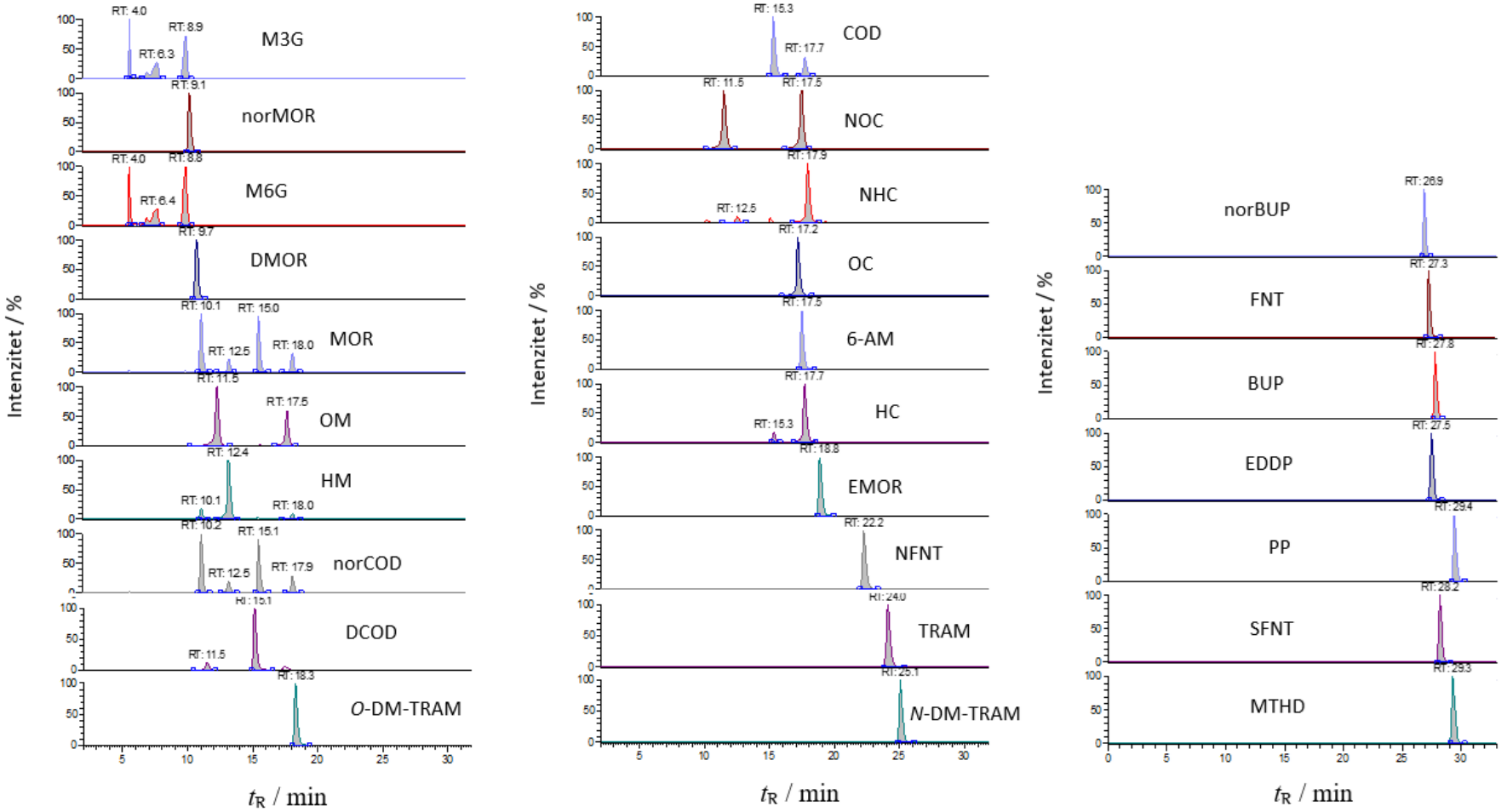
Treba napomenuti da niti jedna od do sada objavljenih metoda nije uključivala neke od najpolarnijih predstavnika opioidnih analgetika, kao što su primjerice derivati morfina, odnosno dihidromorfin, hidromorfin, morfin-3-β-D-glukuronid te morfin-6-β-D-glukuronid. S obzirom na važnost zastupljenosti glukuronidnih konjugata tijekom metaboličkih procesa i izlučivanja iz ljudskog organizma[37], razvoj metode za njihovo određivanje u otpadnim vodama mogao bi biti veoma važan za ispravnu procjenu ukupne zastupljenosti opioidnih analgetika u vodenom okolišu. Da bi se pokušao ostvariti taj cilj, testiran je novi tip nepokretne faze u sustavu obrnutih faza koji je uključivao i polifluoriranu fenilnu skupinu (ACE C_{18}-PFP). Ta se nepokretna faza pokazala mnogo učinkovitijom za odjeljivanje smjese opioida, uz vrlo pravilan oblik pikova za većinu ciljanih spojeva, osim za najpolarniji analit, morfin-3-β-D-glukuronid (Slika 7). Time je potvrđena važnost dodatnih π-π interakcija za odjeljivanje.



Slika 5. LC/MS-MS-kromatogrami standardne otopine opioidnih analgetika masene koncentracije 100 μg L^{-1} snimljeni tehnikom praćenja višestrukih tranzicija primjenom kolone Gemini C_{18} (5μm, 150mm x 3 mm). Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.



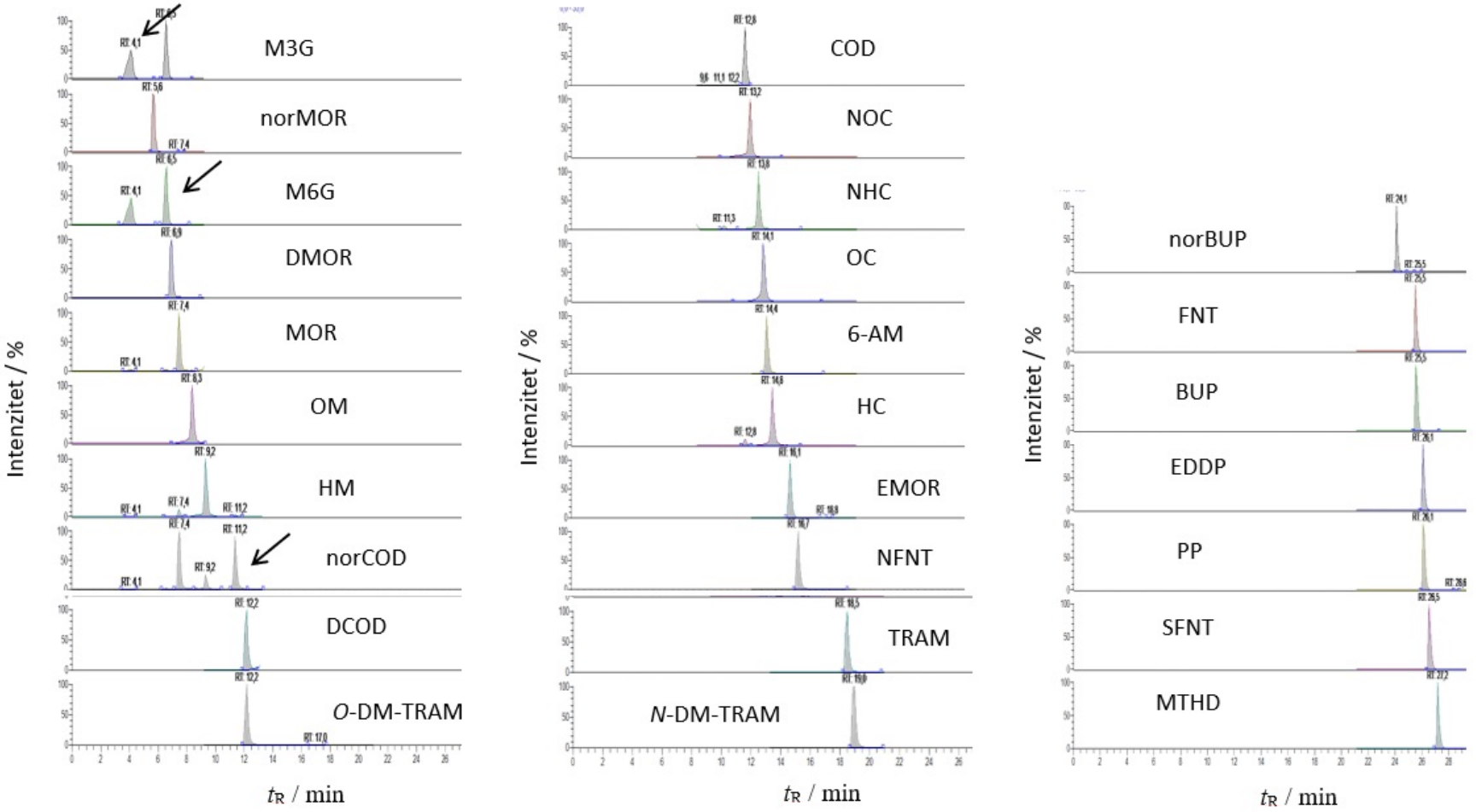
Slika 6. LC/MS-MS-kromatogrami standardne otopine opioidnih analgetika masene koncentracije 100 µg L^{-1} snimljeni tehnikom praćenja višestrukih tranzicija primjenom kolone YMCPro C_{18} (3 µm, 150 mm x 2,1 mm). Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.



Slika 7. LC/MS-MS-kromatogrami standardne otopine opioidnih analgetika masene koncentracije 100 μg L^{-1} snimljeni tehnikom praćenja višestrukih tranzicija razdvojeni kolone ACE C_{18}-PFP (3 μm, 150 mm x 3 mm). Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Da bi se dodatno poboljšalo kromatografsko odjeljivanje najpolarnijih opioida, testirana je i kolona Synergi Polar. Kao što je vidljivo na Slici 8, na ovoj je koloni postignuto vrlo dobro odjeljivanje većine analiziranih opioida, a posebno je poboljšano odjeljivanje najpolarnijih predstavnika (morfin-3-β-D-glukuronida, morfin-6-β-D-glukuronida, normorfina, morfina, dihidromorfina i hidromorfina). Od ukupno 27 ciljanih analita, koeluirala su samo tri para spojeva (dihidrokodein i *O*-demetil-*cis*-tramadol, fentanil i buprenorfin te EDDP i propoksifen). Budući da se niti u jednom slučaju ne radi o izobarnim spojevima, selektivnost je ipak u potpunosti osigurana visokospecifičnom detekcijom (praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija). Zanimljivo je napomenuti da su morfin-3-β-D-glukuronid te morfin-6-β-D-glukuronid, koji su strukturni izomeri s identičnim produkt-ionima, potpuno odijeljeni na koloni Synergi Polar.

Kolona Synergi Polar pokazala se najboljim izborom za odjeljivanje širokog spektra opioidnih analgetika te je u daljnjem tijeku rada upotrijebljena za analize LC-MS/MS-om.



Slika 8. LC/MS-MS-kromatogrami standardne otopine opioidnih analgetika masene koncentracije 100 μg L^{-1} snimljeni tehnikom praćenja višestrukih tranzicija primjenom kolone Synergi Polar (3 μm, 150 mm x 3 mm). Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Detekcija opioida provedena je praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija te su u Tablici 12 prikazani ioni prekursori, ioni produkti, optimizirane vrijednosti kolizijskih energija te vremena zadržavanja (engl. *retention time*, t_R) pojedinih analita i izotopno obilježenih surogata na kromatografskoj koloni Synergi Polar.

Tablica 12. Parametri za određivanje opioidnih analgetika sustavom LC-MS/MS praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Kratica spoja	**Izotopno obilježeni surogat**	**t_R / min**	**Ion prekursor / *m/z***	**Ion prod. 1 / *m/z***	**Kol. energ. 1 / V**	**Ion prod. 2 / *m/z***	**Kol. energ. 2 / V**
M3G	M3G-d^3	4,1	462	286	27	201	41
norMOR	MOR-d^3	5,6	272	165	44	201	25
M6G	MOR-d^3	6,5	462	286	35	201	36
DMOR	MOR-d^3	6,9	288	185	35	187	31
MOR	MOR-d^3	7,4	286	165	42	201	27
OM	OM-d^3	8,3	302	284	20	227	29
HM	HM-d^3	9,2	286	185	29	157	40
norCOD	COD-d^3	11,2	286	165	37	225	17
DCOD	DCOD-d^3	12,2	302	199	27	201	25
O-DM-TRAM	DCOD-d^3	12,2	250	58	20	232	12
COD	COD-d^3	12,8	300	165	37	215	20
NOC	NHC-d^3	13,2	302	284	15	187	23
NHC	NHC-d^3	13,8	286	199	26	183	38
OC	OC-d^6	14,1	316	298	17	187	27
6-AM	6-AM-d^3	14,4	328	165	34	211	23
HC	HC-d^3	14,8	300	199	28	183	27
EM	NFNT-d^5	16,1	314	229	24	183	27
NFNT	NFNT-d^5	16,7	233	84	17	177	13
TRAM	TRAM-O-Cd^3	18,5	264	58	14	246	10
N-DM-TRAM	NFNT-d^5	19,0	250	44	15	232	9
norBUP	norBUP-d^3	24,1	414	187	39	211	45
FNT	FNT-d^5	25,5	337	188	24	105	32
BUP	BUP-d^4	25,5	468	396	45	187	45
EDDP	EDDP-d^3	26,1	278	234	31	249	23
PP	PP-d^5	26,1	340	266	8	58	13
SFNT	SFNT-d^5	26,5	387	238	19	110	35
MTHD	MTHD-d^3	27,2	310	265	14	105	26
M3G-d^3	-	4,1	465	289	29	204	38
MOR-d^3	-	7,3	289	165	37	201	24
OM-d^3	-	8,2	305	287	19	230	27
HM-d^3	-	9,2	289	185	32	157	43
DCOD-d^3	-	12,1	305	201	31	199	32

Tablica 12. - nastavak

Kratica spoja	Izotopno obilježeni surogat	t_R / min	Ion prekursor / *m*/*z*	Ion prod. 1 / *m*/*z*	Kol. energ. 1 / V	Ion prod. 2 / *m*/*z*	Kol. energ. 2 / V
COD-d^3	-	12,7	303	165	37	215	25
NHC-d^3	-	13,7	289	202	29	183	30
OC-d^6	-	14,0	322	304	20	190	29
6-AM-d^3	-	14,3	311	165	38	210	24
HC-d^3	-	14,7	303	199	32	183	28
NFNT-d^5	-	16,6	238	84	25	56	27
TRAM-d^3	-	18,3	267	58	16	249	9
norBUP-d^3	-	24,1	417	211	43	188	23
FNT-d^5	-	25,5	342	188	23	105	34
BUP-d^4	-	25,6	472	400	45	59	45
EDDP-d^3	-	26,0	281	237	28	249	20
PP-d^5	-	26,1	345	271	7	58	7
SFNT-d^5	-	26,6	392	238	19	111	35
MTHD-d^3	-	27,1	313	268	12	105	30

t_R – vrijeme zadržavanja, **Ion prod.** – ion produkt, **Kol. energ.** – kolizijska energija

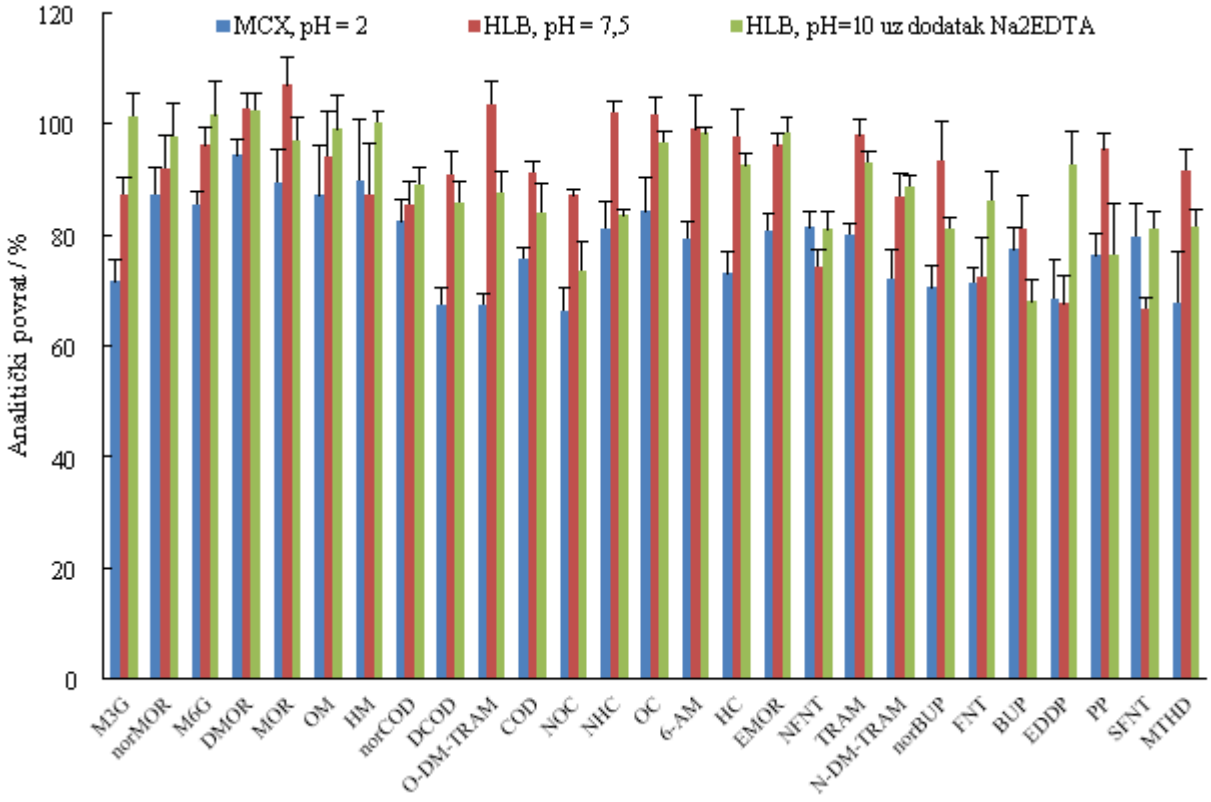
Za većinu ciljanih spojeva postignuta je vrlo visoka osjetljivost, međutim za pojedine analite, poput noroksikodona, norbuprenorfina i propoksifena, osjetljivost je bila nešto niža. Kako bi se povećala osjetljivost, za buprenorfin i norbuprenorfin testirano je nekoliko iona produkata koji su navedeni u literaturi[39,85] te je nađeno da su za buprenorfin najosjetljivije tranzicije bile *m*/*z* 468 → *m*/*z* 396, a za norbuprenorfin *m*/*z* 414 → *m*/*z* 187.

4.1.2. Optimizacija uvjeta ekstrakcije tekućih uzoraka

Temeljem literaturnih iskustava o ekstrakciji spojeva sličnih opioidima[2,17,39,47], u svrhu optimizacije postupka ekstrakcije opioidnih analgetika iz tekućih uzoraka (otpadne i prirodne vode) upotrebom tehnike SPE, istražene su dvije vrste sorbensa: Oasis HLB (200 mg punjenja, volumen 6 mL) te Oasis MCX (150 mg punjenja, volumen 6 mL). Budući da je ovim istraživanjem obuhvaćeno 27 opioidnih analgetika različitih fizikalno-kemijskih svojstava, uz vrstu sorbensa, istražen je i utjecaj vrijednosti pH na analitičke povrate (raspon vrijednosti pH od 2 do 10). Analitički povrati uz upotrebu kolonica HLB ispitani su kod dvije vrijednosti pH: 7,5 (što odgovara vrijednosti pH originalnog uzorka) i pH 10 (radi potiskivanja disocijacije slabobazičnih molekula kao što su opioidi, čime se pojačava njihova hidrofobna interakcija s pretežito hidrofobnim HLB sorbensom). Nasuprot tome, ekstrakcija

na kolonicama Oasis MCX temelji se, prije svega, na principu kationske izmjene, dok su uobičajene lipofilne i hidrofilne interakcije od manje važnosti. Stoga je pH uzoraka prije propuštanja kroz kolonice MCX podešen na 2 kako bi se bazični analiti preveli u protonirani oblik (katione).

Analitički povrati opioidnih analgetika određeni su u preliminarnim pokusima ekstrakcije s čistom izvorskom vodom u koju su ciljani analiti dodani u koncentraciji od 1 μg L^{-1}. Svi eksperimenti određivanja analitičkih povrata provedeni su u kvadriplikatu, a dobiveni rezultati za različite SPE-postupke prikazani su na Slici 9.

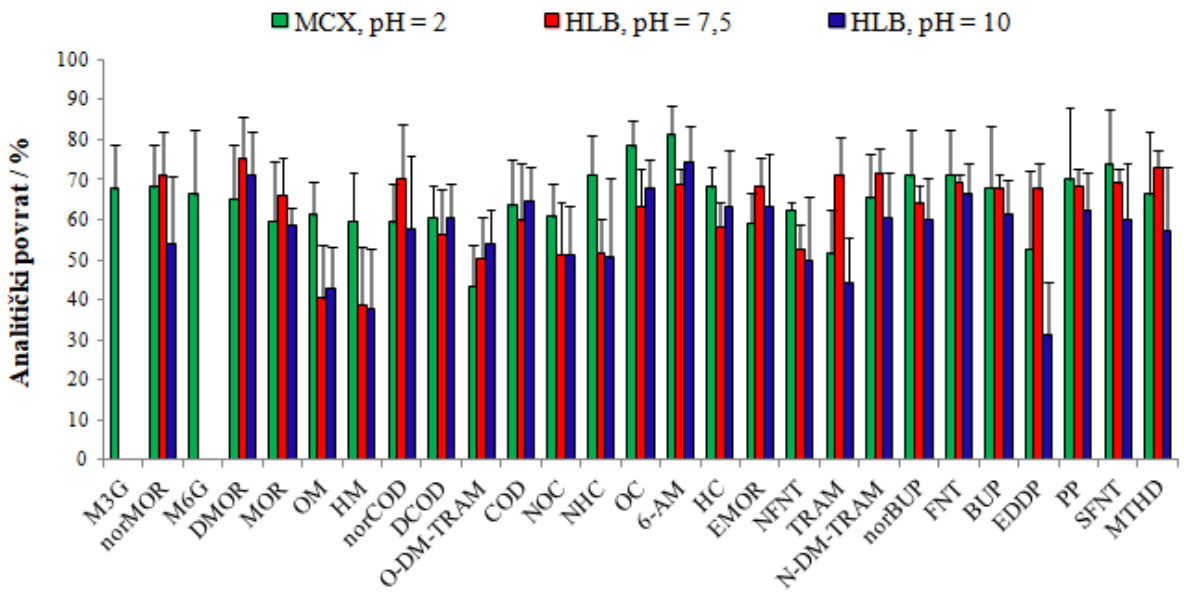


Slika 9. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika (dodatak 1 μg L^{-1}) iz izvorske vode na kolonicama Oasis MCX (pH = 2), Oasis HLB (pH = 7,5) i Oasis HLB (pH = 10 uz dodatak Na_2EDTA), *n* = 4. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Općenito se može reći da su za sva tri postupka ekstrakcije postignuti relativno dobri analitički povrati (od 57 % do 115 %). Ipak, detaljnija analiza rezultata pokazala je da postoje značajne razlike između triju postupaka. Za pojedine analite, poput kodeina i *O*-demetil-*cis*-tramadola, najviši analitički povrati postignuti su primjenom kolonica Oasis HLB na pH 7,5.

Suprotno tome, najviši analitički povrat za sufentanil postignut je upotrebom kolonica Oasis HLB pri pH 10. Nadalje, u ovom modelnom eksperimentu pokazalo se da se većina opioidnih analgetika ne može u potpunosti desorbirati s kolonica Oasis HLB čistim metanolom te je bilo potrebno provesti dodatnu eluaciju primjenom metanola uz dodatak amonijaka [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5]. Tako dobivena dva eluata analizirana su odvojeno, a potom su obje koncentracije zbrojene s ciljem procjene ukupnog povrata ciljanih analita. Na temelju ovih preliminarnih rezultata, ekstrakcija uzoraka na kolonicama Oasis HLB kod pH 10, činila se kao najbolji izbor, međutim to se nije potvrdilo tijekom analize kompleksne matrice kao što su otpadne vode.

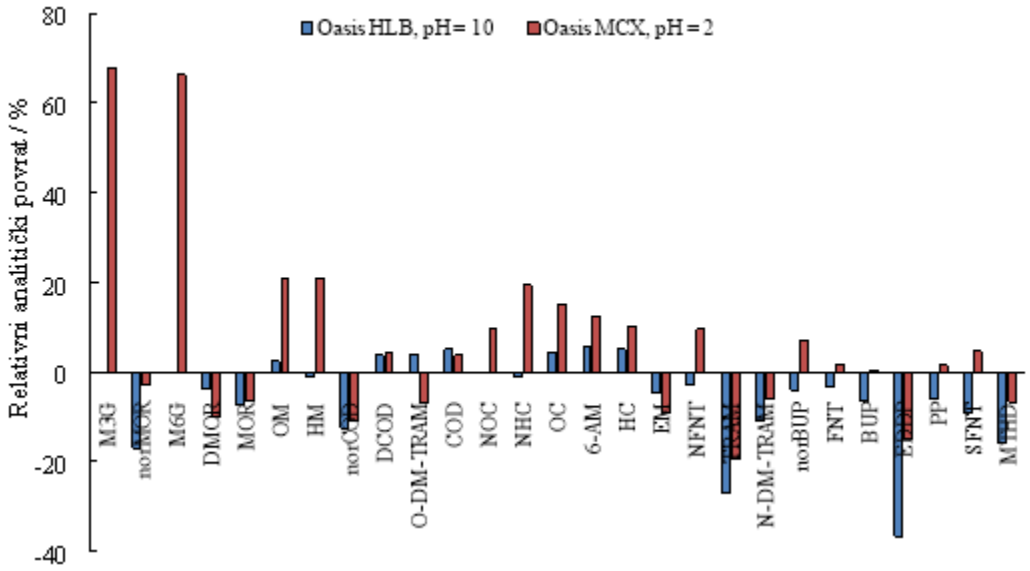
Analitički povrati opioidnih analgetika iz uzorka nepročišćene otpadne vode obogaćene s 1 μg L^{-1} opioida, primjenom triju opisanih postupaka prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika (dodatak 1 μg L^{-1}) iz nepročišćene otpadne vode na kolonicama Oasis MCX (pH = 2), Oasis HLB (pH = 7,5) i Oasis HLB (pH = 10), *n* = 4. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Kao što se vidi, analitički povrati opioidnih analgetika na kolonicama Oasis HLB kod pH 7,5 i pH 10 bili su dosta slični, ali se može primijetiti da su za neke hidrofilne opioide (norMOR, DMOR, MOR i OM) te za najlipofilnije predstavnike, tramadol i EDDP, značajno viši analitički povrati postignuti kod neutralnog pH (pH = 7,5). Na Slici 11 prikazani su relativni

odnosi povrata na sorbensu Oasis HLB kod pH 10 i sorbensu MCX kod pH 2 u odnosu na generički postupak obogaćivanja kod neutralnog pH uz upotrebu sorbensa Oasis HLB.

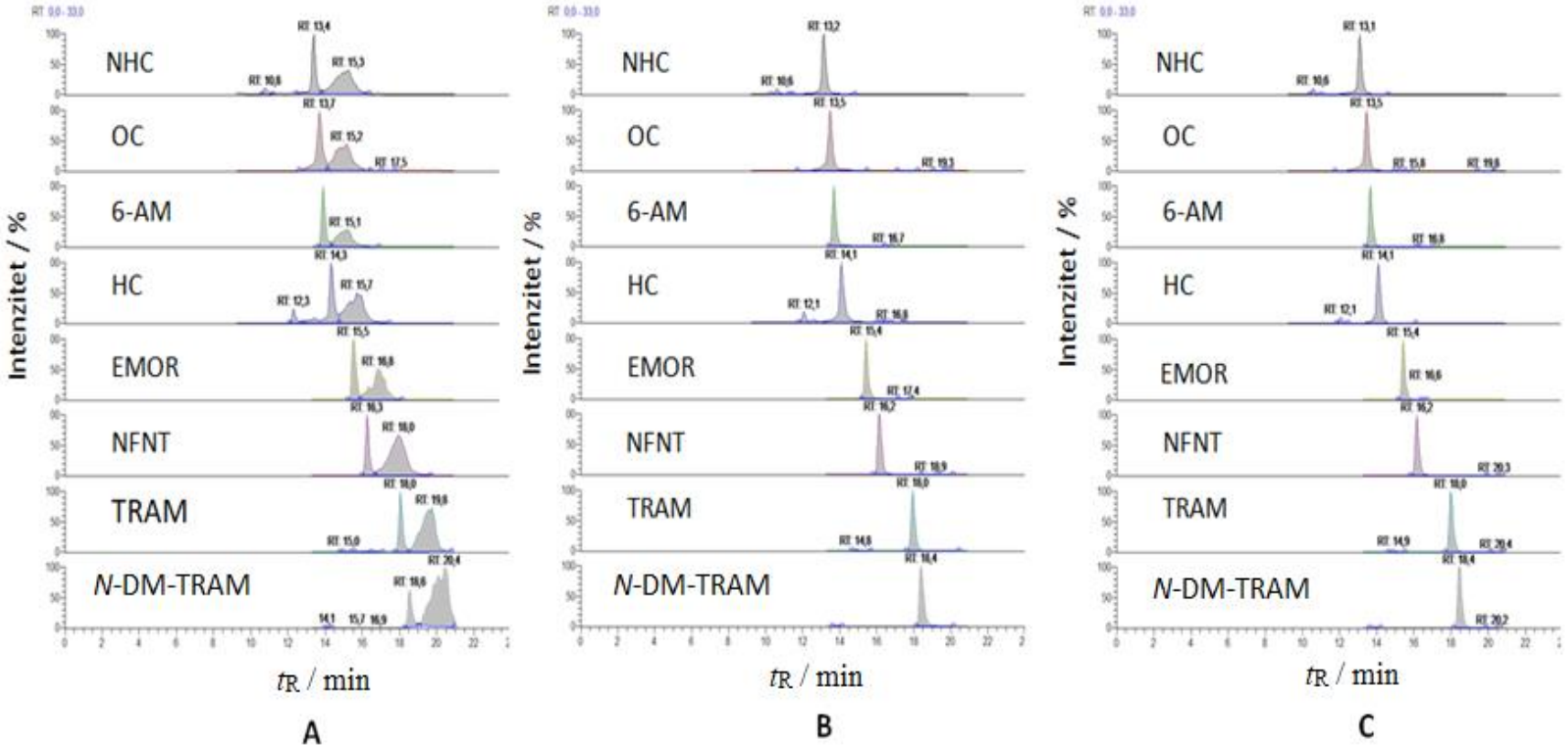


Slika 11. Relativni analitički povrati opioidnih analgetika otopljenih u nepročišćenoj otpadnoj vodi postignuti na kolonicama Oasis HLB (pH = 10) i Oasis MCX (pH = 2) u odnosu na analitičke povrate postignute na kolonicama Oasis HLB pri originalnoj vrijednosti pH uzorka (pH = 7,5)

Vidi se da je primjena kolonica Oasis MCX rezultirala znatno ujednačenijim povratima za opioidne analgetike u širokom rasponu polarnosti u usporedbi s kolonicama Oasis HLB. Međutim, najvažnija prednost sorbensa Oasis MCX su relativno visoka iskorištenja za najpolarnije opioide, kao što su morfin-3-β-D-glukuronid, morfin-6-β-D-glukuronid, oksimorfon i hidromorfon. To potvrđuje važnost kationske izmjene na sulfonskim skupinama sorbensa MCX za ekstraciju polarnih opioida.

Dodatni problem kod ekstrakcije opioida na kolonicama Oasis HLB kod pH 10 je nastajanje taloga kalcijevog karbonata nakon podešavanja pH uzorka amonijakom, što dovodi do začepljivanja kolonica tijekom ekstrakcije. Da bi se riješio taj problem, prije SPE bilo je potrebno dodati visoku koncentraciju Na_2EDTA (γ = 1 g L^{-1}) u uzorke otpadnih voda, što može stvarati poteškoće u daljnoj analizi zbog povećanog utjecaja ekstrahirane matrice na lošiji oblik kromatografskih pikova (Slika 12 A). Taj se problem može otkloniti dodatnim pročišćavanjem ekstrakta na kolonicama Strata NH_2 pri čemu se, na principu anionske

izmjene, mogu ukloniti neke interferencije (Slika 12 B). Međutim, to pretpostavlja uvođenje dodatnog koraka u analizi čime se produljuje postupak i povećava vjerojatnost gubitka analita. Ukoliko se za ekstrakciju upotrijebe kolonice Oasis MCX, taj je korak moguće spretno izbjeći uz primjenu sekvencijalnog eluiranja kao što je prethodno opisano u literaturi[8,17,90]. Anionske interferencije prisutne u uzorku mogu se selektivno eluirati čistim metanolom, pri čemu bazični analiti, kao što su opioidi, ostaju na kolonici. Opioidi se, zatim, vrlo efikasno eluiraju bazičnim metanolom [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5]. Kromatogrami te frakcije su vrlo čisti i prikladni za kvantitativnu analizu (Slika 12 C).



Slika 12. LC-MS/MS-kromatogrami odabranih opioidnih analgetika masene koncentracije 1 μg L^{-1} analizirani tehnikom praćenja višestrukih tranzicija (MRM) ekstrahiranih iz nepročišćene otpadne vode primjenom: A) kolonica Oasis HLB bez pročišćavanja; B) kolonica Oasis HLB kolonica uz pročišćavanje ekstrakta primjenom kolonica Strata NH_2; C) kolonica Oasis MCX uz primjenu sekvencijalnog eluiranja. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

4.1.3. Optimizacija uvjeta ekstrakcije čvrstih uzoraka

U okviru razvoja metoda optimirani su postupci ekstrakcije za nekoliko tipova čvrstih uzoraka iz vodenog okoliša: suspendiranu tvar iz nepročišćene otpadne vode, aktivni mulj te riječni sediment. Postupak je obuhvatio kompleksnu smjesu opioidnih analita, kao i za vodu, (osim 6-acetilmorfina i morfin glukuronida) zbog čega njihova simultana ekstrakcija predstavlja analitički izazov. Razvoj metode načinjen je u tri faze. U početnoj fazi optimizacije načinjen je odabir najprikladnijeg otapala za ekstrakciju. Zatim je načinjena usporedba dviju tehnika ekstrakcije (ultrazvučne i PLE-ekstrakcije), a posebna pozornost posvećena je optimizaciji postupka za obradu konačnog ekstrakta, uključujući njegovo dodatno pročišćavanje i ukoncentriravanje prije instrumentne analize.

Da bi se odabralo najučinkovitije otapalo, u preliminarnom je pokusu uz upotrebu ultrazvučne kupelji testirano više čistih otapala i njihovih smjesa: metanol, acetonitril, smjesa metanola i acetonitrila [ψ (CH_3OH, C_2H_3N) = 1 : 1], smjesa metanola i acetona [ψ (CH_3OH, C_3H_6O) = 1 : 1], metanol uz dodatak amonijaka [ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1], metanol uz dodatak amonijaka i mravlje kiseline [ψ (CH_3OH, NH_3 : HCOOH) = 100 : 1] te acetonitril uz dodatak amonijaka [ψ (C_2H_3N, NH_3) = 100 : 1]. Taj početni odabir otapala za testiranje načinjen je uzimajući u obzir polarna svojstva opioidnih analita te na temelju literature[16,71] i prethodnog iskustva Laboratorija u radu sa sličnim spojevima[90,91]. Pokusi su provedeni u kvadriplikatu sa suhim uzorcima sedimenta (m = 0,5 g) obogaćenih sa 100 ng analita kako je opisano u eksperimentalnom dijelu. Postignuti analitički povrati prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Srednje vrijednosti i medijani analitičkih povrata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta (w = 200 ng g^{-1}) primjenom ultrazvučne ekstrakcije uz upotrebu različitih otapala, t = 15 min, n = 4, NO – nije određeno. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	Analitički povrat / % ± SD						
	CH_3OH	C_2H_3N	ψ(CH_3OH, C_2H_3N) = 1 : 1	ψ(CH_3OH, C_3H_6O) = 1 : 1	ψ(CH_3OH, NH_3) = 100 : 1	ψ(CH_3OH, HCOOH) = 100 : 1	ψ(C_2H_3N, NH_3) = 100 : 1
norMOR	2 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	35 ± 2	3 ± 1	15 ± 1
DMOR	6 ± 2	1 ± 1	10 ± 1	4 ± 1	81 ± 3	2 ± 1	30 ± 2
MOR	18 ± 4	1 ± 0	17 ± 2	9 ± 1	98 ± 3	3 ± 1	26 ± 2
HM	3 ± 3	0 ± 1	10 ± 1	1 ± 0	58 ± 2	1 ± 0	39 ± 3
norCOD	2 ± 1	0 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	89 ± 2	4 ± 1	72 ± 4
DCOD	9 ± 1	1 ± 1	12 ± 1	8 ± 2	99 ± 2	2 ± 1	99 ± 4
O-DM-TRAM	53 ± 2	2 ± 1	67 ± 3	49 ± 3	120 ± 3	31 ± 3	103 ± 4
COD	24 ± 2	1 ± 1	23 ± 2	22 ± 2	102 ± 2	4 ± 2	86 ± 3
NOC	2 ± 3	1 ± 0	3 ± 1	1 ± 0	71 ± 1	4 ± 1	71 ± 3
OM	25 ± 1	1 ± 1	50 ± 3	27 ± 2	83 ± 2	14 ± 3	54 ± 2
NHC	1 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	1 ± 0	71 ± 3	3 ± 1	90 ± 2
OC	32 ± 2	2 ± 1	56 ± 2	34 ± 2	113 ± 3	17 ± 2	80 ± 6
HC	4 ± 3	1 ± 0	20 ± 1	3 ± 1	68 ± 2	1 ± 0	91 ± 2
EMOR	34 ± 3	1 ± 1	44 ± 2	35 ± 3	99 ± 3	6 ± 1	86 ± 3
NFNT	2 ± 2	0 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	77 ± 3	2 ± 0	84 ± 2
TRAM	40 ± 1	4 ± 1	112 ± 3	81 ± 3	153 ± 2	28 ± 2	82 ± 3
N-DM-TRAM	44 ± 1	5 ± 1	86 ± 4	50 ± 2	108 ± 3	42 ± 3	135 ± 5
norBUP	3 ± 3	1 ± 0	5 ± 1	4 ± 1	119 ± 4	5 ± 2	93 ± 6
FNT	12 ± 3	0 ± 0	50 ± 3	4 ± 0	82 ± 2	1 ± 1	52 ± 4
BUP	178 ± 7	2 ± 1	105 ± 2	51 ± 4	162 ± 5	55 ± 3	45 ± 3
EDDP	23 ± 12	NO	NO	NO	52 ± 9	15 ± 2	NO
PP	61 ± 6	2 ± 1	96 ± 1	48 ± 2	123 ± 4	24 ± 4	39 ± 6
SFNT	46 ± 8	2 ± 0	74 ± 2	28 ± 3	90 ± 5	23 ± 3	61 ± 5
MTHD	45 ± 5	4 ± 1	88 ± 3	51 ± 2	120 ± 4	37 ± 2	36 ± 3
Medijan / %	21	1	23	9	94	5	72

Medijani analitičkih povrata postignutih upotrebom polarnih organskih otapala ili njihovih smjesa bez kiselih ili bazičnih modifikatora bili su srazmjerno niski za većinu analita: acetonitril (1 %), metanol (21 %), smjesa metanol-acetonitril (23 %), smjesa metanol-aceton (9 %). Niti dodatkom kiselog modifikatora (HCOOH) nije se znatnije poboljšala učinkovitost ekstrakcije (medijan 5 %). Visoki analitički povrati postignuti su tek s bazičnim otapalima (1 % amonijaka), pri čemu je znatno viši povrat postignut bazičnim metanolom (od 35 % do 162 %), nego bazičnim acetonitrilom (od 15 % do 135 %). Za većinu analita, povrati ekstrakcije bazičnim metanolom bili su u rasponu od 80 % do 120 %. Niži analitički povrati postignuti su za izrazito polarne spojeve, uključujući normorfin (35 %), hidromorfon (58 %) i hidrokodon (68 %) te EDDP (52 %). Nasuprot tome, za neke od analita, kao što su propoksifen, tramadol i buprenorfin zabilježeni su analitički povrati iznad 120 %.

Temeljem preliminarnog pokusa, bazični metanol je odabran kao otapalo za daljnji razvoj metode te je u sljedećem koraku istražen utjecaj dodatka amonijaka metanolu na učinkovitost ekstrakcije pri 4 različita omjera metanola i amonijaka : ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 2, ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5, ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1, ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 2. Rezultati su prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. Utjecaj dodatka amonijaka metanolu na srednje vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta (w = 200 ng g^{-1} pojedinačnih analita) primjenom ultrazvučne ekstrakcije (n = 4). Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

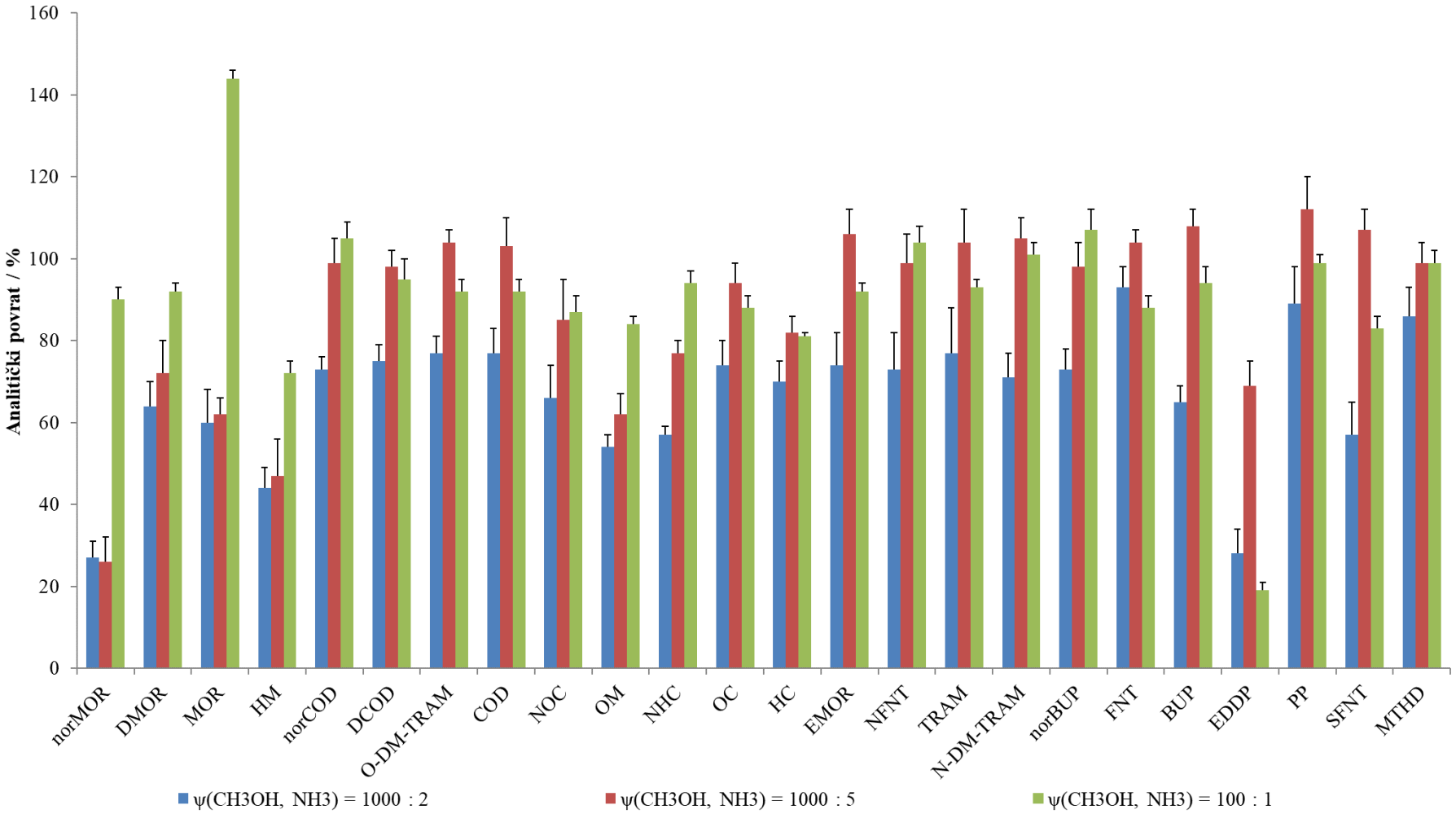
Analit	Analitički povrati / % ± SD			
	ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 2	ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5	ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1	ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 2
norMOR	16 ± 2	20 ± 1	35 ± 3	24 ± 1
DMOR	33 ± 2	44 ± 2	81 ± 2	49 ± 2
MOR	33 ± 3	36 ± 2	98 ± 3	33 ± 2
HM	28 ± 2	32 ± 2	58 ± 2	36 ± 1
norCOD	73 ± 3	80 ± 3	89 ± 4	86 ± 3
DCOD	72 ± 3	81 ± 2	99 ± 3	97 ± 4
O-DM-TRAM	82 ± 4	90 ± 2	120 ± 3	93 ± 3
COD	80 ± 2	80 ± 3	102 ± 1	96 ± 2
NOC	73 ± 1	71 ± 3	71 ± 2	89 ± 4
OM	42 ± 2	42 ± 2	83 ± 4	41 ± 2
NHC	59 ± 3	69 ± 3	71 ± 3	81 ± 3
OC	79 ± 4	82 ± 2	113 ± 3	89 ± 3
HC	63 ± 3	78 ± 3	68 ± 3	91 ± 4
EMOR	83 ± 4	82 ± 4	99 ± 2	98 ± 5
NFNT	62 ± 2	72 ± 6	77 ± 3	91 ± 3

Tablica 14. - nastavak

Analit	Analitički povrati / % ± SD			
	ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 2	ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5	ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1	ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 2
TRAM	94 ± 2	89 ± 2	153 ± 6	99 ± 4
N-DM-TRAM	94 ± 2	78 ± 3	108 ± 4	108 ± 5
norBUP	70 ± 5	60 ± 4	119 ± 3	69 ± 3
FNT	61 ± 4	83 ± 5	82 ± 2	87 ± 3
BUP	59 ± 6	81 ± 3	162 ± 5	72 ± 3
EDDP	54 ± 6	45 ± 7	52 ± 4	86 ± 2
PP	77 ± 4	88 ± 3	123 ± 5	81 ± 4
SFNT	83 ± 4	84 ± 3	90 ± 5	87 ± 3
MTHD	82 ± 3	92 ± 2	120 ± 3	91 ± 2

Pokazalo se da se najviši analitički povrati postižu otapalom ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1. Kod svih ostalih testiranih uvjeta postignuti su za većinu spojeva niži analitički povrati, posebno za najpolarnije analite, morfin, normorfin, dihidromorfin i hidromorfon.

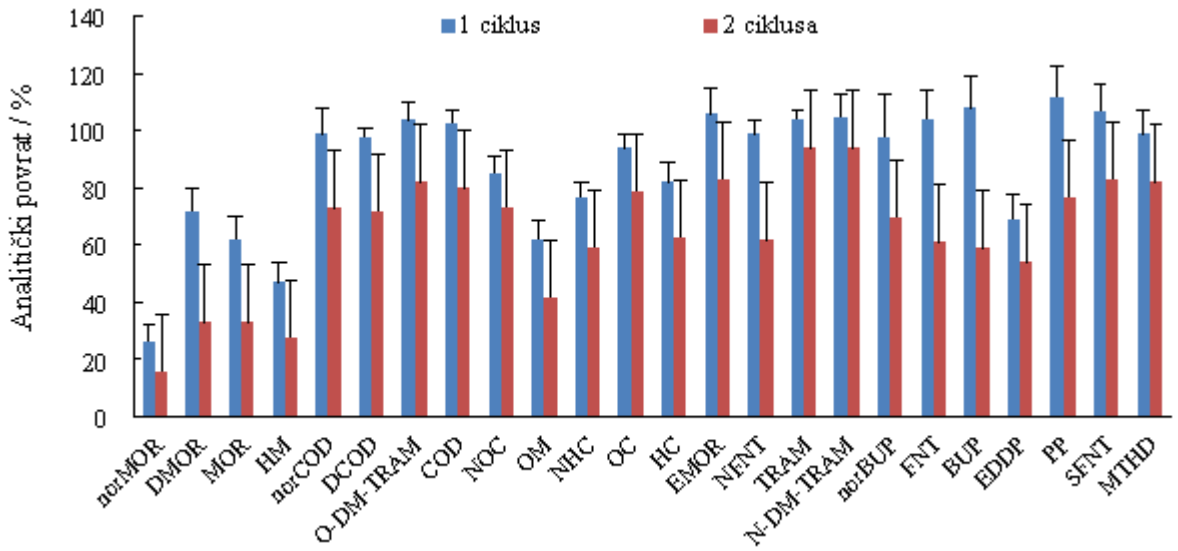
Na sličan način, ispitan je utjecaj udjela amonijaka na alternativnu ekstrakcijsku tehniku – ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju otapalom. I PLE-tehnikom su najbolji rezultati postignuti otapalom istog sastava ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1. Usporedba učinkovitosti PLE-ekstrakcije (Slika 13) i ekstrakcije pomognute ultrazvukom (Tablica 14) pokazala je da PLE-ekstrakciji treba dati prednost. Budući da su kod PLE-ekstrakcije pri omjeru metanola i amonijaka ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1 uočeni tehnički problemi s uređajem za ekstrakciju, za koje je pretpostavljeno da mogu biti povezani sa nastajanjem mjehurića usljed otparavanja amonijaka, u kasnijoj je fazi ispitan utjecaj smanjenja dodatka amonijaka na analitičke povrate. Rezultati su pokazali da su i za otapalo s dvostruko nižim udjelom amonijaka [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5] za većinu opioida dobiveni vrlo slični analitički povrati kao i za otapalo [ψ (CH_3OH, NH_3) = 100 : 1]. Međutim, ipak treba primijetiti da su povrati najpolarnijih opioida (norMOR, MOR, OM i HM) bili niži, dok je povrat EDDP-a bio viši (69 %). Tim je analitima u daljnjem postupku posvećena posebna pozornost, uzimajući u obzir činjenicu da na povrate osim učinkovitosti ekstrakcije utječe i obrada ekstrakta. Zbog izbjegavanja tehničkih problema s PLE-uređajem, za ekstrakciju je prilikom daljnjeg razvoja i validacije metode odabrano otapalo ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5.



Slika 13. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika ekstrahiranih iz modelnih uzoraka sedimenta pod povišenim tlakom primjenom različitih otapala, *n* = 4. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

PLE-ekstrakciju su za slične spojeve upotrijebili i neki drugi autori[71,92] pri čemu je ekstrakcija provođena najčešće kod temperature od 80 °C. Ukazano je da na višim temperaturama, koje pogoduju povećanju brzine difuzije otapala u matrici, može doći do degradacije termički nestabilnih spojeva. Utjecaj temperature na povrate 15 različitih farmaceutskih spojeva, u koje je bio uključen i opioid kodein, upotrebom PLE-tehnike istraživali su Vazquez-Roig i suradnici[92] u temperaturnom rasponu od 50 °C do 110 °C te su zaključili da su najviši analitički povrati postignuti pri 90 °C. Nešto nižu optimalnu vrijednost temperature od 80 °C za ukupno 21 opioidni analgetik odredili su Baker i Kasprzyk-Hordern[71].

Baker i Kasprzyk-Hordern[71] također su pokazali da je za iscrpnu ekstrakciju potrebno provesti 3 ciklusa PLE-ekstrakcije. Iako je takav zaključak i očekivan u pogledu učinkovitosti same ekstrakcije, treba napomenuti da višestrukim ekstrakcijskim ciklusima nastaju veliki volumeni ekstrakta što se može negativno odraziti na analitičke povrate prilikom obrade prikupljenog ekstrakta. Na to upućuju i rezultati eksperimenta u kojem je uspoređena ukupna učinkovitost jednokratne i dvokratne PLE-ekstrakcije za odabranu smjesu opioida (Slika 14). Kao što se vidi, ukupni analitički povrati postignuti primjenom jednog ciklusa ekstracije bili su viši nego u slučaju primjene 2 sukcesivna ciklusa ekstrakcije. Najveće su razlike zabilježene za izrazito polarne spojeve poput morfina (47 %) te dihidromorfona (54 %).

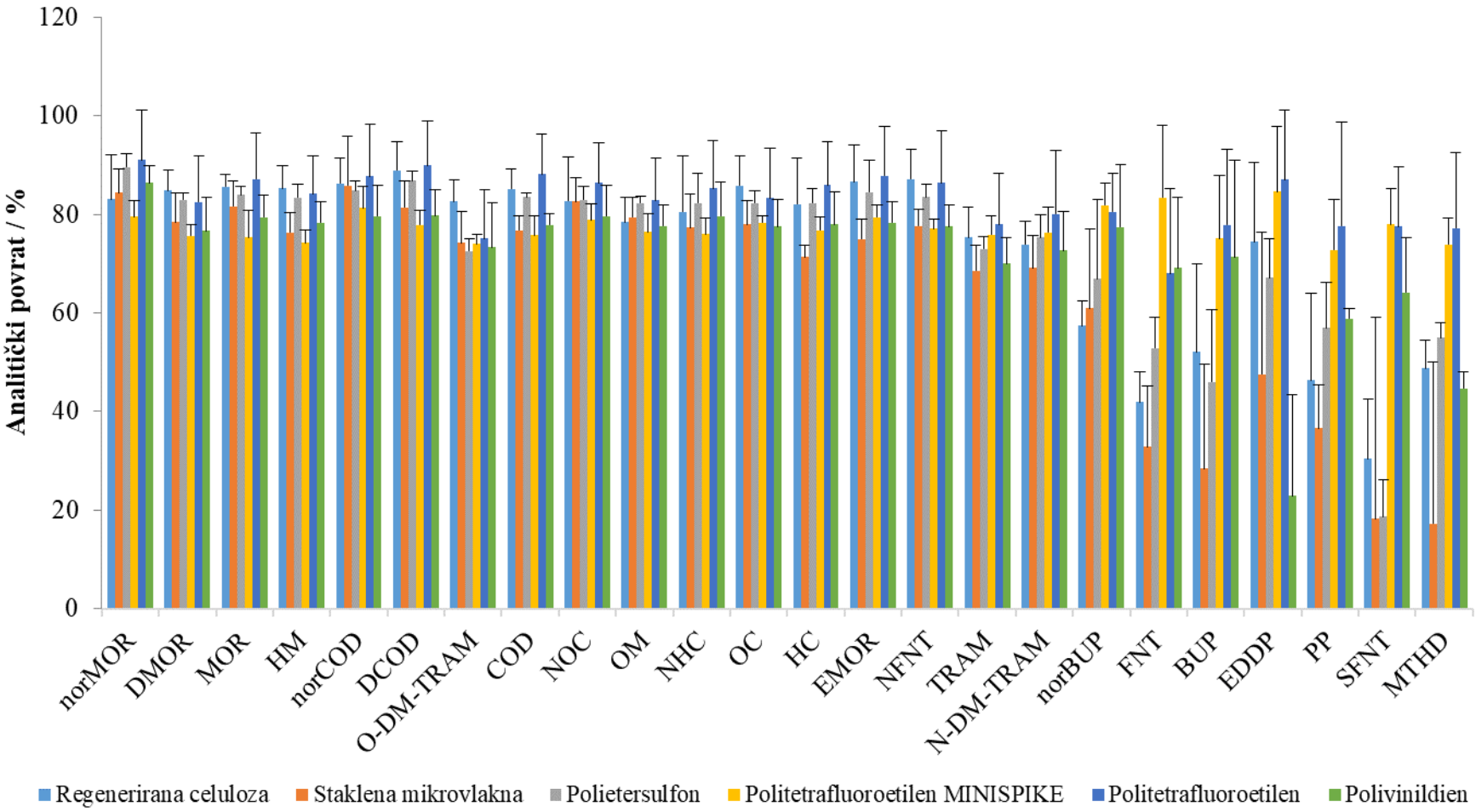


Slika 14. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta obogaćenih s 200 ng g^{-1} analita (n = 4) primjenom 1 i 2 ciklusa PLE-ekstakcije. Otapalo za ekstrakciju: ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 5. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Takav rezultat ukazuje na značajne gubitke koji mogu nastati obradom ekstrakata većega volumena. Vrijeme potrebno za uparavanje takvih ekstrakata je iznimno dugo (približno 4 h) što rezultira povećanim gubicima i značajno produljuje trajanje analize.

Konačne ukoncentrirane ekstrakte za analize LC-MS/MS-om važno je profiltrirati u svrhu uklanjanja čestica koje bi mogle začepiti injektorski sustav i kromatografsku kolonu. Taj dodatni korak može dovesti do daljnjih gubitaka i / ili kontaminirati uzorak. Zbog toga je izbor tipa filtra od velike važnosti. U ovom radu u tu je svrhu testirano 6 vrsta filtara, a rezultati su prikazani na Slici 15.

Pokazalo se da filtracija završnih ekstrakata znatnije utječe isključivo na analitičke povrate lipofilnijih analita kao što su metadon, EDDP, buprenorfin, norbuprenorfin, propoksifen, fentanil i sufentanil. Zbog niskih povrata, filtri sa staklenim mikrovlaknima, polietersulfonski te regenerirani celulozni filtri pokazali su se neprikladnim za analizu opioida. Visoke vrijednosti povrata (od 75 % do 91 %) dobivene su filtracijom kroz politetrafluoroetilenske filtre (promjer 17 mm, veličina čestica 0,45 μm) za sve opioidne spojeve osim fentanila (68 %). Ovi rezultati u skladu su s onima koje su ranije objavili Baker i Kasprzyk-Hordern[17].



Slika 15. Srednje vrijednosti analitičkih povrata uz filtraciju PLE-ekstrakata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta kroz različite vrste filtara, $n = 4$. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

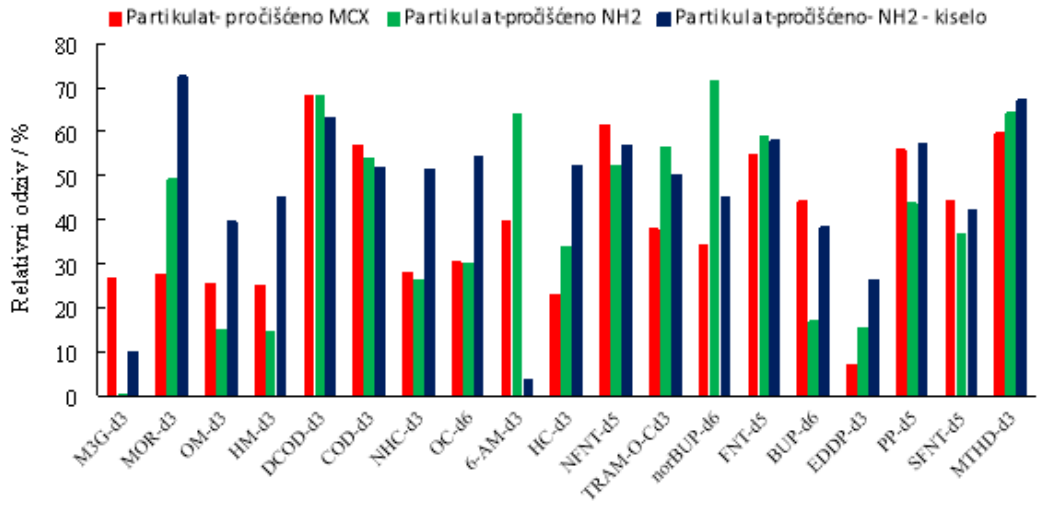
Prilikom optimizacije metode, istražen je i utjecaj sastava otapala u kojem je pripravljen završni ekstrakt na analitičke povrate tijekom filtracije kroz politetrafluoroetilenske filtere. Testiranje je provedeno u 50 mmol L^{-1} amonijevom acetatu ($C_2H_7NO_2$) pripravljenom u otapalima koja su sadržavala 3 različita volumna omjera vode i metanola [ψ (H_2O, CH_3OH) = 8 : 2; ψ (H_2O, CH_3OH) = 1 : 1; ψ (H_2O, CH_3OH) = 2,5 : 7,5] te u metanolu. Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Utjecaj sastava otapala u kojem je pripravljen završni ekstrakt na srednje vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta uz filtraciju ekstrakta kroz politetrafluoroetilenske filtre, *n* = 4. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	Analitički povrat / % ± SD			
	50 mmol L^{-1} $C_2H_7NO_2$ (ψ (H_2O, CH_3OH) = 8 : 2)	50 mmol L^{-1} $C_2H_7NO_2$ (ψ (H_2O, CH_3OH) = 1 : 1)	50 mmol L^{-1} $C_2H_7NO_2$ (ψ (H_2O, CH_3OH) = 2,5 : 7,5)	CH_3OH
norMOR	86 ± 10	101 ± 13	121 ± 4	147 ± 6
DMOR	91 ± 6	105 ± 7	125 ± 4	114 ± 3
MOR	93 ± 5	104 ± 7	121 ± 3	108 ± 4
HM	92 ± 5	102 ± 8	120 ± 2	108 ± 2
norCOD	86 ± 11	102 ± 12	121 ± 5	136 ± 5
DCOD	93 ± 2	107 ± 9	120 ± 5	111 ± 4
O-DM-TRAM	84 ± 2	103 ± 6	124 ± 5	108 ± 3
COD	91 ± 4	103 ± 12	120 ± 7	107 ± 5
NOC	90 ± 3	104 ± 8	120 ± 4	133 ± 5
OM	88 ± 2	104 ± 8	121 ± 5	108 ± 6
NHC	88 ± 9	103 ± 10	124 ± 3	149 ± 6
OC	87 ± 2	102 ± 9	123 ± 5	105 ± 6
HC	93 ± 7	106 ± 8	123 ± 5	107 ± 2
EMOR	91 ± 6	106 ± 10	125 ± 6	107 ± 3
NFNT	87 ± 3	107 ± 11	127 ± 6	119 ± 4
TRAM	82 ± 5	102 ± 11	122 ± 4	107 ± 5
N-DM-TRAM	84 ± 4	105 ± 7	128 ± 4	110 ± 4
norBUP	90 ± 6	94 ± 19	116 ± 5	110 ± 3
FNT	94 ± 3	99 ± 3	114 ± 6	100 ± 7
BUP	85 ± 11	102 ± 8	115 ± 9	102 ± 7
EDDP	84 ± 4	101 ± 9	119 ± 7	111 ± 5
PP	81 ± 15	113 ± 5	132 ± 10	103 ± 5
SFNT	87 ± 5	105 ± 3	121 ± 12	105 ± 8
MTHD	83 ± 3	103 ± 4	116 ± 10	105 ± 5

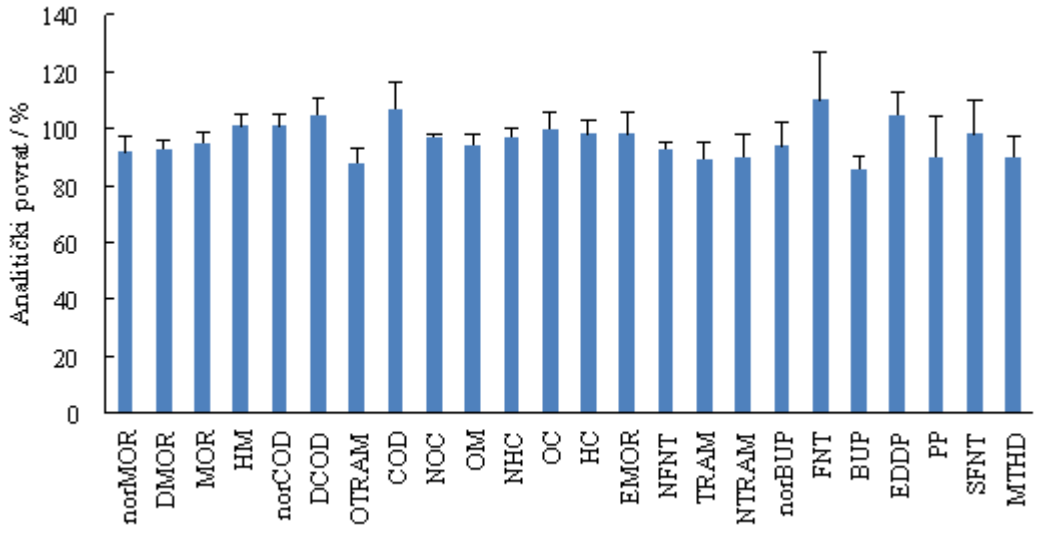
Očekivano, porast udjela organskog otapala u završnom ekstraktu rezultirao je višim analitičkim povratima. Razultati pokazuju da za potpuni povrat ciljanih analita tijekom filtracije udio metanola mora biti najmanje 50 % [50 mmol L^{-1} amonijev acetat (ψ (H_2O, CH_3OH) = 1 : 1)]. To je otapalo, stoga, odabrano kao završno otapalo za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta pripravljenog PLE-ekstrakcijom.

U slučaju uzoraka s visokim sadržajem organske matrice kao što su jako zagađeni sedimenti, suspendirana frakcija nepročišćene otpadne vode i aktivni mulj, sirove ekstrakte potrebno je prije analize LC-MS/MS-om podvrgnuti dodatnom pročišćavanju. Suhi ostatak takvih nepročišćenih ekstrakata nije se u potpunosti mogao otopiti u odabranom završnom otapalu [50 mmol L^{-1} amonijev acetat u ψ (H_2O, CH_3OH) = 1 : 1], a odzivi detekcijskog sustava za surogate opioida u tako pripravljenim ekstraktima bili su zbog supresije ionizacije mnogo niži od odziva u odgovarajućim standardnim otopinama. Također, prisutne interferencije utjecale su nepovoljno na oblik pikova i ponovljivost vremena zadržavanja nekih analita tijekom kromatografskog odjeljivanja. U svrhu optimizacije, uspoređena su tri različita postupka pročišćavanja ekstrakata: a) propuštanje ekstrakata razrijeđenih izvorskom vodom (1 : 10) kroz kolonice Oasis MCX prema protokolu razvijenom za otopljenu frakciju otpadne vode, b) propuštanje bazičnih ekstrakata kroz kolonice Strata NH_2 te c) propuštanje ekstrakata zakiseljenih mravljom kiselinom [ψ (CH_3OH, HCOOH) = 100 : 1] kroz kolonice Strata NH_2. Rezultati modelnih pokusa uz dodatak obilježenih surogata opioida prikazani su na Slici 16.



Slika 16. Relativni odzivi za surogate opioida u modelnim ekstraktima suspendirane tvari iz nepročišćene otpadne vode nakon pročišćavanja ekstrakta upotrebom triju različitih postupaka

Metode a i c pokazale su vrlo pozitivne učinke na kromatografsko odjeljivanje što pokazuje da su glavne intereferencije u ekstraktu bile anionskog karaktera. Iako su sve tri metode osigurale zadovoljavajuće analitičke povrate opioida, između triju postupaka mogu se uočiti i određene razlike. Za većinu analita su bolji odzivi dobiveni nakon propuštanja zakiseljenih ekstrakata kroz kolonice Strata NH_2 (postupak c). Stoga je postupak c odabran za konačnu validaciju metode. Najvažnji nedostatak tog postupka je velik gubitak 6-acetilmorfina te morfinglukuronida koji prelaze u morfin. Analitički povrati postignuti konačno odabranim postupkom pročišćavanja bili su u rasponu između 86 % za buprenorfin do 110 % za fentanil, što ukazuje da propuštanjem kroz kolonice Strata NH_2 ne dolazi do značajnih gubitaka niti jednog opioida (Slika 17).



Slika 17. Srednje vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika iz modelnih uzoraka sedimenta uz pročišćavanje zakiseljenog PLE-ekstrakta na kolonicama Strata NH_2

Posebno je interesantno uočiti da su uparavanjem pročišćenih ekstrakata postignuti vrlo visoki analitički povrati EDDP-a (105 %), što je vjerojatno rezultat zakiseljavanja ekstrakta prije pročišćavanja, čime se smanjuju gubitci prilikom uparavanja. Naime, i neka prethodna istraživanja su pokazala da se dodatkom kiseline u otapalo za otapanje suhog ostatka može pospješiti desorpcija ciljanih bazičnih analita sa staklenih stijenki epruvete[93,94,95]. Ovu pretpostavku je potvrdio i modelni pokus u kojem je ista količina opioida dodana u modelni ekstrakt nakon pročišćavanja (Tablica 16). Usporedba analitičkih povrata istraživanih analita

u bazičnom [ψ (CH_3OH, NH_3) = 1 000 : 0,5] i zakiseljenom metanolu [ψ (CH_3OH, HCOOH) = 1 000 : 1] pokazala je sustavno više povrate u zakiseljenom metanolu, a razlika je bila posebno uvjerljiva za inače vrlo problematični analit EDDP (92 % prema 16 %).

Tablica 16. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata opioidnih analgetika uparavanja u bazičnom i kiselom metanolu. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Analitički povrat uz uparavanje u bazičnom CH_3OH / % ± SD**	**Analitički povrat uz uparavanje u kiselom CH_3OH / % ± SD**
norMOR	72 ± 6	88 ± 10
DMOR	64 ± 5	91 ± 9
MOR	63 ± 5	91 ± 8
HM	69 ± 5	65 ± 11
norCOD	89 ± 7	86 ± 6
DCOD	83 ± 4	90 ± 8
O-DM-TRAM	88 ± 6	95 ± 6
COD	81 ± 4	89 ± 9
NOC	91 ± 8	62 ± 6
OM	76 ± 6	58 ± 8
NHC	88 ± 6	66 ± 5
OC	87 ± 5	63 ± 7
HC	81 ± 8	71 ± 6
EMOR	85 ± 9	93 ± 7
NFNT	82 ± 6	92 ± 8
N-DM-TRAM	74 ± 6	94 ±8
NTRAM	82 ± 6	97 ± 8
norBUP	76 ± 7	86 ± 8
FNT	78 ± 17	100 ± 7
BUP	57 ± 16	84 ± 11
EDDP	16 ± 13	92 ±13
PP	82 ± 18	94 ±18
SFNT	85 ± 13	97 ± 17
MTHD	72 ± 12	92 ± 15

4.1.4. Stabilnost opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u uzorcima otpadnih voda i njihovim ekstraktima

Da bi se mogla pouzdano pratiti raspodjela opioidnih analgetika u okolišu, nužno je poznavati njihovu stabilnost u uzorcima. Naime, tijekom skladištenja uzoraka može doći do transformacijskih procesa koji mogu rezultirati podcjenjivanjem ili precjenjivanjem koncentracija pojedinih analita[60,67,96].

Stoga je preporučljivo, kad god je to tehnički moguće, uzorke obraditi i analizirati u što kraćem vremenu nakon njihova prikupljanja. U slučajevima kada to nije moguće (npr. opsežnija uzorkovanja s velikim brojem istovremeno prikupljenih uzoraka), prikupljeni se uzorci skladište na sniženoj temperaturi, najčešće zamrzavanjem na - 20 °C. Alternativno, uzorci se mogu djelomično obraditi neposredno nakon prikupljanja, tako da se načini samo propuštanje kroz SPE-kolonice (ekstrakcija) koje se, zatim, do dana završne analize (desorpcija, uparavanje i analiza LC-MS/MS-om) čuvaju u zamrzivaču (- 20 °C). Alternativno se, u zamrzivaču (- 20 °C) mogu čuvati i ekstrakti u organskom otapalu.

Kao matrica za ispitivanje stabilnosti opioidnih analgetika u realnim uzorcima odabrana je nepročišćena otpadna voda, koja predstavlja najsloženiju matricu s obzirom na moguće abiotičke i biotičke procese. Svi pokusi provedeni su u triplikatu, a obuhvaćeno je razdoblje skladištenja do 100 dana. Određivanjem preostale koncentracije opioidnih analgetika (izražene kao postotak početne koncentracije) nakon 7, 30, 70 i 100 dana pokazano je da jedna trećina (n = 8) odabranih analita tijekom skladištenja uzoraka otpadnih voda na - 20 °C pokazuje visoku stabilnost (promjena koncentracije < 20 %) čak i nakon duljeg skladištenja (Tablica 17). Ipak, treba naglasiti da je promjena koncentracije značajnog broja analita poput sufentanila, propoksifena, fentanila, norbuprenorfina, norfentanila, *N*-demetil-*cis*-tramadola, etilmorfina, noroksikodona, hidromorfona i norhidrokodona, bila viša od 20 % već nakon 7 dana skladištenja.

Najnestabilniji opioidni spojevi bili su oba glukuronida morfina te 6-acetilmorfin, što je u skladu s očekivanjima i literaturnim podatcima[60]. Koncentracija morfinglukuronida snižena je za više od 50 % nakon 30 dana te se njihova koncentracija nastavila snižavati sve do kraja provedbe eksperimenta. Zanimljivo je napomenuti da je morfin-3-β-D-glukuronid bio nestabilniji od morfin-6-β-D-glukuronida. Slično morfinglukuronidima, zabilježeno je i značajno sniženje koncentracija 6-acetilmorfina (86 %). Treba naglasiti da je sniženje koncentracija morfin-3-β-D-glukuronida, morfin-6-β-D-glukuronida i 6-acetilmorfina bilo praćeno značajnim porastom koncentracije morfina (195 %) nakon 100 dana skladištenja, što se može objasniti intenzivnom retransformacijom konjugiranih metabolita morfina i 6-acetilmorfina u morfin tijekom skladištenja i / ili odmrzavanja uzoraka.

Tablica 17. Stabilnost opioidnih analgetika u nepročišćenoj otpadnoj vodi obogaćenoj s 1 μg L^{-1} analita opioida tijekom skladištenja na - 20 °C, n = 3. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Preostala koncentracija izražena kao postotak početne koncentracije** ± SD			
	7 dana	**30 dana**	**70 dana**	**100 dana**
M3G	40* ± 5	38* ± 4	1* ± 0	0* ± 0
norMOR	84* ± 13	92* ± 10	114* ± 6	112 ± 23
M6G	55* ± 3	28* ± 5	45* ± 5	32* ± 7
DMOR	85* ± 6	74* ± 12	76* ± 9	83* ± 7
MOR	118* ± 16	139* ± 17	183* ± 15	195* ± 19
OM	79* ± 6	90* ± 14	100 ± 16	88* ± 17
HM	76* ± 7	90* ± 8	80* ± 3	71* ± 4
norCOD	83* ± 13	103 ± 22	111 ± 11	119 ± 46
DCOD	79* ± 17	106 ± 17	95 ± 6	85* ± 5
O-DM-TRAM	79 ± 31	120 ± 33	130* ± 9	96 ± 39
COD	83 ± 23	95 ± 20	105 ± 10	118 ± 19
NOC	72* ± 8	86 ± 7	112* ± 21	78* ± 17
NHC	66* ± 8	96 ± 12	112 ± 18	97 ± 12
OC	79* ± 12	89* ± 7	93 ± 11	89* ± 13
6-AM	70* ± 8	59* ± 5	29* ± 1	14* ± 2
HC	78* ± 7	79* ± 5	83* ± 9	60* ± 9
EMOR	85* ± 11	65 ± 26	60* ± 8	69* ± 5
NFNT	75* ± 12	50* ± 12	60* ± 7	53* ± 10
TRAM	91* ± 19	88* ± 21	91 ± 19	59 ± 38
N-DM-TRAM	78* ± 24	98 ± 22	96* ± 8	76 ± 63
norBUP	73* ± 14	70* ± 6	97 ± 11	78 ± 11
FNT	72* ± 1	84* ± 9	87* ± 16	70* ± 12
BUP	67* ± 17	59* ± 11	57* ± 7	57* ± 7
EDDP	82* ± 19	103 ± 18	89* ± 5	80 ± 41
PP	74* ± 15	82* ± 2	92* ± 9	79* ± 21
SFNT	76* ±16	79* ± 12	87* ± 4	73* ± 7
MTHD	80* ± 22	87* ± 4	99 ± 15	78 ± 18

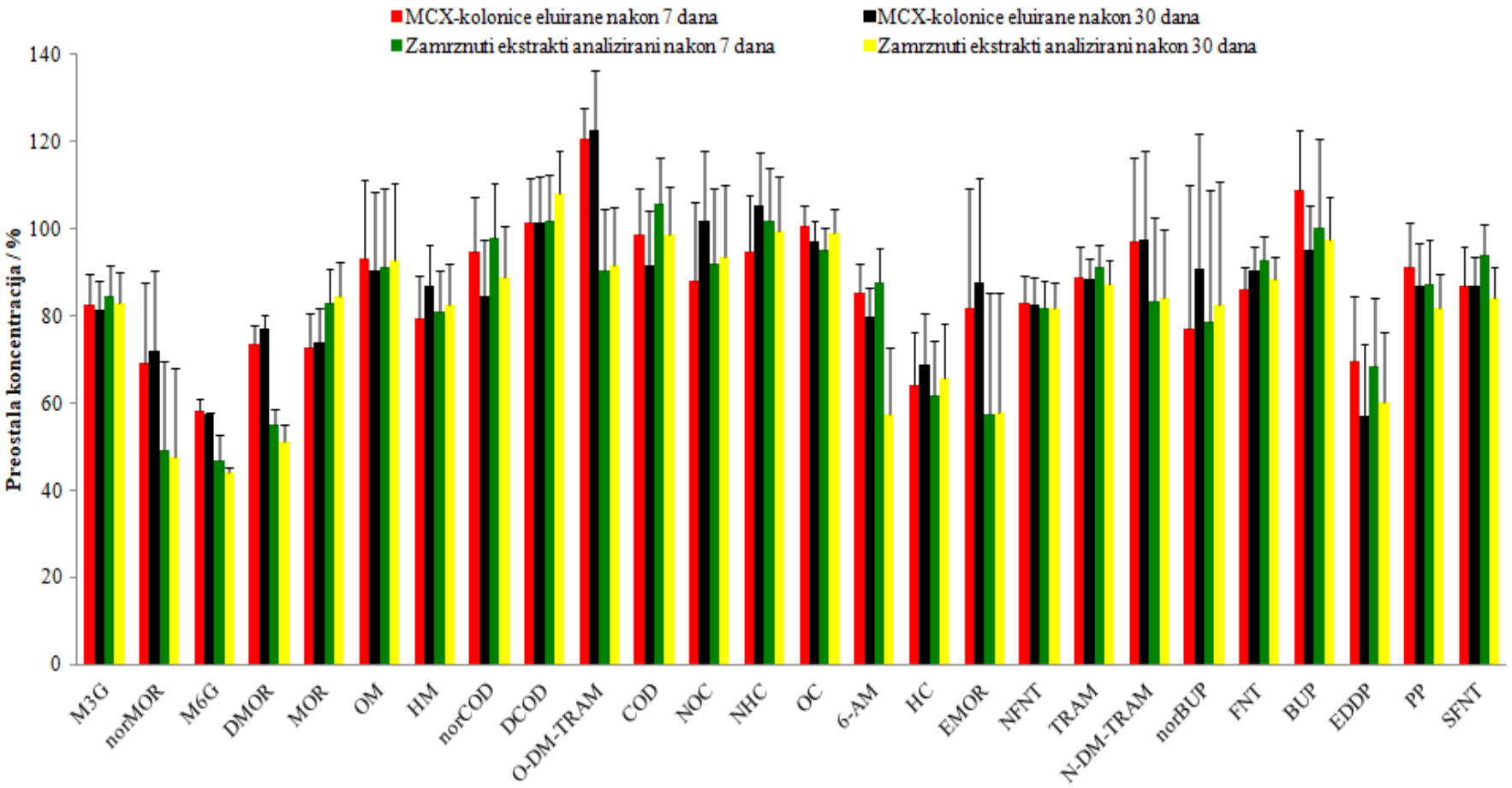
*Značajna promjena (t-test; $p < 0.05$)

U tom kontekstu valja naglasiti da je 6-acetilmorfin ekskluzivni urinarni biomarker konzumacije heroina te je njegova stabilnost u uzorcima otpadnih voda ključna za pouzdanu procjenu konzumacije heroina primjenom koncepta epidemiologija otpadnih voda. Rezultati pokazuju da bi procjena konzumacije heroina na temelju 6-acetilmorfina mogla biti

podcijenjena ako se uzorci zamrzavaju prije ekstrakcije. Nadalje, tijekom provedbe eksperimenta uočeno je i sniženje koncentracije buprenorfina, koje je bilo praćeno povišenjem koncentracije njegovog metabolita norbuprenorfina, što je najvjerovatnije rezultat demetilacije roditeljskog spoja tijekom skladištenja.

Za usporedbu, u dodatnom je pokusu istražena stabilnost opioidnih analgetika u adsorbiranom obliku pohranjivanjem kolonica za ekstrakciju u zamrzivaču (- 20 °C), a kao referencijski uzorci poslužili su ekstrakti pripravljeni eluacijom SPE-kolonica Oasis MCX odmah nakon propuštanja uzoraka. Rezultati su prikazani na Slici 18. Stabilnost većine promatranih analita bila je dobra (sniženje < 20 %), a značajnije promjene koncentracija zabilježene su za morfin-6-β-D-glukuronid i hidrokodon. Zanimljivo je napomenuti da se stabilnost skladištenja u sorbiranom obliku za nekolicinu opioida (morfin-6-β-D-glukuronid, normorfin, dihidromorfin, etilmorfin), pokazala znatno prikladnijom od skladištenja u obliku ekstrakta. Sniženje koncentracije tih osjetljivih opioida u ekstraktima bilo je za etilmorfin 42 %, 6-acetilmorfin 43 %, dihidromorfin 49 % te morfin-6-β-D-glukuronid 56 %. Stabilnost opioidnih analgetika tijekom skladištenja na kolonicama Oasis MCX ispitivali su i Baker i Kasprzyk-Hordern[67] te su zaključili da su analiti u tom obliku stabilni 6 tjedana. Isto tako, González-Mariño i suradnici[12] su pokazali da je većina opioidnih analgetika ukoncentriranih na kolonicama Oasis HLB bila stabilna tijekom 3 mjeseca na - 20 ^{o}C.

Zaključno, temeljem provedenih eksperimenata u ovom radu i literaturnih podataka, kao najbolji način za očuvanje integriteta uzorka odabrano je skladištenje uzoraka u sorbiranom obliku na kolonicama Oasis MCX na - 20 °C te njihova eluacija na dan analize. Pri tom, kad je to god to moguće, SPE-ekstrakciju treba načiniti unutar 24 h od uzorkovanja.



Slika 18. Stabilnost opioidnih analgetika tijekom skladištenja na - 20 °C na kolonicama Oasis MCX te u ekstraktima nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi tijekom 7 i 30 dana. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

4.1.5. Validacija analitičkih metoda za određivanje opioidnih analgetika u otopljenoj i čvrstoj frakciji otpadnih i površinskih voda

Validacija metode za određivanje opioidnih analgetika u otopljenoj frakciji nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda obuhvaćala je sljedeće parametre: linearnost, instrumentne granice određivanja, analitički povrat analita, utjecaj matrice, točnost, preciznost i granice kvantitativnog određivanja metode. Pokusi validacije provedeni su prema postupku koji je detaljno opisan u poglavlju 3.4., a rezultati su prikazani u Tablici 18.

Za većinu ciljanih analita odziv detekcijskog sustava bio je linearan u rasponu od 0,5 ng mL^{-1} do 500 ng mL^{-1}. Iznimke su morfin i njemu srodni spojevi, normorfin i dihidromorfin, za koje je raspon linearnosti bio uži (od 0,5 ng mL^{-1} do 200 ng mL^{-1}), dok je, nasuprot tome, raspon linearnosti odziva za tramadol i njegove metabolite *O*-demetil-*cis*-tramadol te *N*-demetil-*cis*-tramadol obuhvatio šire koncentracijsko područje (do 1 500 ng mL^{-1}). Instrumentne granice detekcije varirale su u širokom rasponu od 0,02 pg za etilmorfin i *O*-demetil-*cis*-tramadol do 15 pg za propoksifen.

Granice kvantitativnog određivanja analita ovise, osim o instrumentnoj granici detekcije, o stupnju ukoncentriravanja uzorka, gubitcima tijekom obrade uzorka i složenosti matrice, pri čemu se niže granice određivanja postižu za uzorke s jednostavnijom matricom. Na temelju provedenih validacijskih pokusa, granice kvantitativnog određivanja analita u nepročišćenoj otpadnoj vodi bile su u rasponu od 0,3 ng L^{-1} do 2,6 ng L^{-1}, u pročišćenoj otpadnoj vodi od 0,2 ng L^{-1} do 1,9 ng L^{-1} te u riječnoj vodi od 0,1 ng L^{-1} do 0,8 ng L^{-1}.

Validacijom utjecaja matrice na intenzitet kromatografskog signala utvrđeno je da sve ispitivane matrice imaju srazmjerno slab učinak, osim za najpolarnije opioide i u pravilu se radilo o supresiji odziva. Za većinu analiziranih opioida supresija je bila je ispod 20 %. Najveća supresija odziva zabilježena je u nepročišćenoj otpadnoj vodi te u riječnoj vodi za morfin-3-β-D-glukuronid, morfin-6-β-D-glukuronid i normorfin (do 38 %). To se može dijelom objasniti ranom eluacijom tih analita, odnosno koeluacijom s polarnim nečistoćama koji se rano eluiraju s kolone. Međutim, značajna supresija signala određena je i za buprenorfin (- 31 %) i njegov metabolit norbuprenorfin (- 26 %). Zanimljivo je da je za neke od najlipofilnijih opioida koji se s kromatografske kolone eluiraju vrlo kasno, kao što su metadon i sufentanil, zabilježeno povećanje inteziteta signala do 27 % u ekstraktima pročišćene otpadne vode. Srazmjerno nizak utjecaj matrice treba zahvaliti selektivnom načinu ekstrakcije, upotrebom sekvencijalne eluacije s kolonica Oasis MCX.

Tablica 18. Parametri validacije metode određivanja opioidnih analgetika u otopljenoj frakciji otpadnih i prirodnih voda. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit				**Nepročišćena otpadna voda**					**Pročišćena otpadna voda**					**Riječna voda**				
	Linearnost / ng L^{-1}	r^2	IGD / pg	Prec. / %	Analitički povrat / %	Utjecaj matr. / %	Točn. / %	GK / ng L^{-1}	Prec. / %	Analitički povrat / %	Utjecaj matr. / %	Točn. / %	GK / ng L^{-1}	Prec. / %	Analitički povrat / %	Utjecaj matr. / %	Točn. / %	GK / ng L^{-1}
M3G	0,5 – 500	0,999	0,4	4	90	- 25	111	0,3	2	78	- 18	109	0,2	3	82	- 38	94	0,1
norMOR	0,5 – 200	1,000	0,2	3	89	- 27	102	0,9	4	82	- 11	106	0,5	5	81	- 25	80	0,2
M6G	0,5 – 500	0,999	1,0	1	89	- 17	119	0,7	11	73	- 9	96	0,4	4	79	- 24	82	0,2
DMOR	0,5 – 200	0,999	0,07	4	92	- 15	124	1,0	1	84	- 5	119	0,6	4	86	- 9	107	0,3
MOR	0,5 – 200	0,997	0,1	3	95	- 21	125	0,9	4	79	- 7	109	1,1	5	73	- 13	100	0,3
OM	0,5 – 500	0,999	1,0	2	91	- 16	117	0,3	4	81	- 8	114	0,2	3	87	- 15	98	0,1
HM	0,5 – 500	0,999	0,05	4	88	- 28	110	2,6	3	81	- 8	100	1,7	7	90	- 16	98	0,8
norCOD	0,5 – 500	0,999	0,3	2	92	- 12	106	1,8	4	84	5	113	1,1	4	85	- 15	75	0,4
DCOD	0,5 – 500	0,999	0,3	2	93	- 1	120	2,8	1	85	4	112	1,5	3	87	2	95	0,7
O-DM-TRAM	0,5 – 1500	0,999	0,02	3	97	1	155	0,4	5	79	-6	93	0,2	3	87	3	98	0,1
COD	0,5 – 500	1,000	0,1	2	91	- 7	116	0,4	2	81	- 15	102	0,2	3	91	0	83	0,1
NOC	0,5 – 500	0,998	5,0	2	89	- 9	105	2,5	5	81	8	100	1,5	3	85	- 11	91	0,6
NHC	0,5 – 500	1,000	0,07	2	88	- 6	104	1,1	3	84	15	107	0,7	3	92	- 16	86	0,3
OC	0,5 – 500	0,999	1,0	1	90	4	115	0,4	6	88	10	120	0,2	3	89	- 2	98	0,1
6-AM	0,5 – 500	0,998	0,2	3	93	- 11	119	0,4	5	93	8	118	0,2	4	102	- 8	94	0,1
HC	0,5 – 500	0,994	0,08	1	88	- 5	107	1,1	3	86	4	101	0,6	4	96	- 8	100	0,3
EMOR	0,5 – 500	0,999	0,02	2	91	- 4	115	3,5	1	88	6	120	1,9	11	87	- 5	116	0,8
NFNT	0,5 – 500	0,999	0,05	4	91	2	120	0,8	4	84	20	111	0,5	6	86	- 3	94	0,2
N-DM-TRAM	0,5 – 1500	1,000	0,3	8	63	- 4	106	1,2	5	83	- 16	79	0,5	4	92	7	101	0,3
NTRAM	0,5 – 1500	1,000	0,05	3	92	0.2	116	1,2	6	87	5	103	0,6	3	87	1	93	0,3
norBUP	0,5 – 500	0,998	5,0	4	91	- 26	113	0,6	4	86	5	74	0,4	3	87	- 13	89	0,2
FNT	0,5 – 500	0,999	0,04	3	90	- 12	114	0,4	6	89	18	120	0,2	7	87	0	97	0,1
BUP	0,5 – 500	0,995	0,4	1	86	- 31	115	0,3	8	87	2	114	0,2	2	84	- 10	98	0,1
EDDP	0,5 – 500	0,999	0,08	15	44	- 9	104	0,7	4	116	7	109	0,4	0	109	1	103	0,1
PP	0,5 – 500	0,999	15,0	2	79	- 19	108	0,6	5	89	14	109	0,5	4	90	- 1	99	0,2
SFNT	0,5 – 500	0,997	0,06	3	89	- 4	108	0,8	5	91	27	117	0,5	4	93	- 3	98	0,2
MTHD	0,5 – 500	0,997	0,1	6	79	- 8	91	2,6	4	90	24	110	1,7	2	89	3	102	0,1

IGD – instrumentna granica detekcije**, prec**. – preciznost (SD), **utjecaj matr**. – utjecaj matrice**, točn**. – točnost, **GK** – granica kvantitativnog određivanja

Iz svih triju ispitivanih vodenih matrica postignuti su zadovoljavajuće visoki analitički povrati ciljanih spojeva i to u rasponu od 79 % do 97 % iz nepročišćene otpadne vode, od 73 % do 116 % iz pročišćene otpadne vode te od 73 % do 102 % iz riječne vode. Nešto niži analitički povrati iz nepročišćene otpadne vode određeni su za dva spoja, EDDP (44 %) te tramadol (63 %). Pri tom treba naglasiti da analitički povrati odražavaju učinkovitost ekstrakcije, ali i gubitke prilikom obrade ekstrakta, koji za neke analite mogu biti značajni (EDDP).

Ukupni gubitci tijekom priprave uzoraka te supresija odziva zbog utjecaja matrice mogu značajno utjecati na promjene intenziteta signala te vanjsko umjeravanje nije optimalan način za kvantitativnu evaluaciju kromatograma. Zbog toga je u razvijenom analitičkom postupku primijenjena metoda unutarnjeg standarda. U tu svrhu primijenjeno je 19 izotopno obilježenih surogata (Tablica 6) koji su uspješno kompenzirali promjene odziva za pojedine analite. Treba naglasiti da su izotopno obilježeni surogati dodani u uzorak prije analize te su prošli sve faze postupka kao i analiti. Za analite za koje identični izotopno obilježeni standardi nisu bili dostupni (normorfin, morfin-6-β-D-glukuronid, dihidromorfon, norkodein, *O*-demetil-*cis*-tramadol, noroksikodon, etilmorfin i *N*-demetil-*cis*-tramadol) upotrijebljeni su deuterirani surogati koji su odabrani na temelju sličnosti kemijskih struktura i vremena zadržavanja u kromatografskoj koloni. Dodatan kriterij za odabir prikladnog izotopno obilježenog standarda bila je sličnost analitičkih povrata analita i surogata, utvrđena preliminarnim eksperimentom. Kvantitativna analiza derivata morfina, odnosno normorfina i dihidromorfina, provedena je upotrebom izotopno obilježenog morfina, odnosno MOR-d^3, međutim taj surogat nije bio prikladan za kvantitativnu analizu etilmorfina. Umjesto MOR-d^3, prikladnijim surogatom za određivanje etilmorfina pokazao se deuterirani norfentanil. Slično je uočeno i za dva derivata tramadola, pa je tako *O*-demetil-*cis*-tramadol kvantificiran primjenom deuteriranog dihidrokodeina, dok je *N*-demetil-*cis*-tramadol kvantificiran pomoću izotopno obilježenog norfentanila.

Pravilnim odabirom odgovarajućih nadomjesnih izotopno obilježenih surogata omogućeno je određivanje opioidnih analgetika uz vrlo visoku točnost u svim ispitivanim matricama (od 80 % do 100 %). Iznimke su bile niže točnosti određivanja norbuprenorfina u pročišćenoj otpadnoj vodi (74 %), norkodeina u riječnoj vodi (75 %) te *O*-demetil-*cis*-tramadola (155 %) u nepročišćenoj otpadnoj vodi.

Preciznost razvijene metode bila je za pretežiti dio ciljnih analita bolja od 10 % u svim ispitivanim matricama, a iznimke su bili EDDP (15 % u nepročišćenoj otpadnoj vodi) te M6G (11 % u pročišćenoj otpadnoj vodi).

Validacija metode za određivanje opioidnih analgetika u čvrstoj frakciji otpadnih i prirodnih voda obuhvaćala je iste pokazatelje kao i za uzorke voda (linearnost metode, analitički povrat ekstrakcije, utjecaj matrice i točnost), a posebna pozornost je posvećena gubitcima tijekom obrade ekstrakta. Validacija je provedena prema protokolima prikazanim u poglavlju 3.4., a rezultati su prikazani u Tablici 19.

Analitički povrati većine analita bili su u rasponu od 80 % do 110 % u sve tri ispitivane matrice (aktivni mulj, suspendirana tvar, sediment). Niži analitički povrati iz uzoraka sedimenta određeni su za nekoliko spojeva srodnih morfinu, uključujući normorfin (26 %), hidromorfon (47 %) te oksimorfon (62 %). Analitički povrati gotovo svih analita iz suspendirane frakcije otpadne vode te aktivnog mulja bili su oko 90 %, međutim, uočena su i neka odstupanja. Tako su analitički povrati EDDP-a iz čvrste frakcije otpadnih i prirodnih voda bili sustavno niži: 52 %, 69 % te 87 %. Na temelju prethodnih iskustava, niži povrati EDDP-a pripisani su gubitcima tijekom obrade uzoraka, odnosno tijekom uparavanja ekstrakta u bazičnom metanolu pri čemu se taj analit čvrsto adsorbira na staklene stijenke epruvete. Stoga je velika pozornost posvećena tehnici uparavanja koja je detaljno opisana u poglavlju 3.3.1.2. Za ostale analite gubitci su bili uglavnom manji od 20 %.

U suspendiranoj frakciji nepročišćene otpadne vode i aktivnog mulja zabilježen je mnogo veći utjecaj matrice u odnosu na nezagađeni sediment. U uzorcima sedimenta, za dio opioidnih analgetika zabilježeno je povećanje kromatografskog signala (do 29 % za dihidrokodein), dok je kod većine analita prevladavala supresija signala (do 46 % za buprenorfin). Zanimljivo je napomenuti da je za gotovo sve analite u ekstraktima čvrste frakcije aktivnog mulja uočeno povećanje intenziteta odziva dok je, nasuprot tome, u ekstraktima suspendirane tvari nepročišćene otpadne vode detektirana izraženija supresija. Zabilježeni utjecaj matrice značajno je niži u odnosu na literaturno dostupne podatke. Tako su primjerice Baker i Kasprzyk-Hordern[71] zabilježili povećanje intenziteta odziva signala do 69 % za kodein i normorfin, dok je izrazita supresija signala zabilježena za propoksifen (od 191 %), odnosno za *N*-demetil-*cis*-tramadol (300 %).

U svim je matricama čvrste faze postignuta vrlo visoka točnost određivanja, koja je, u suspendiranoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda bila u rasponu od 85 % za sufentanil do

120 % za kodein. Visoka točnost osigurana je, prije svega, pažljivim odabirom najprikladnijih izotopno obilježenih referencijskih tvari. Naime, pokazalo se da u pojedinim slučajevima, kada identični izotopno obilježeni surogati nisu bili dostupni, nije bilo moguće primijeniti iste surogate koji su se pokazali prikladnim u analizi otopljene frakcije. Tako je, primjerice, za kvantitativnu analizu *O*-demetil-*cis*-tramadola u otopljenoj frakciji pridružen izotopno obilježen dihidrokodein (DCOD-d^3), dok je u partikulatnoj frakciji u tu svrhu upotrijebljen deuterirani hidromorfon (HM-d^3). Takvo ponašanje uočeno je i za drugi metabolit tramadola, *N*-demetil-*cis*-tramadol, koji je u čvrstim uzorcima određen primjenom izotopno obilježenog norbuprenorfina (norBUP-d^3), dok je u otopljenoj frakciji u tu svrhu primijenjivan surogat norfentanila (NFNT-d^5). Nadalje, za analizu etilmorfina u čvrstoj frakciji odabran je deuterirani norhidrokodon (NHC-d^3) umjesto deuteriranog norfentanila.

Validacijom razvijenih metoda je potvrđeno da analitičke metode razvijene u ovom radu dostižu ili premašuju svojstva najboljih do sada razvijenih analitičkih metoda za određivanje opioida u vodenom okolišu[17] te omogućavaju pouzdanu kvantitativnu multirezidualnu analizu tragova vrlo velikog broja opioidnih analgetika u složenim tipovima uzoraka iz vodenog okoliša.

Tablica 19. Validacija metode za određivanje opioidnih analgetika u čvrstoj frakciji otpadnih i prirodnih voda, GK – granica kvantitativnog određivanja. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

			Aktivni mulj					Suspendirana tvar nepročišćene otpadne vode					Sediment				
Analit	Linearnost / ng L^{-1}	r^2	Analitički povrat / %	Gubitak obradom / %	Utjecaj matrice / %	Točnost / %	GK / ng L^{-1}	Analitički povrat / %	Gubitak obradom / %	Utjecaj matrice / %	Točnost / %	GK / ng L^{-1}	Analitički povrat / %	Gubitak obradom / %	Utjecaj matrice / %	Točnost / %	GK / ng L^{-1}
norMOR	0,5 – 200	0,992	83	17	5	107	1,2	101	12	- 36	92	1,0	26	18	- 33	72	1,1
DMOR	0,5 – 200	0,996	83	15	8	122	0,9	103	4	- 40	102	1,3	72	3	- 9	115	1,0
MOR	0,5 – 200	0,996	84	15	6	119	0,3	112	-14	- 32	101	0,4	62	10	- 5	109	0,4
HM	0,5 – 500	0,997	85	31	10	91	0,9	103	24	- 34	92	0,6	47	12	- 12	96	0,8
norCOD	0,5 – 500	0,994	88	17	37	144	0,6	94	0	- 41	113	0,5	99	13	- 4	70	0,6
DCOD	0,5 – 500	0,995	89	12	24	106	0,5	111	9	- 44	90	0,5	98	2	29	121	0,7
O-DM-TRAM	0,5 – 500	0,999	89	17	41	118	0,5	102	7	- 29	101	0,5	104	0	- 8	98	0,6
COD	0,5 – 500	0,998	89	14	20	139	0,5	103	7	- 40	120	0,6	103	5	24	91	0,7
NOC	0,5 – 500	0,997	91	33	35	100	0,7	115	18	- 36	92	0,6	85	6	- 1	126	1,7
OM	0,5 – 500	0,998	80	31	28	110	0,9	101	19	- 33	101	1,2	62	10	- 22	96	1,6
NHC	0,5 – 500	0,998	92	31	55	117	1,2	95	12	- 34	101	1,1	77	20	- 5	102	1,2
OC	0,5 – 500	0,996	85	30	32	120	1,4	101	12	- 38	102	0,9	94	7	- 12	94	1,7
HC	0,5 – 500	0,997	94	30	22	102	1,5	101	9	- 43	95	1,3	82	5	18	120	0,9
EMOR	0,5 – 500	0,997	92	12	21	131	1,8	114	12	- 45	97	1,6	106	4	21	102	0,9
NFNT	0,5 – 500	0,996	88	18	34	110	1,3	111	8	- 41	97	1,4	99	17	- 5	104	1,2
TRAM	0,5 – 500	0,999	94	19	40	111	0,5	110	12	- 32	106	0,4	104	19	- 6	103	0,5
N-DM-TRAM	0,5 – 500	0,998	86	17	34	113	0,5	111	14	- 35	114	0,4	105	5	- 14	114	0,3
norBUP	0,5 – 500	0,994	79	23	31	108	1,1	117	7	- 51	94	0,3	98	18	- 28	119	0,4
FNT	0,5 – 500	0,995	85	15	- 12	82	0,9	101	17	- 38	97	0,8	104	4	- 2	127	0,7
BUP	0,5 – 500	0,993	78	12	- 20	124	1,0	93	11	- 40	113	1,1	108	7	- 46	108	0,9
EDDP	0,5 – 500	0,998	52	41	25	111	0,5	87	52	- 35	93	0,4	69	69	- 12	94	0,5
PP	0,5 – 500	0,997	73	12	- 16	118	0,6	97	8	- 36	112	0,8	112	7	- 2	105	0,7
SFNT	0,5 – 500	0,998	80	17	- 9	94	0,4	118	14	- 42	85	0,4	107	4	- 8	91	0,3
MTHD	0,5 – 500	0,999	84	21	12	123	0,5	102	11	- 34	94	0,4	99	4	- 20	98	0,5

4.2. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim i površinskim vodama

U okviru ovog rada istražena je rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u vodenom okolišu s naglaskom na šire područje Grada Zagreba. Terenska istraživanja obuhvatila su detaljno proučavanje rasprostranjenosti i ponašanja opioidnih analgetika u otpadnim vodama, koja su provedena u CUPOVZ-u tijekom četiri godine. Isto tako provedeno je sustavno jednogodišnje istraživanje rasprostranjenosti opioida u rijeci Savi i njezinim pritocima na odsječku između slovenske granice i Siska. Dinamika i način prikupljanja uzoraka otpadnih i površinskih voda opisani su u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2.

4.2.1. Rasprostranjenost opioidnih analgetika i njihovih metabolita u otpadnim vodama Grada Zagreba

Istraživanje rasprostranjenosti 27 opioidnih analgetika i njihovih metabolita u nepročišćenim i pročišćenim komunalnim otpadnim vodama provedeno je u CUPOVZ-u od 2017. do 2020. godine. Učestalost određivanja, koncentracijski rasponi, srednje vrijednosti te medijani koncentracija istraženih opioida određenih u otopljenoj frakciji otpadnih voda prikazani su u Tablici 20, dok su pojedinačni rezultati prikazani u Dodatku (Tablice I-X).

Tablica 20. Rasprostranjenost i koncentracije analiziranih opioida u otopljenoj frakciji uzoraka nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda prikupljenih u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba (CUPOVZ) od 2017. do 2020. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

	Nepročišćena otpadna voda 2017. – 2020. (n_1 = 107)				**Pročišćena otpadna voda 2017. – 2020.** (n_1 = 107)			
Analit	n_2	Koncentracijski raspon / ng L^{-1}	Srednja vrijednost / ng L^{-1} ± SD	Medijan / ng L^{-1}	n_2	Koncentracijski raspon / ng L^{-1}	Srednja vrijednost / ng L^{-1} ± SD	Medijan / ng L^{-1}
M3G	102	0,3 – 1,7	12,5 ± 9	9,4	29	< 0,2 – 6,0	1,9 ± 1	1,3
norMOR	107	2,1 – 35,5	14,0 ± 7	14,1	102	< 0,5 – 20,5	4,9 ± 3	4,0
M6G	72	0,7 – 7,4	3,4 ± 1	3,3	19	< 0,4 – 5,8	1,9 ± 1	1,4
DMOR	0	< 1,0	< 1,0 ± 0	< 1,0	0	< 0,6	< 0,6 ± 0	< 0,6
MOR	107	24,1 – 177,6	102,8 ± 38	101,1	107	6,4 – 91,2	32,1 ± 19	28,1
OM	0	< 0,3	< 0,3 ± 0	< 0,3	0	< 0,2	< 0,2 ± 0	< 0,2
HM	0	< 2,6	< 2,6 ± 0	< 2,6	0	< 1,7	< 1,7 ± 0	< 1,7
norCOD	107	2,2 – 28,0	13,3 ± 5	12,4	107	1,7 – 28,9	12,4 ± 6	10,8
DCOD	0	< 2,8	< 2,8 ± 0	< 2,8	0	< 1,5	< 1,5 ± 0	< 1,5
O-DM-TRAM	107	124,4 – 983,8	620,2 ± 191	651,6	107	111,0 – 1304,5	650,2 ± 211	675,3
COD	107	26,2 – 387,6	164,3 ± 59	166,8	107	25,1 – 733,7	111,6 ± 78	99,3
NOC	0	< 2,5	< 2,5 ± 0	< 2,5	0	< 1,5	< 1,5 ± 0	< 1,5
NHC	0	< 1,1	< 1,1 ± 0	< 1,1	0	< 0,7	< 0,7 ± 0	< 0,7
OC	0	< 0,4	< 0,4 ± 0	< 0,4	0	< 0,2	< 0,2 ± 0	< 0,2
6-AM	107	2,4 – 21,1	6,1 ± 3	5,6	42	< 0,2 – 3,1	1,6 ± 0	1,5
HC	0	< 1,1	< 1,1 ± 0	< 1,1	0	< 0,6	< 0,6 ± 0	< 0,6
EMOR	0	< 3,5	< 3,5 ± 0	< 3,5	0	< 1,9	< 1,9 ± 0	< 1,9
NFNT	0	< 0,8	< 0,8 ± 0	< 0,8	0	< 0,5	< 0,5 ± 0	< 0,5
TRAM	107	282,0 – 2059,9	819,3 ± 337	770,3	107	283,0 – 2337,5	752,0 ± 322	706,1
N-DM-TRAM	107	57,3 – 373,8	195,0 ± 60	197,3	107	52,7 – 475,4	205,1 ± 72	210,5
norBUP	0	< 0,6	< 0,6 ± 0	< 0,6	0	< 0,4	< 0,4 ± 0	< 0,4
FNT	0	< 0,4	< 0,4 ± 0	< 0,4	0	< 0,2	< 0,2 ± 0	< 0,2
BUP	96	< 0,3-22,4	6,5 ± 3	5,8	90	< 0,2 – 11,1	3,8 ± 2	3,6
EDDP	107	67,0 – 188,3	126,0 ± 31	130,5	107	45,3 – 186,7	117,1 ± 32	112,2
PP	0	< 0,6	< 0,6 ± 0	< 0,6	0	< 0,5	< 0,5 ± 0	< 0,5
SFNT	0	< 0,8	< 0,8 ± 0	< 0,8	0	< 0,5	< 0,5 ± 0	< 0,5
MTHD	107	29,6 – 107,0	64,0 ± 17	66,5	107	20,3 – 84,9	51,1 ± 13	49,6

***n*₁** – broj analiziranih uzoraka; ***n*₂** – broj uzoraka u kojima je određena mjerljiva koncentracija pojedinog analita

Za 13 analita mjerljiva koncentracija određena je u barem jednom uzorku nepročišćenih otpadnih voda, dok je koncentracija preostalih 14 analita bila ispod granice kvantitativnog određivanja u svih 107 analiziranih uzoraka. Opioidni spojevi koji nisu bili detektabilni u nepročišćenim otpadnim vodama uključivali su dihidromorfin, oksimorfon, hidromorfon, dihidrokodein, noroksikodon, norhidrokodon, oksikodon, hidrokodon, etilmorfin, norfentanil, norbuprenorfin, fentanil, propoksifen i sufentanil što vjerojatno ukazuje na nisku prevalenciju njihove upotrebe u Zagrebu. Takvo je zapažanje u skladu s većinom prethodnih istraživanja[42,21,44], no treba ukazati da su relativno visoke koncentracije dihidrokodeina (330 ng L^{-1})[47], hidromorfona (42 ng L^{-1})[4] i hidrokodona (70 ng L^{-1})[45] nađene u pojedinim otpadnim vodama u SAD-u i Njemačkoj.

Iako je u analiziranim otpadnim vodama u mjerljivim koncentracijama detektirano 13 opioidnih analgetika i njihovih metabolita, treba naglastiti da ti detektirani spojevi najvjerojatnije potječu od manjeg broja izvornih opioida, koji se kod nas najčešće upotrebljavaju, uključujući morfin, kodein, tramadol, buprenorfin i metadon.

Svi prikupljeni uzorci nepročišćenih otpadnih voda sadržavali su mjerljive koncentracije 10 analita, uključujući normorfin, morfin, norkodein, kodein, 6-acetilmorfin, metadon, EDDP, tramadol, *O*- i *N*-demetil-*cis*-tramadol, dok je u većini uzoraka određen i buprenorfin (89 %), morfin-3-β-D-glukuronid (96 %) te morfin-6-β-D-glukuronid (66 %). Najviše masene koncentracije određene su za tramadol (γ = 2,1 μg L^{-1}) i njegove metabolite, *O*-demetil-*cis*-tramadol (γ = 984 ng L^{-1}) i *N*-demetil-*cis*-tramadol (γ = 374 ng L^{-1}). Prosječne koncentracije ostalih detektiranih opioidnih spojeva, uključujući morfin (γ = 103 ± 38 ng L^{-1}), kodein (γ = 164 ± 59 ng L^{-1}), normorfin (γ = 14 ± 7 ng L^{-1}), 6-acetilmorfin, (γ = 6,1 ± 3 ng L^{-1}) i buprenorfin (γ = 6,5 ± 3 ng L^{-1}), bile su znatno niže. Iako se u literaturi može naći malo primjera sveobuhvatne analize opioidnih spojeva u otpadnoj vodi[17], pregled rezultata iz različitih istraživanja[2,3,18,21,40,41,43] ukazuje da se u komunalnim otpadnim vodama mogu očekivati slični odnosi koncentracija pojedinih opioida i njihovih metabolita.

Srazmjerno povišene koncentracije tramadola i njegovih metabolita u skladu su s podatcima Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) prema kojima je tramadol među najčešće primjenjivanim opioidnim analgeticima u Hrvatskoj[36], kao i s dostupnim literaturnim podatcima podatcima o rasprostranjenosti tramadola i drugih opioida u komunalnim otpadnim vodama[17,43,44,47]. Međutim, treba naglasiti da je koncentracija lijeka u otpadnoj vodi rezultat kombinacije više čimbenika, pri čemu, osim stope potrošnje izražene

brojem definiranih dnevnih doza na 1 000 stanovnika na dan (DDD / 1 000 stanovnika / dan), na rezultat utječe i veličina DDD-a. Naime, ovisno o lijeku, veličine DDD-a pojedinih aktivnih tvari međusobno se mogu višestruko razlikovati (Tablica 2). Osim toga, važno je istaknuti da, kod lijekova s različitom bioraspoloživošću, DDD može varirati ovisno o putu primjene (npr. oralno, intravenozno ili subligvalno), a konačna koncentracija u otpadnoj vodi ovisi i o metaboličkim putevima svakog pojedinog lijeka te njegovoj stabilnosti i fizikalno-kemijskom ponašanju nakon unošenja u otpadnu vodu.

Kombinacija gore navedenih čimbenika može objasniti nepodudarnosti između stvarno izmjerenih koncentracija i koncentracija očekivanih na temelju stope potrošnje izražene kao broj DDD / 1 000 stanovnika / dan prema podatcima HALMED-a. Tako je, na primjer, stopa potrošnje fentanila izražena u broju DDD / 1 000 stanovnika / dan bila samo od 3 do 4 puta niža od stope potrošnje tramadola, ali je koncentracija fentanila u svim prikupljenim uzorcima otpadne vode bila niža od granice određivanja. To se velikim dijelom može objasniti 250 do 500 puta manjom veličinom DDD-a fentanila u odnosu na tramadol. Nadalje, treba napomenuti da je udio metabolita tramadola u ukupnoj koncentracija tramadola i njegovih derivata vrlo visok (50 ± 43 %), što znatno utječe na vjerojatnost njihove detekcije. Visok postotak (66 ± 44 %) metaboličke transformacije u prevladavajući metabolit (EDDP) utvrđen je i za metadon. Takvi primjeri jasno ukazuju na nužnost uključivanja metabolita opioida u sveobuhvatnu procjenu okolišnog rizika vezanog uz primjenu opioida[9].

U kontekstu procjene prevalencije upotrebe pojedinih opioida sa sličnom terapijskom primjenom, zanimljivo je usporediti koncentracije metadona i buprenorfina, koji se uglavnom upotrebljavaju u nadomjesnoj terapiji ovisnika o opijatima. Ukupna prosječna koncentracija metadona i njegovog metabolita EDDP-a (oko 190 ng L^{-1}) bila je znatno viša nego koncentracija buprenorfina i njegovog glavnog metabolita (γ = 6,5 ng L^{-1}) što je u skladu sa znatno višom stopom potrošnje i veličinom DDD-a za metadon u odnosu na buprenorfin (Tablica 2). Prema dostupnim literaturnim podatcima ovakav odnos nije karakterističan samo za Hrvatsku. Primjerice, u češkim otpadnim vodama su koncentracije buprenorfina bile ispod granice određivanja[44], dok su Skees i suradnici[4] izmjerili 14 ng L^{-1} u SAD-u, a Baker i suradnici[17] 33 ng L^{-1} u UK-u. U istim istraživanjima izmjerene koncentracije metadona bile su znatno više (γ = 16 ng L^{-1}, 36 ng L^{-1}, 88 ng L^{-1})[44,4,17], što potvrđuje prethodnu konstataciju.

Mjerljive koncentracije opioida detektirane su i u pročišćenim otpadnim vodama Grada Zagreba (Tablica 20), pri čemu su, očekivano, dominirali isti opioidni spojevi koji su

detektirani u nepročišćenim otpadnim vodama. Morfin (γ = od 6,4 ng L^{-1} do 91 ng L^{-1}), norkodein (γ = od 1,7 ng L^{-1} do 29 ng L^{-1}), kodein (γ = od 25 ng L^{-1} do 734 ng L^{-1}), tramadol (γ = od 283 ng L^{-1} do 2 338 ng L^{-1}), *O*-demetil-*cis*-tramadol (γ = od 111 ng L^{-1} do 1 305 ng L^{-1}), *N*-demetil-*cis*-tramadol (γ = od 53 ng L^{-1} do 475 ng L^{-1}), EDDP (γ = od 45 ng L^{-1} do 187 ng L^{-1}) i metadon (γ = od 20 ng L^{-1} do 85 ng L^{-1}) bili su mjerljivi u svim uzorcima, dok je 6-acetilmorfin detektiran u 39 % uzoraka. Neki od uzoraka sadržavali su i niske koncentracije morfin-3-β-D-glukuronida (γ = od < 0,2 ng L^{-1} do 6 ng L^{-1}), normorfina (γ = od < 0,5 ng L^{-1} do 21 ng L^{-1}), morfin-6-β-D-glukuronida (γ = od < 0,4 ng L^{-1} do 5,8 ng L^{-1}), 6-acetilmorfina (γ = od < 0,2 ng L^{-1} do 3,1 ng L^{-1}) i buprenorfina (γ = od < 0,2 ng L^{-1} do 11 ng L^{-1}).

Kao i u nepročišćenim otpadnim vodama, najviše prosječne masene koncentracije u sekundarnom efluentu zabilježene su za tramadol (γ = 752 ± 322 ng L^{-1}) te njegove metabolite *O*-demetil-*cis*-tramadol (γ = 650 ± 211 ng L^{-1}) i *N*-demetil-*cis*-tramadol (γ = 205 ± 72 ng L^{-1}). Slične koncentracije tramadola i njegovih metabolita određene su u pročišćenim otpadnim vodama i u drugim zemljama[43,44,47]. Tako su npr. Hummel i suradnici[47] odredili koncentraciju tramadola od 610 ng L^{-1}, dok su Baker i suradnici[43] izvijestili o 739 ng L^{-1} tramadola i 433 ng L^{-1} *N*-demetil-*cis*-tramadola. Relativno visoke prosječne masene koncentracije u pročišćenim otpadnim vodama određene su i za EDDP (γ = 117 ± 32 ng L^{-1}), metadon (γ = 51 ± 13 ng L^{-1}), kodein (γ = 112 ± 78 ng L^{-1}) te morfin (γ = 32 ± 19 ng L^{-1}), što indicira kako njihov unos u prirodne vode može biti značajan. Koncentracije opioida u pročišćenim otpadnim vodama Grada Zagreba za većinu analita su bile vrlo slične vrijednostima u literaturi[2,4,12,39,41,42,43]. Za manji broj opioida (kodein, buprenorfin, oksikodon, morfin i EDDP) koncentracije su bile niže od dostupnih literaturnih podataka[3,17,21,40].

Dodatno praćenje opioida u otpadnim vodama provedeno je u okviru prostorno sveobuhvatnijeg istraživanja koje je imalo za cilj procjenu unosa opioida u rijeku Savu. Istraživanje je obuhvatilo analizu uzoraka s nekoliko najvažnijih ispusta uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Sloveniji i Hrvatskoj pri čemu su obuhvaćeni uređaji s različitim stupnjevima pročišćavanja otpadnih voda. Rezultati određeni 2017. i 2018. godine nalaze se u Tablici 21 u kojoj su prikazani samo opioidi s visokom učestalošću detekcije, uključujući derivate morfina, kodeina, tramadola, buprenorfina i metadona.

Tablica 21. Koncentracijski rasponi, srednje vrijednost i medijani mjerljivih koncentracija opioidnih analgetika u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV1 – Ljubljana), (UPOV2 – Domžale-Kamnik), (UPOV3 – Novo Mesto), (UPOV4 – Zaprešić), (UPOV5 – Zagreb), (UPOV6 – Velika Gorica), od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine; *n* = broj uzoraka, Med. – medijan. Popis imena kratica analita nalazi se u Tablici 6.

Analit		**UPOV1,** *n* = 2	**UPOV2,** *n* = 2	**UPOV3,** *n* = 2	**UPOV4,** *n* = 9	**UPOV5,** *n* = 10	**UPOV6,** *n* = 10
M3G	Raspon / ng L^{-1}	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2 – 0,7	< 0,2 – 13,0	0,8 – 5,5
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	0,7 ± 1	13,0 ± 13	2,9 ± 2
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	0,7 [11]	13 [10]	2,5 [30]
norMOR	Raspon / ng L^{-1}	< 0,5 – 2,3	7,5 – 13,9	< 0,5	< 0,5 – 36,5	0,8 – 7,8	27,2 – 120,3
	SV ± SD / ng L^{-1}	2,3 ± 2	10,7 ± 5	< 0,5 ± 0	23,9 ± 9	3,6 ± 3	70,2 ± 25
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	2,3 [50]	10,7 [100]	< 0,5 [0]	24,1 [67]	3,1 [100]	64,8 [100]
MOR	Raspon / ng L^{-1}	32,8 – 41,6	95,9 – 148,7	3,2 – 8,5	32,5 – 672,1	8,7 – 85,5	216,7 – 653,2
	SV ± SD / ng L^{-1}	37,2 ± 6	122,3 ± 37	5,9 ± 4	260,1 ± 232	30,9 ± 23	370,1 ± 119
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	37,2 [100]	122,3 [100]	5,9 [100]	192,1 [100]	24,1 [100]	344,9 [100]
norCOD	Raspon / ng L^{-1}	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1 – 15,4	< 1,1
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 1,1 ± 0	< 1,1 ± 0	< 1,1 ± 0	< 1,1 ± 0	13,7 ± 2,4	< 1,1 ± 0
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija. %]	< 1,1 [0]	< 1,1 [0]	< 1,1 [0]	< 1,1 [0]	13,7 [20]	< 1,1 [0]
***O*-DM-TRAM**	Raspon / ng L^{-1}	691,6 – 922,4	524,7 – 528,9	1196,4 – 1247,2	316,9 – 2168,2	401,7 – 971,0	1728,4 – 2435,9
	SV ± SD / ng L^{-1}	807,0 ± 163	526,8 ± 3	1221,8 ± 36	873,6 ± 575	710,3 ± 208	2055,3 ± 268
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	807,0 [100]	526,8 [100]	1221,8 [100]	740,0 [100]	806,1 [100]	2044,9 [100]
COD	Raspon / ng L^{-1}	35,5 – 38,6	47,5 – 69,2	8,7 – 12,9	43,9 – 434,0	57,2 – 171,3	509,5 – 895,1
	SV ± SD / ng L^{-1}	37,1 ± 2	58,4 ± 15	10,8 ± 3	270,3 ± 150	109,5 ± 41	729,6 ± 130
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija. %]	37,1 [100]	58,4 [100]	10,8 [100]	260,3 [100]	121,6 [100]	734,0 [100]
TRAM	Raspon / ng L^{-1}	633,3 – 700,8	477,5 – 502,3	996,3 – 1090,8	397,3 – 28641,3	404,1 – 5316,3	1288,0 – 1868,4
	SV ± SD / ng L^{-1}	667,1 ± 48	489,9 ± 18	1043,6 ± 67	6007,6 ± 10102	1214,8 ± 1476,3	1501,5 ± 163
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija. %]	667,1 [100]	489,9 [100]	1043,6 [100]	1395,6 [100]	691,6 [100]	1460,2 [100]
***N*-DM-TRAM**	Raspon / ng L^{-1}	209,6 – 213,2	263,8 – 427,4	230,2 – 309,1	24,0 – 462,9	87,5 – 359,9	220,7 – 520,9
	SV ± SD / ng L^{-1}	211,4 ± 3	345,6 ± 116	269,7 ± 56	161,9 ± 138	206,4 ± 77	358,8 ± 92
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	211,4 [100]	345,6 [100]	269,7 [100]	126,4 [100]	208,4 [100]	365,0 [100]
BUP	Raspon / ng L^{-1}	1,1 – 2,5	2,2 – 3,4	0,5 – 0,8	< 0,2 – 20,3	< 0,2 – 5,7	1,7 – 11,5
	SV ± SD / ng L^{-1}	1,8 ± 1	2,8 ± 1	0,7 ± 0,2	13,8 ± 6	3,0 ± 1	6,4 ± 3
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	1,8 [100]	2,8 [100]	0,7 [100]	13,5 [33]	2,9 [80]	6,2 [100]
EDDP	Raspon / ng L^{-1}	105,1 – 112,6	40 – 68,5	45,0 – 57,3	38,4 – 169,3	78,9 – 166,9	135,6 – 489,5
	SV ± SD / ng L^{-1}	108,9 ± 5	54,3 ± 20	51,2 ± 9	91,5 ± 52	126,5 ± 27	268,0 ± 93
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	108,9	54,3 [100]	51,2 [100]	65,8 [100]	132,4 [100]	264,6 [100]
MTHD	Raspon / ng L^{-1}	36,5 – 40,4	5,6 – 14,3	31,9 – 33,3	16,9 – 106,5	23,9 – 79,4	51,6 – 142,5
	SV ± SD / ng L^{-1}	38,5 ± 3	10 ± 6	32,6 ± 1	46,7 ± 29	56,6 ± 19	76,3 ± 28
	Med. / ng L^{-1} [Frekvencija %]	38,5 [100]	10 [100]	32,6 [100]	48,6 [100]	62,5 [100]	71,4 [100]

Odnosi koncentracija pojedinih metabolita su slični onima koji su opisani za otpadne vode Grada Zagreba (Tablica 20). Međutim, treba napomenuti da su u efluentima Grada Zaprešića (UPOV 4), koji su prošli samo mehaničku obradu, povremeno određene iznimno visoke koncentracije tramadola (do 28,6 µg L^{-1}; Tablica 21 i Tablica XXIV u Dodatku). Takve su koncentracije preko deset puta više od uobičajenih te se teško mogu objasniti terapijskom primjenom. Osim toga, te ekstremno visoke koncentracije tramadola nisu koincidirale s očekivanim proporcionalnim povišenjem koncentracija njegovih metabolita. Upravo suprotno, koncentracije metabolita tramadola u tim efluentima bile su sličnog reda veličine kao i u ostalim komunalnim otpadnim vodama, tako da je anomalno povišena razina tramadola u pojedinim uzorcima s ovog UPOV-a ukazala na mogućnost postojanja njegovog dodatnog (neterapijskog) izvora na toj lokaciji. Takva situacija može se vjerojatno objasniti činjenicom da UPOV Zaprešić, osim komunalnih otpadnih voda, prima i otpadne vode podrijetlom iz farmaceutske industrije.

Treba napomenuti da se svi gore prikazani podatci o rasprostranjenosti opioida u otpadnim vodama odnose na njihovu otopljenu frakciju jer su suspendirane čestice izdvojene filtriranjem uzoraka prije ekstrakcije. Za potpunu procjenu ukupne koncentracije u uzorcima potrebno je odrediti i njihov postotak koji je vezan na suspendirane čestice, posebno za nepročišćene otpadne vode te za uzorke iz aeracijskog bazena koji sadrže visoku koncentraciju suspendirane tvari (> 3 g L^{-1}).

Rezultati analiza opioida u suspendiranoj tvari izraženi u ng g^{-1} suhe tvari prikazani su u Tablici 22. Radi lakše usporedbe s koncentracijama u otopljenoj frakciji, ti su rezultati izraženi i u jedinicama ng L^{-1} (Tablica XI u Dodatku).

Tablica 22. Maseni udjeli (ng g^{-1}) analiziranih opioidnih analgetika u čvrstoj frakciji uzoraka nepročišćenih otpadnih voda (n = 24) i aktivnog mulja (n = 3) prikupljenih na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

	Suspendirana tvar nepročišćene otpadne vode (n = 24)				**Aktivni mulj** (n = 3)			
Analit	Pojavnost	Raspon masenih udjela / ng g^{-1}	Srednja vrijednost / ng g^{-1} ± SD	Medijan / ng g^{-1}	Pojavnost	Raspon masenih udjela / ng g^{-1}	Srednja vrijednost / ng g^{-1} ± SD	Medijan / ng g^{-1}
M3G	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
norMOR	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
M6G	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
DMOR	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
MOR	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
OM	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
HM	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
norCOD	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
DCOD	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
O-DM-TRAM	24	8,3 – 58,4	31,8 ± 15	28,9	3	15,7 – 21,1	18,7 ± 3	19,4
COD	24	5,7 – 38,9	15,9 ± 9	14,1	2	< GK – 13,2	7,6 ± 7	9,5
NOC	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
NHC	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
OC	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
6-AM	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
HC	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
EMOR	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
NFNT	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
TRAM	24	15,9 – 77,2	37,3 ± 16	36,8	3	47,5 – 101,2	80,4 ± 29	92,4
N-DM-TRAM	24	9,3 – 73,5	21,0 ± 14	17,6	3	15,0 – 17,0	16,1 ± 1	16,3
norBUP	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
FNT	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
BUP	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
EDDP	24	1,1 – 43,9	16,1 ± 10	15,1	3	45,0 – 55,2	50,1 ± 5	50,0
PP	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
SFNT	0	< GK	< GK ± 0	< GK	0	< GK	< GK ± 0	< GK
MTHD	24	6,2 – 50,3	23,3 ± 9	22,9	3	33,7 – 75,6	48,8 ± 23	37,0

GK – granica kvantitativnog određivanja metode

Kao što se vidi, broj analita koji su detektirani u mjerljivim masenim udjelima bio je znatno manji nego u otopljenoj frakciji (Tablica 20, Tablica V u Dodatku), a koncentracije (Tablica XI u Dodatku) mnogo niže. Općenito se može zaključiti da je doprinos masenih udjela opioida u čvrstoj fazi nepročišćene otpadne vode njihovoj ukupnoj koncentraciji u vodi za sve istraživane opioide nizak (< 5 %).

Maseni udjeli opioida u suspendiranoj fazi nepročišćene otpadne vode bili su kako slijedi: *O*-demetil-*cis*-tramadol (w = od 8,3 ng g^{-1} do 58,4 ng g^{-1}), kodein (w = od 5,7 ng g^{-1} do 38,9 ng g^{-1}), tramadol (w = od 15,9 ng g^{-1} do 77,2 ng g^{-1}), *N*-demetil-*cis*-tramadol (w = od 9,3 ng g^{-1} do 73,5 ng g^{-1}), EDDP (w = od 1,1 ng g^{-1} do 43,9 ng g^{-1}) te metadon (w = od 6,2 ng g^{-1} do 50,3 ng g^{-1}). Maseni udjeli metadona određeni u ovom istraživanju vrlo su slični onima koje su odredili Baker i suradnici[71] (w = od 19,4 ng g^{-1} do 57,6 ng g^{-1}).

Zbog više koncentracije suspendirane tvari u uzorcima iz aeracijskog bazena (oko 3 g L^{-1}), u tim se uzorcima očekuje značajniji postotni udio opioida čvrstoj fazi. Mjerljivi maseni udjeli u analiziranom aktivnom mulju zabilježeni su za ukupno 5 opioidnih analgetika. Najniži raspon udjela određen je za kodein (od < GK do 13 ng g^{-1}). Maseni udjeli *O*-demetil-*cis*-tramadola bili su u rasponu od 16 ng g^{-1} do 21 ng g^{-1}, a *N*-demetil-*cis*-tramadola od 15 ng g^{-1} do 17 ng g^{-1}. U usporedbi s nepročišćenom otpadnom vodom, u čvrstoj frakciji aktivnog mulja zabilježene su znatno viši maseni udjeli tramadola (w = od 48 ng g^{-1} do 101 ng g^{-1}), metadona (w = od 34 ng g^{-1} do 76 ng g^{-1}) i EDDP-a (w = od 45 ng g^{-1} do 55 ng g^{-1}).

Budući da je koncentracija suspendirane tvari u biološki pročišćenoj otpadnoj vodi uglavnom vrlo niska (< 5 mg L^{-1}), može se procijeniti da se ti spojevi unose u prirodne vode gotovo u potpunosti u otopljenom obliku.

4.2.2. Učinkovitost uklanjanja opioidnih analgetika i njihovih metabolita u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem

Učinkovitost uklanjanja antropogenih spojeva, uključujući i opioide, jedan je od ključnih pokazatelja za procjenu njihovih emisija u prirodne vode te, sukladno tome, i za procjenu okolišnog rizika. Učinkovitost uklanjanja istraživanih opioida u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba sustavno je praćena u četverogodišnjem razdoblju, a sumarni rezultati su prikazani u Tablici 23. Treba napomenuti da je učinkovitost uklanjanja bilo

moguće pouzdano odrediti samo za opioidne spojeve koji su se sustavno pojavljivali u mjerljivim koncentracijama.

Tablica 23. Rasponi i prosječna učinkovitost uklanjanja opioidnih analgetika u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba od 2017. do 2020. godine, *n* = 107. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

	Učinkovitost uklanjanja / %	
Analit	**Raspon**	**Srednja vrijednost ± SD**
M3G	31 – 100	94 ± 13
norMOR	- 39 – 94	60 ± 26
M6G	- 55 – 100	87 ± 22
MOR	22 – 93	68 ± 18
norCOD	105 – 65	2 ± 37
O-DM-TRAM	124 – 28	- 7 ± 18
COD	79 – 80	35 ± 24
6-AM	31 – 100	89 ± 16
TRAM	- 132 – 55	6 ± 22
N-DM-TRAM	- 144 – 45	- 9 ± 29
BUP	- 221 – 100	40 ± 45
EDDP	- 39 – 49	7 ± 16
MTHD	- 41 – 53	19 ± 18

Pokazalo se da postoje velike razlike u stupnju uklanjanja pojedinih opioidnih spojeva. Najučinkovitije uklanjanje postignuto je za 6-acetilmorfin (89 ± 16 %), morfin-3-β-D-glukuronid (94 ± 13 %) te morfin-6-β-D-glukuronid (87 ± 22 %), što je uglavnom u skladu s očekivanjima i s dostupnim literaturnim podatcima. Castiglioni i suradnici[18] zabilježili su potpuno uklanjanje 6-acetilmorfina na dva konvencionalna uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Italiji, dok su Postigo i suradnici[20] izvijestili o njegovom 88 %-tnom uklanjanju. Međutim, na nekim je uređajima zabilježen i puno niži (23 %)[21] pa čak i negativan[22] stupanj uklanjanja tog spoja, odnosno njegova veća koncentracija u pročišćenoj otpadnoj vodi u odnosu na nepročišćenu. Takav rezultat nije u skladu s modelnim pokusima[91] te takve izvještaje treba smatrati nedovoljno pouzdanim. U literaturi se, naime pojavljuju zaključci

koji su temeljeni na malom broju opažanja pri čemu do većeg izražaja dolaze pogreške kod uzorkovanja, složena dinamika dotoka istraživanih tvari na sam uređaj i poremećaji u radu biološkog dijela uređaja. To potvrđuju i rezultati u Tablici 23. Naime, ako se gledaju samo rasponi učinkovitosti uklanjanja, onda za sve opioide postoji velika varijabilnost. Međutim, dugi nizovi opažanja osiguravaju mnogo pouzdaniju procjenu stupnja učinkovitosti na temelju srednje vrijednosti, koja dobro odražava razlike u otpornosti pojedinih opioida na biološku razgradnju.

Stupanj uklanjanja normorfina (60 ± 26 %) i morfina (68 ± 18 %), zapravo pokazuje da se značajan udio morfina ne uspijeva ukloniti. Taj je rezultat u skladu s istraživanjem González-Mariño i suradnika[12]. Međutim, treba napomenuti da je analiza stupnja uklanjanja morfina tijekom biološke obrade složen proces budući da istovremeno uključuje njegovu biološku transformaciju i nastajanje razgradnjom morfin-glukuronida. Potpuna analiza mora uključiti razmatranje ukupne bilance svih morfinskih spojeva, pri čemu treba za osnovu uzeti njihove molarne koncentracije. Učinkovitost uklanjanja buprenorfina (40 ± 45 %), kodeina (35 ± 24 %) i metadona (19 ± 18 %) bila je izrazito varijabilna, ali može se općenito reći da je njihov stupanj uklanjanja vrlo nizak. Najniži stupnjevi uklanjanja određeni su za EDDP (7 ± 16 %), tramadol (6 ± 22 %), *O*-demetil-*cis*-tramadol (- 7 ± 18 %) te *N*-demetil-*cis*-tramadol (- 9 % ± 29 %), što je u skladu s literaturnim podatcima za te spojeve[17,19]. Treba napomenuti da su neki izračuni pokazali čak i negativni prosječni stupanj uklanjanja, što bi značilo da tijekom pročišćavanja otpadnih voda nastaje više nekog opioidnog spoja nego što se uspije razgraditi. Međutim, za sada nisu poznati prekursori koji bi objasnili negativne eliminacije za derivate tramadola. Budući da se radi o vrlo malim negativnim postotcima, takav ishod može se najvjerojatnije pripisati nesavršenosti sinkronog uzorkovanja nepročišćene i pročišćene otpadne vode.

Treba istaknuti da je stupanj uklanjanja pojedinih tvari u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda rezultat nekoliko paralelnih mehanizama, uključujući abiotičku i biotičku razgradnju te njihovu adsorpciju na mulj. Za procjenu doprinosa fizikalno-kemijskih procesa na učinkovitost uklanjanja pojedinih tvari, važno je poznavati njihovu raspodjelu između tekuće i čvrste frakcije otpadne vode u svim fazama postupka obrade. U skladu s tim, u okviru ove disertacije proučena je raspodjela istraživanih opioida između otopljene i suspendirane frakcije otpadne vode pri čemu je raspodjela promatrana za dvije faze obrade: nepročišćenu otpadnu vodu i suspendirani aktivni mulj iz aeracijskog bazena. Da bi se procijenila relativna

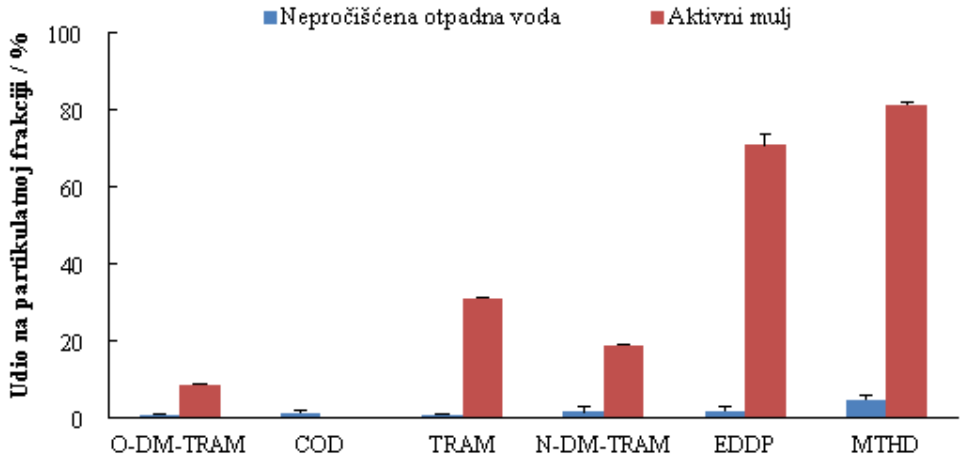
sklonost vezanja istraživanih opioidnih spojeva na čvrstu fazu otpadnih voda, u modelnim pokusima (poglavlje 3.7.) određeni su njihovi raspodjelni koeficijenti između aktivnog mulja i otpadne vode. Rezultati su prikazani u Tablici 24. Kao što se vidi, raspodjelni koeficijenti K_d opioidnih spojeva varirali su u širokom rasponu, od 21 L kg^{-1} za *O*-demetil-*cis*-tramadol do 1 113 L kg^{-1} za fentanil. Značajnija sorpcija na aktivni mulj može se očekivati za opioide s vrijednošću K_d > 100 L kg^{-1}, što uključuje većinu najlipofilnijih opioida (norBUP, FNT, BUP, EDDP, PP, SFNT, MTHD, COD i EMOR).

Tablica 24. Koeficijenti raspodjele opioidnih analgetika između otopljene i čvrste frakcije aktivnog mulja podrijetlom s Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Spoj	**K_d aktivan mulj / L kg^{-1}**
norMOR	285
DMOR	92
MOR	68
OM	33
HM	46
norCOD	47
DCOD	58
O-DM-TRAM	21
COD	114
NOC	34
NHC	43
OC	38
HC	56
EMOR	115
NFNT	65
TRAM	64
N-DM-TRAM	37
norBUP	280
FNT	1 113
BUP	746
EDDP	240
PP	677
SFNT	719
MTHD	230

Na Slici 19 prikazani su rezultati određivanja relativnog udjela opioida u suspendiranoj frakciji nepročišćene otpadne vode i suspenziji aktivnog mulja u aeracijskom bazenu.

Procjena je načinjena samo za one analite koji su bili mjerljivi i u otopljenoj i u čvrstoj frakciji.



Slika 19. Postotni udjeli opioidnih analgetika vezanih na suspendiranu frakciju nepročišćenih otpadnih voda (n = 24) i aktivnog mulja (n = 3) podrijetlom s Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba

Iz podataka prikazanih na Slici 19 može se uočiti da su postotni udjeli opioidnih analgetika adsorbiranih na česticama aktivnog mulja bili višestruko viši od odgovarajućih udjela na česticama nepročišćenih otpadnih voda, što je većim dijelom posljedica višestruko više koncentracije suspendiranih čestica u aktivnom mulju (od 3 g L^{-1} do 4 g L^{-1}) nego u nepročišćenoj otpadnoj vodi (od 0,15 g L^{-1} do 0,20 g L^{-1}). Pri tome je čak 71 ± 3 % EDDP-a i 81 ± 1 % metadona u aeracijskom bazenu bilo vezano na čestice aktivnog mulja. Postotni udio adsorbiranog tramadola (31 ± 0,3 %) i njegovih metabolita, *O*-demetil-*cis*-tramadola (8,6 ± 0,1 %) i *N*-demetil-*cis*-tramadola (19 ± 0,4 %), na čvrstoj fazi mulja u aeracijskom bazenu bio je višestruko niži. To je u skladu s višestruko nižim vrijednostima K_d tramadola i njegovih derivata u usporedbi s lipofilnijim opioidima poput metadona (Tablica 24).

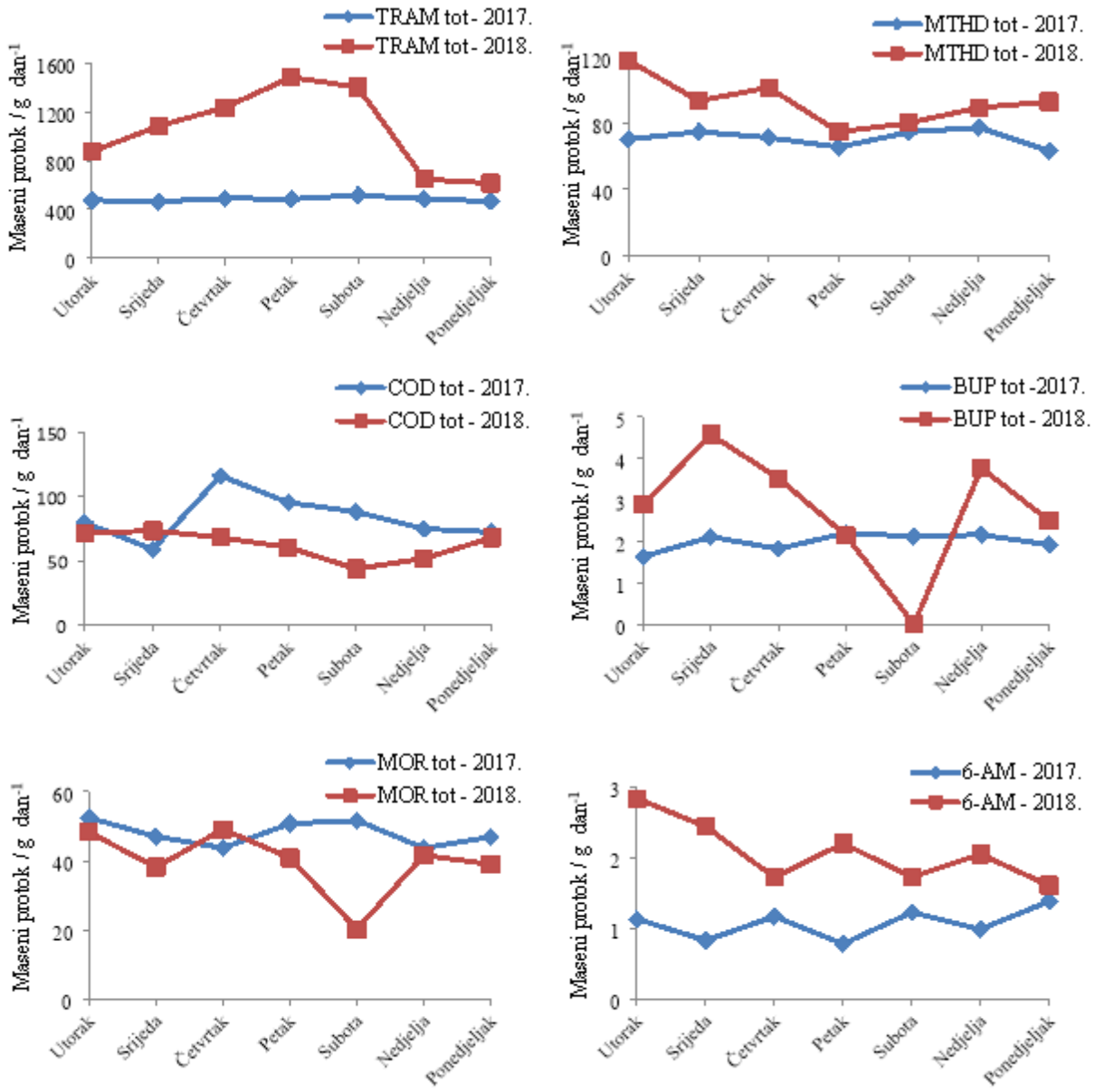
Premda na temelju primijenjene strategije uzorkovanja nije moguće kvantitativno odrediti pojedinačne doprinose procesa razgradnje / transformacije i sorpcije u ukupnoj eliminaciji istraživanih spojeva, grubo se može procijeniti da eliminacija metadona i EDDP-a zbog adsorpcije na suspendirane čestice nepročišćene otpadne vode može doseći i do 10 %, dok je taj mehanizam uklanjanja za hidrofilnije sastojke poput tramadola gotovo zanemarljiv. Srazmjerno visoke vrijednosti K_d najlipofilnijih opioida (fentanila, buprenorfina, propoksifena

i sufentanila), ukazuju da bi u eliminaciji tih spojeva sorpcijski procesi potencijalno mogli imati važnu ulogu, posebno ako se uzme u obzir njihova moguća otpornost na biološku razgradnju. Slični mehanizmi mogli bi utjecati i na sudbinu tih spojeva u vodenom okolišu. Međutim, s obzirom da je koncentracija tih spojeva u svim prikupljenim uzorcima bila niža od granice određivanja metode ili je bila mjerljiva samo u otopljenoj frakciji, tu pretpostavku nije bilo moguće eksperimentalno potvrditi u ovom istraživaju.

4.2.3. Obrasci i trendovi potrošnje odabranih opioida u Gradu Zagrebu

Praćenje koncentracija opioida u nepročišćenim otpadnim vodama poslužilo je za određivanje njihovih dnevnih masenih protoka kao osnove za procjenu potrošnje. Dnevni maseni protoci predstavljaju ukupnu masu pojedinih odabranih biomarkera koju tijekom dvadesetčetverosatnog razdoblja izluči populacija priključena na uređaj za pročišćavanje otpadnih voda, pod uvjetom da je izlučivanje glavni put unosa tih tvari u kanalizaciju i da nema njihovih značajnih gubitaka u samom kanalizacijskom sustavu. Na temelju tih pretpostavki, za najrasprostranjenije tipove opioidnih analgetika istražene su razlike u obrascima njihove potrošnje, uključujući tjednu dinamiku te višegodišnje trendove u promatranom četverogodišnjem razdoblju. Osim toga, treba naglasiti da maseni protoci prikazani u ovom poglavlju, predstavljaju sumarne dnevne masene protoke roditeljskih spojeva i njihovih metabolita, pri čemu su maseni protoci analita korigirani na temelju omjera molekulskih masa metabolita i roditeljskih spojeva. Tako određene ukupne koncentracije opioida ($TRAM_{tot}$, $MTHD_{tot}$, COD_{tot} i BUP_{tot}) upotrijebljene su kao pokazatelji potrošnje tramadola, metadona, kodeina, odnosno buprenorfina. Nasuprot tome, 6-acetilmorfin primijenjen je za praćenje potrošnje heroina jer predstavlja njegov ekskluzivni biomarker. Za razliku od 6-acetilmorfina, morfin može metabolički nastati iz morfina, kodeina i heroina. Budući da od 75 % do 80 % morfina u zagrebačkoj otpadnoj vodi potječe od konzumacije heroina[2], jasno je da dnevni maseni protoci MOR_{tot} nisu prikladni za praćenje potrošnje morfina. Međutim, taj je pokazatelj moguće upotrebljavati za praćenje potrošnje heroina, pod uvjetom da su dostupni podatci o stopi terapijske potrošnje morfina u promatranoj populaciji[2].

Na Slici 20 prikazana je tjedna dinamika dnevnih masenih protoka $TRAM_{tot}$, $MTHD_{tot}$, BUP_{tot}, COD_{tot}, MOR_{tot} i 6-acetilmorfina određena u CUPOVZ-u 2017. (od 21. 03. do 27. 03.) i 2018. godine (od 13. 03. do 19. 03.).

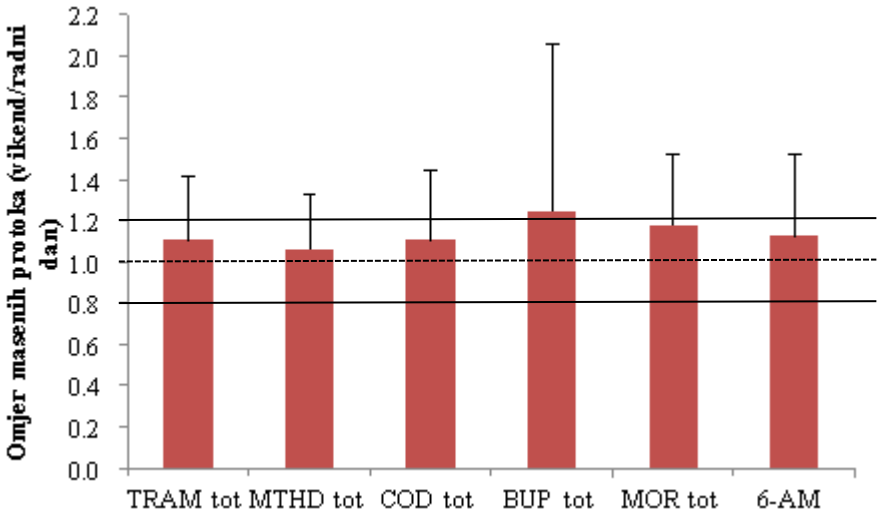


Slika 20. Tjedna dinamika masenih protoka ukupnog tramadola ($TRAM_{tot}$), metadona ($MTHD_{tot}$), buprenorfina (BUP_{tot}), kodeina (COD_{tot}), morfina (MOR_{tot}) i 6-acetilmorfina (6-AM) u 2017. (od 21. 03. 2017. do 27. 03. 2017.) i 2018. godini (od 13. 03. 2018. do 19. 03. 2018.) u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba

Najviši dnevni maseni protoci određeni su za $TRAM_{tot}$ (od 464 g dan^{-1} do 1 484 g dan^{-1}), a niži za COD_{tot} (od 44 g dan^{-1} do 116 g dan^{-1}), MOR_{tot} (od 20 g dan^{-1} do 53 g dan^{-1}) i $MTHD_{tot}$ (od 63 g dan^{-1} do 118 g dan^{-1}). Očekivano, najniži dnevni maseni protoci određeni su za 6-AM (od 0,8 g dan^{-1} do 2,8 g dan^{-1}) i BUP_{tot} (od 0 g dan^{-1} do 4,6 g dan^{-1}). Tijekom 2017.

godine, dnevni maseni protoci odabranih biomarkera bili su srazmjerno stabilni unutar cijelog sedmerodnevnog razdoblja, što je u skladu s očekivanjima utemeljenim na literaturnim podatcima o obrascima potrošnje terapijskih (npr. metadon), ali i nekih ilegalnih opijata (npr. heroin, marihuana). Naime, za razliku od psihostimulirajućih droga (npr. kokain, amfetaminske droge), opijati ne pokazuju tipičnu višu stopu potrošnje vikendom u odnosu na radni dan[2,97]. Međutim, za razliku od 2017. godine, u 2018. godini je tjedna dinamika nekih biomarkera bila karakterizirana znatnim varijacijama. Prosječni dnevni maseni protok $TRAM_{tot}$, određen 2018. godine (1 049 ± 349 g dan^{-1}) bio je značajno viši nego 2017. godine (484 ± 18 g dan^{-1}). Pri tome je prosječni udio tramadola u masenom protoku $TRAM_{tot}$ određenom 2018. godine (70 ± 8 %) bio značajno viši nego 2017. godine (43 ± 1 %). Na temelju toga se može pretpostaviti da je najvjerojatniji uzrok povišenih dnevnih masenih protoka $TRAM_{tot}$ u 2018. godini unos nemetaboliziranog tramadola iz nekog drugog izvora u kanalizacijski sustav, a ne povećane stope potrošnje tog lijeka u promatranom razdoblju. Takvi dodatni izvori tramadola mogu uključivati otpadne vode faramaceutske industrije ili odlaganje nekonzumiranih lijekova u kanalizaciju. Ovo zapažanje dodatno podcrtava važnost određivanja metabolita, ne samo za korektniju procjenu opterećenja nego i za točniju identifikaciju mogućih izvora. Osim toga, ovo zapažanje ponovo naglašava važnost odabira najprikladnijih biomarkera za praćenje potrošnje lijekova i droga na temelju analize otpadnih voda.

Relativno uniformni obrazac potrošnje istraživanih opioida tijekom tjedna potvrđen je dodatno na temelju omjera dnevnih masenih protoka pojedinih opioida vikendom i radnim danom, pri čemu su u obzir uzeti svi uzorci prikupljeni u CUPOVZ-u u razdoblju od 2017. do 2020. godine (n = 107). Izračunati prosječni omjeri za svih 6 istraživanih biomarkera bili su unutar raspona 1 ± 0,2 (Slika 21), što ukazuje na ujednačenu stopu potrošnje unutar tjedna. Ti su rezultati u skladu s dostupnim literaturnim podatcima o tjednim obrascima potrošnje opioidnih terapeutika i ilegalnih opioidnih droga kao što su heroin i marihuana u otpadnim vodama Grada Zagreba[2,97].

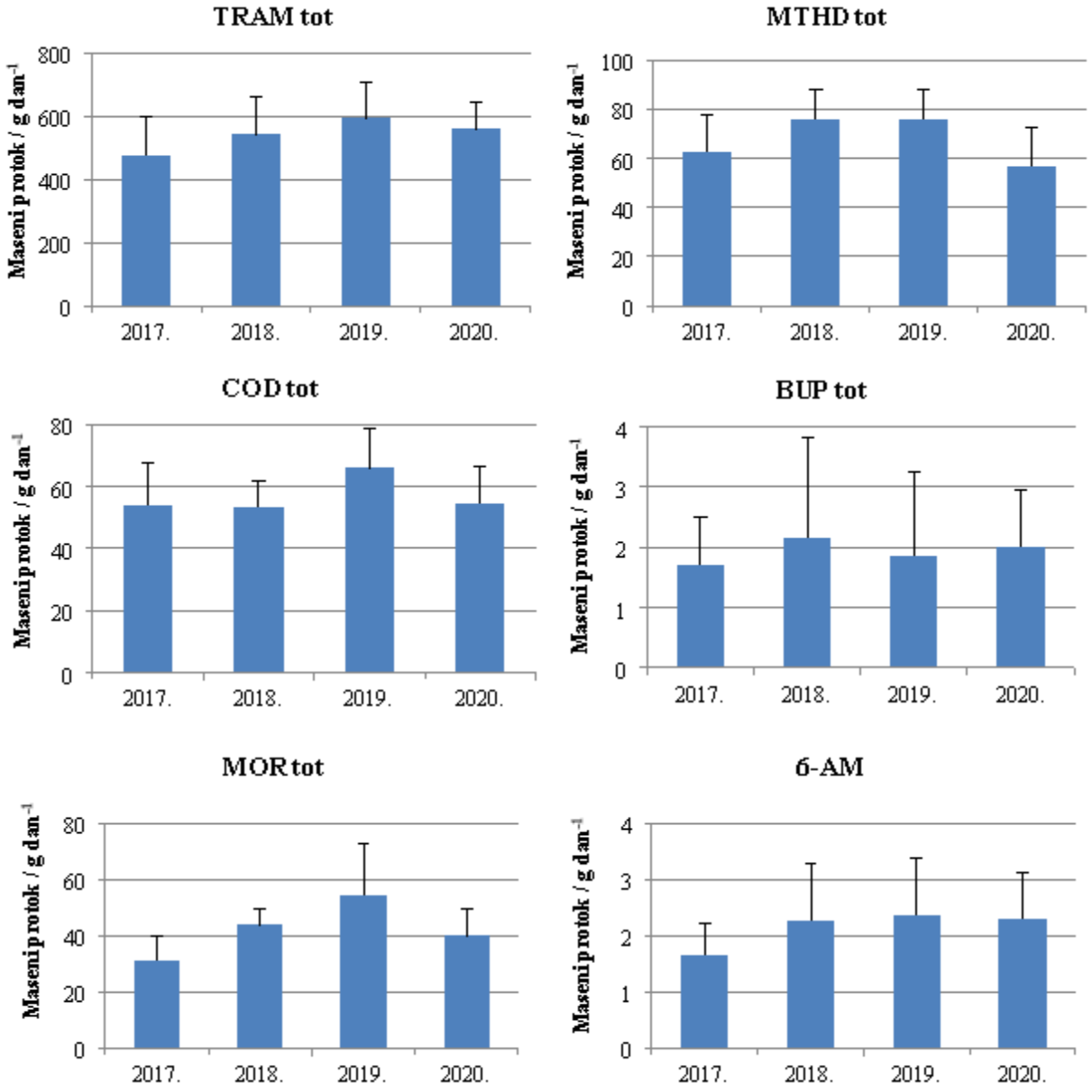


Slika 21. Omjeri srednjih vrijednosti masenih protoka ukupnog tramadola ($TRAM_{tot}$), metadona ($MTHD_{tot}$), buprenorfina (BUP_{tot}), kodeina (COD_{tot}), morfina (MOR_{tot}) i 6-acetilmorfina (6-AM) vikendom i radnim danom u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba od 2017. do 2020. godine

Na temelju prosječnih dnevnih masenih protoka odabranih biomarkera u nepročišćenim otpadnim vodama, istraženi su i višegodišnji trendovi potrošnje tramadola, metadona, kodeina, buprenorfina i heroina u Zagrebu, od 2017. do 2020. godine, a rezultati su prikazani na Slici 22. U istraživanom četverogodišnjem razdoblju prosječni dnevni maseni protoci $TRAM_{tot}$ varirali su u rasponu od 210,3 do 875,1 ± 116 g dan^{-1}, $MTHD_{tot}$ od 28,5 do 118,3 ± 16 g dan^{-1}, COD_{tot} od 11,6 do 84,4 ± 13 g dan^{-1}, BUP_{tot} od 0 do 8,1 ± 1,2 g dan^{-1}, MOR_{tot} od 12,0 do 121,8 ± 14,3 g dan^{-1}, 6-AM od 0,6 do 6,2 ± 0,9 g dan^{-1}.

Iz podataka prikazanih na Slici 22 može se zaključiti da istraživano razdoblje nije bilo karakterizirano izrazitim promjenama u trendovima potrošnje istraživanih terapijskih opioida u Zagrebu, što je uglavnom u skladu s podatcima HALMED-a. Ipak, za neke opioide uočene su određene promjene koje se mogu smatrati statistički značajnim. Tako se, npr. za tramadol može uočiti blagi porast stope potrošnje od 2017. do 2020. (13 %). Dobiveni podatci se srazmjerno dobro slažu s podatcima HALMED-a, a manja odstupanja mogu se pripisati tome da se podatci prikazani u Tablici 2 odnose na Republiku Hrvatsku, dok trendovi potrošnje u Zagrebu ne moraju nužno u potpunosti odgovarati trendovima u cijeloj zemlji. Nadalje, u otpadnoj vodi Grada Zagreba primijećen je i povremeni utjecaj drugih (neterapijskih) izvora tramadola. Isto tako, treba upozoriti na nešto izrazitiji trend porasta prosječnih masenih

protoka biomarkera heroina, morfina (22 %) i 6-acetilmorfina (26 %), od 2017. do 2019. godine. To najvjerojatnije ukazuje na porast stope potrošnje heroina i / ili porast čistoće heroina u tom razdoblju.



Slika 22. Višegodišnje promjene srednjih vrijednosti dnevnih masenih protoka odabranih biomarkera opioidnih analgetika u četverogodišnjem razdoblju (od 2017. do 2020.); ukupni tramadol ($TRAM_{tot}$), metadon ($MTHD_{tot}$), buprenorfin (BUP_{tot}), kodein (COD_{tot}), morfin (MOR_{tot}) i 6-acetilmorfin (6-AM)

4.2.4. Rasprostranjenost i prostorna raspodjela opioidnih analgetika i njihovih metabolita u površinskim vodama

Rasprostranjenost i prostorna raspodjela opioidnih analgetika i njihovih metabolita u površinskim vodama istražena je u rijeci Savi i njenim pritocima, Krapini i Gradni. Kako bi se obuhvatio cijeli hidrološki ciklus, uzorci riječne vode za analizu opioida prikupljani su u okviru 10 uzorkovanja organiziranih od svibnja 2017. godine do studenoga 2018. godine. Prikupljanje uzoraka na postajama smještenim na odsječku rijeke Save od slovenske granice (postaja Otok Samoborski) do Siska (postaja Sisak), uključeno je u svih 10 uzorkovanja, a u dva navrata (svibanj i srpanj 2017.) je prošireno na 3 dodatne postaje u Republici Sloveniji koje su smještene na odsječku Save od lokacije Šentjakob do Brežica. Detalji vezani uz prikupljanje uzoraka prikazani su u poglavlju 3.2.2.

Rezultati praćenja opioidnih spojeva u rijeci Savi prikazani su u Tablici 25. Kao što je bilo očekivano na temelju prethodnih analiza pročišćenih otpadnih voda, u površinskim vodama detektirani su samo najzastupljeniji tipovi opioidnih analgetika. Za te su spojeve u Tablici 25 prikazani podatci o učestalosti detekcije, koncentracijskim rasponima te srednjim vrijednostima i medijanima koncentracija. Pojedinačni rezultati svih određivanja u uzorcima površinskih voda prikazani su u Dodatku u Tablicama XV-XXII.

U analiziranim uzorcima površinskih voda detektirano je 11 od 27 određivanih spojeva. U svim uzorcima određeni su samo tramadol (γ = od 1,9 ng L^{-1} do 127,2 ng L^{-1}) i njegovi metaboliti, *O*-demetil-*cis*-tramadol (γ = od 0,5 ng L^{-1} do 136,7 ng L^{-1}) i *N*-demetil-*cis*-tramadol (γ = od 0,3 ng L^{-1} do 43,3 ng L^{-1}). U većini uzoraka određeni su i metadon (γ = od < 0,1 ng L^{-1} do 4,0 ng L^{-1}), EDDP (γ = od < 0,1 ng L^{-1} do 7,0 ng L^{-1}) te kodein (γ = od < 0,1 ng L^{-1} do 8,4 ng L^{-1}). Na nekim su lokacijama povremeno detektirane mjerljive, ali vrlo niske, koncentracije morfina (γ = od < 0,3 ng L^{-1} do 3,4 ng L^{-1}), morfin-3-β-D-glukuronida (γ = od < 0,1 ng L^{-1} do 0,1 ng L^{-1}), normorfina (γ = od < 0,2 ng L^{-1} do 0,4 ng L^{-1}), norkodeina (γ = od < 0,4 ng L^{-1} do 1,6 ng L^{-1}) te buprenorfina (γ = od < 0,1 ng L^{-1} do 0,5 ng L^{-1}).

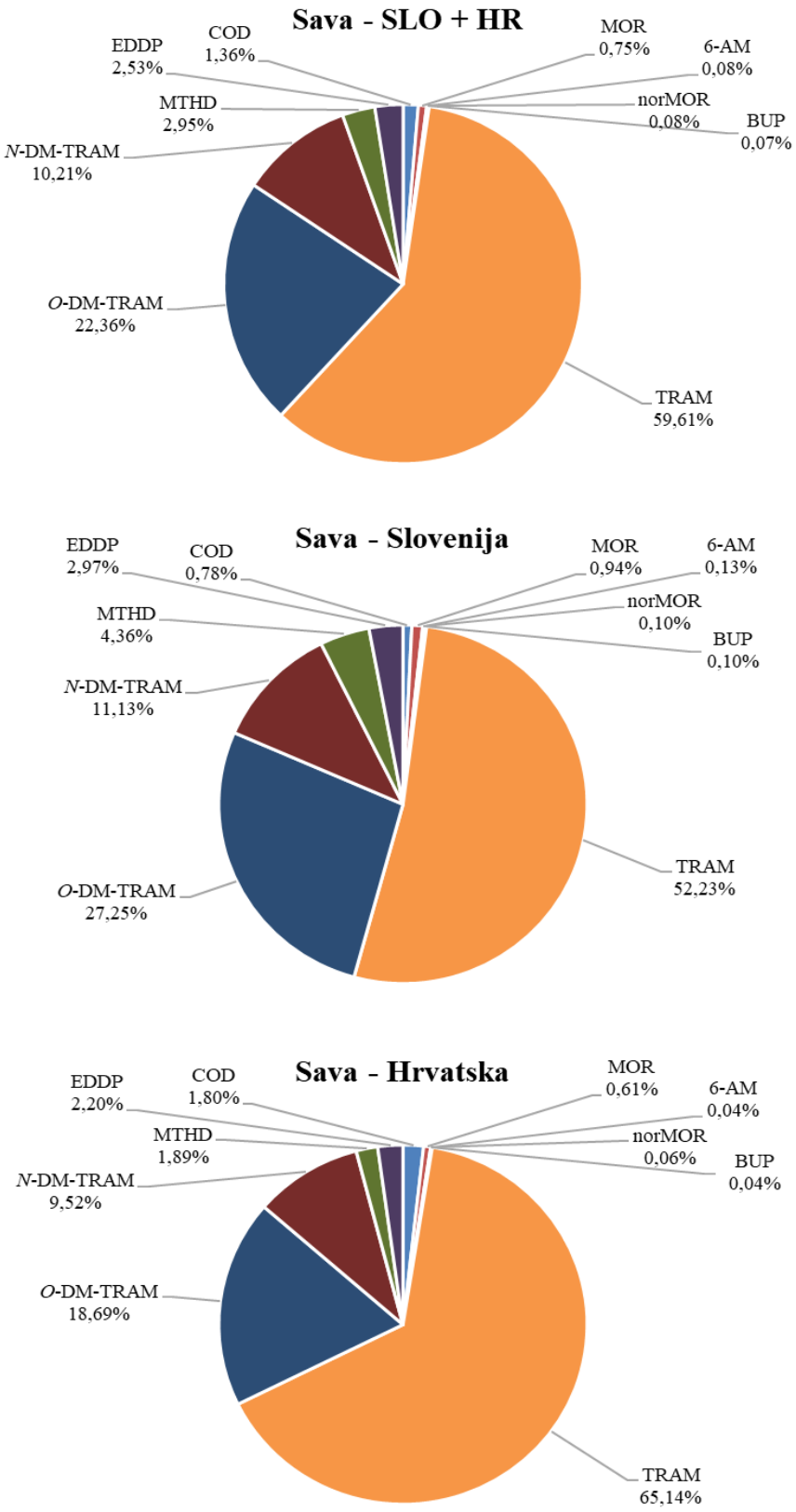
Tablica 25. Koncentracijski rasponi, srednje vrijednost i medijani mjerljivih opioidnih analgetika u rijeci Savi (S 1 – Šentjakob), (S 2 – Jevnica), (S 3 – Brežice), (S 4 – Otok Samoborski), (S 5 – Jankomir), (S 6 – Petruševec), (S 7 – Oborovo), (S 8 – Sisak) te pritocima rijeke Save (P 1 – Gradna) i (P 2 – Krapina) od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine; *n* = broj uzoraka. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

		S 1, *n*=2	**S 2, *n*=2**	**S 3, *n*=2**	**S 4, *n*=10**	**S 5, *n*=10**	**S 6, *n*=8**	**S 7, *n*=10**	**S 8, *n*=10**	**P 1, *n*=8**	**P 2, *n*=8**
M3G	Raspon / ng L^{-1}	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1 – 0,1
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,1 ± 0	< 0,1 ± 0	< GK ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	< 0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,1 [0]	< 0,1 [0]	< GK [0]	0,1 [10]	0,1 [20]	0,1 [25]	0,1 [25]	< 0,1 [0]	0,1 [25]	0,1 [38]
norMOR	Raspon / ng L^{-1}	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2 – 0,4	< 0,2	< 0,2 – 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	0,4 ± 0,4	< 0,2 ± 0	0,2 ± 0,2	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0	< 0,2 ± 0
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	0,4 [10]	< 0,2 [0]	0,2 [13]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]	< 0,2 [0]
MOR	Raspon / ng L^{-1}	< 0,3	0,5 – 1,3	0,5 – 1,3	< 0,3 – 0,4	< 0,3 – 3,4	< 0,3 – 3,1	< 0,3 – 2,6	< 0,3 – 1,8	< 0,3 – 0,6	< 0,3 – 0,9
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,3 ± 0	0,9 ± 1	0,9 ± 1	0,3 ± 0,1	1,8 ± 1,4	1,2 ± 1,3	1,4 ± 0,9	0,7 ± 0,7	0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,2
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,3 [0]	0,9 [100]	0,99 [100]	0,3 9 [20]	1,5 [50]	0,4 [63]	1,5 [63]	0,5 [50]	0,6 [13]	0,6 [50]
norCOD	Raspon / ng L^{-1}	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4 – 1,6
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	< 0,4 ± 0	1,6 ± 1,6
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	< 0,4 [0]	1,6 [13]
***O*-DM-TRAM**	Raspon / ng L^{-1}	2,6 – 3,5	9,7 – 10,6	4,3 – 7,1	1,5 – 9,0	3,5 – 14,7	2,9 – 11,6	6,5 – 31,2	0,9 – 50,6	0,5 – 8,9	18,0 – 136,7
	SV ± SD / ng L^{-1}	3,1 ± 1	10,2 ± 1	5,7 ± 2	4,9 ± 3	10,0 ± 4	7,0 ± 3	20,1 ± 10	22,9 ± 16	5,6 ± 3	66,3 ± 39
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	3,1 [100]	10,2 [100]	5,7 [100]	4,9 [100]	9,1 [100]	6,3 [100]	21,4 [100]	18,8 [100]	6,4 [100]	65,8 [100]
COD	Raspon / ng L^{-1}	< 0,1	0,3 – 0,6	< 0,1 – 0,3	< 0,1-0,3	< 0,1 – 1,2	< 0,1 – 1,0	1,2 – 4,5	0,1 – 14,4	< 0,1 – 0,8	2,0 – 8,4
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,1 ± 0	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,3	2,6 ± 1	3,5 ± 4	0,5 ± 0,2	4,3 ± 1,9
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,1 [0]	0,5 [0]	0,3 [50]	0,2 [70]	0,4 [90]	0,4 [75]	2,5 [100]	2,2 [100]	0,5 [88]	3,9 [100]
TRAM	Raspon / ng L^{-1}	3,7 – 13,5	8,3 – 20,9	9,4 – 28,9	7,9 – 47,2	10,6 – 48,1	9,8 – 37,2	16,4 – 75,4	1,9 – 62,3	1,9 – 9,1	21,5 – 127,2
	SV ± SD / ng L^{-1}	8,6 ± 7	14,6 ± 9	19,2 ± 14	17,4 ± 12	23,0 ± 13	18,1 ± 9	35,2 ± 21	29,9 ± 19	6,3 ± 3	65,7 ± 42
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	8,6 [100]	14,6 [100]	19,2 [100]	14,6 [100]	20,7 [100]	16,0 [100]	29,8 [100]	28,4 [100]	6,8 [100]	55,9 [100]
***N*-DM-TRAM**	Raspon / ng L^{-1}	1,3 – 1,3	2,5 – 4,2	2,3 – 5,3	0,3 – 8,5	0,3 – 6,3	0,3 – 4,4	1,1 – 13,2	0,5 – 16,7	0,6 – 2,9	2,8 – 43,3
	SV ± SD / ng L^{-1}	1,3 ± 0	3,4 ± 1	3,8 ± 2	3,1 ± 2	3,7 ± 2	2,5 ± 2	7,0 ± 5	7,7 ± 5	1,8 ± 1	17,1 ± 14
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	1,3 [100]	3,4 [100]	3,8 [100]	2,3 [100]	3,2 [100]	2,5 [100]	6,5 [100]	8,6 [100]	2,0 [100]	12,1 [100]
BUP	Raspon / ng L^{-1}	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1 – 0,1	< 0,1	< 0,1 – 0,4	< 0,1 – 0,5	< 0,1	< 0,1 – 0,5
	SV ± SD / ng L^{-1}	< 0,1 ± 0	< 0,1 ± 0	< 0,1 ± 0	< 0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	< 0,1 ± 0	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,5	< 0,1 ± 0	0,5 ± 0,5
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	< 0,1 [0]	< 0,1 [0]	< 0,1 [0]	< 0,1 [0]	0,1 [10]	< 0,1 [0]	0,3 [25]	0,5 [10]	< 0,1 [0]	0,5 [13]
EDDP	Raspon / ng L^{-1}	0,3 – 0,6	0,6 – 1,5	0,5 – 1,1	0,2 – 2,2	0,4 – 2,1	0,2 – 1,1	0,9 – 7,0	0,1 – 4,2	< 0,1 – 1,4	0,2 – 1,7
	SV ± SD / ng L^{-1}	0,5 ± 0,2	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,4	0,8 ± 1	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,3	2,7 ± 1,9	1,9 ± 1,4	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,6
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	0,5 [100]	1,1 [100]	0,8 [100]	0,7 [100]	0,8 [100]	0,7 [100]	1,9 [100]	1,8 [100]	0,5 [88]	0,5 [100]
MTHD	Raspon / ng L^{-1}	0,3 – 1,6	0,4 – 2,9	0,4 – 1,7	0,3 – 3,3	0,3 – 3,0	0,3 – 1,6	0,7 – 2,2	0,1 – 4,0	< 0,1 – 0,9	0,2 – 3,3
	SV ± SD / ng L^{-1}	1,0 ± 1	1,7 ± 1	1,1 ± 1	1,0 ± 1	0,9 ± 1	0,7 ± 0,5	1,2 ± 0,6	1,1 ± 1	0,5 ± 0,3	0,8 ± 1
	Med. / ng L^{-1} [FREK. %]	1,0 [100]	1,1 [100]	1,1 [100]	0,6 [100]	0,4 [100]	0,6 [100]	1,1 [100]	0,7 [100]	0,4 [88]	0,4 [100]

Više koncentracije u pravilu su nađene na postajama smještenim neposredno nakon ispusta otpadne vode (npr. Oborovo, Sisak, Krapina), što je posebno došlo do izražaja u rijeci Krapini u kojoj je, zbog manjeg protoka riječne vode, učinak razrijeđenja otpadne vode riječnom puno slabiji. Najviša izmjerena masena koncentracija tramadola određena u rijeci Krapini (γ = 127 ng L^{-1}) bila je dvostruko viša u odnosu na koncentraciju određenu u njemačkim (γ = 52 ng L^{-1})[47] i francuskim površinskim vodama (γ = 65 ng L^{-1})[14], ali i višestruko niža od one izmjerene 2010. (γ = 441 ng L^{-1}) i 2011. (γ = 539 ng L^{-1}) godine u UK-u[17,43]. Najviše izmjerene koncentracije kodeina, morfina, metadona i EDDP-a na istraživanom odsječku rijeke Save bile su ili znatno niže ili slične literaturnim rasponima koncentracija tih spojeva u površinskim vodama[12,17,47,50,53,54].

Treba napomenuti da u literaturi ima vrlo malo pouzdanih podataka o rasprostranjenosti i ponašanju morfinskih opioida u površinskim vodama, a posebno se to odnosi na promatranje koncentracijskih odnosa pojedinih spojeva da bi se bolje razumjelo njihovo ponašanje, uključujući i moguću transformaciju iz jednog oblika u drugi. U prethodno provedenim istraživanjima koncentracijske razine morfina bile su najčešće ispod granice određivanja [17,41,51] ili vrlo niske (γ = 5,7 ng L^{-1})[43]. Rezultati određeni u ovom istraživanju su u vrlo dobrom suglasju s literaturnim podatcima. Međutim, istodobno određivanje različitih derivata morfina ukazalo je na neke zanimljive korelacije. Metabolit morfina, normorfin, je u rijeci Savi detektiran na postajama Jankomir (γ = 0,4 ng L^{-1}) i Oborovo (γ = 0,2 ng L^{-1}), na kojima je određena i najviša koncentracije morfina (Jankomir: γ = 3,4 ng L^{-1}, Oborovo: γ = 2,6 ng L^{-1}). U većini prikupljenih uzoraka riječne vode bio je mjerljiv i morfin-3-β-D-glukuronid, koji se može smatrati potencijalnim prekursorom morfina u riječnoj vodi. Nasuprot tome, morfin-6-β-D-glukuronid i 6-acetilmorfin nisu određeni niti u jednom od analiziranih uzoraka, što je u skladu s očekivanjima, s obzirom na vrlo niske koncentracije tih spojeva u otpadnim vodama te visoke faktore razrjeđenja u rijeci Savi.

U pogledu odnosa glavnih tipova opioidnih spojeva, zanimljivo je ukazati da je prosječni udio tramadola i njegovih metabolita u ukupnoj koncentraciji opioidnih spojeva (određen na temelju svih analiziranih uzoraka rijeke Save) bio čak 91,6 %, dok su udjeli ostalih mjerljivih opioida bili znatno niži: 2,95 % za metadon, 2,53 % za EDDP te < 1 % za morfin, 6-acetilmorfin i normorfin (Slika 23).



Slika 23. Prosječna postotna zastupljenost opioida određenih u uzorcima rijeke Save prikupljenim u svibnju i srpnju 2017. godine

Osim za indikaciju mogućih transformacija u samoj rijeci, koncentracijski odnosi osnovnih opioidnih spojeva i njihovih metabolita mogu poslužiti i za bolju karakterizaciju unosa. Kao što je već napomenuto, opioidni analgetici mogu u vodeni okoliš dospjeti putem terapijske potrošenje, ali i putem odbačenih neiskorištenih lijekova te putem otpadnih voda farmaceutske industrije. U tom kontekstu interesantno je napomenuti da je postotni udio tramadola u ukupnoj koncentraciji tramadola i njegovih metabolita bio viši u uzorcima savske vode prikupljenim u Hrvatskoj (69,8 %), nego u Sloveniji (57,6 %) što bi mogla biti indikacija dodatnog unosa putem otpadnih voda farmaceutske industrije u Hrvatskoj.

Što se tiče moguće ekotoksikološke važnosti koncentracija opioidnih spojeva u rijeci Savi, čini se da koncentracijska razina tih spojeva ne predstavlja neposredni rizik za vodene organizme. Naime, prema literaturnim podatcima, opioidni analgetici koji su najčešće detektirani u rijeci Savi pokazuju relativno slabu toksičnost za vodene organizme[58]. Naime, iako su Lindim i suradnici[98] istaknuli kako je tramadol jedan od triju kemijska spoja koji dominantno pridonose akutnoj toksičnosti u vodenim organizmima u Švedskoj, okolišno relevantne koncentracije tramadola koje mogu utjecati na mramornog raka *Procambarus virginalis*[99] bile su reda veličine μg L^{-1}, što je značajno više od koncentracija određenih u površinskim vodama u ovom istraživanju.

U svibnju 2017. godine su, osim uzoraka vode, prikupljeni i uzorci savskog sedimenta na 4 postaje (Otok Samoborski, Jankomir, Oborovo i Sisak) šireg područja Grada Zagreba te su analizirani na sadržaj opioidnih spojeva. Ta su preliminarna određivanja pokazala da je većina analita u prikupljenim uzorcima sedimenta bila ispod granica određivanja metode. Takav rezultat nije neočekivan ako se uzmu u obzir vrlo niske koncentracije opioida u savskoj vodi te njihovi srazmjerno niski raspodjelni koeficijenti između čvrste i otopljene faze (Tablica 24). Ipak, u sedimentu podrijetlom s postaja Jankomir i Oborovo, koje se nalaze nizvodno od glavnih ispusta Zaprešića i Zagreba, u mjerljivim masenim udjelima nađeni su tramadol (w = 1,0 ng g^{-1} i 1,9 ng g^{-1}) i njegov metabolit *N*-demetil-*cis*-tramadol (w = 0,7 ng g^{-1} i 0,8 ng g^{-1}). Na temelju koncentracije tih analita u otopljenoj fazi, određeni su raspodjelni koeficijenti (K_d) tramadola (10 ± 7,l L kg^{-1}) i *N*-demetil-*cis*-tramadola (54 ± 11 L kg^{-1}) između riječne vode i sedimenta koji su bili usporedljivog reda veličine kao i oni određeni za te analite u sustavu otpadna voda-aktivni mulj.

4.2.5. Masena bilanca odabranih opioida u rijeci Savi

Jednostavno praćenje koncentracija opioida u površinskim vodama važno je za procjenu mogućih štetnih utjecaja za vodene organizme, ali je za razumijevanje procesa koji određuju njihovo ponašanje i sudbinu u prirodnim vodama potrebno primijeniti složeniji pristup. U ovom istraživanju načinjena je jednostavna masena bilanca opioidnih spojeva u rijeci Savi na odsječku od lokacije Šentjakob u Sloveniji do Oborova u Republici Hrvatskoj, pri čemu je pretpostavljeno da ispusti otpadnih voda većih gradova predstavljaju glavne izvore unosa. Zbog toga je uzorkovanje na rijeci Savi sinkronizirano sa sakupljanjem 24-satnih kompozitnih uzoraka efluenata podrijetlom s najvećih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) u promatranom području (uključujući i UPOV Ljubljane i Zagreba) koji bi trebali predstavljati glavne izvore unosa opioida u rijeku Savu. Budući da uzorci efluenta s UPOV-a Grada Siska nisu bili dostupni u okviru ovog istraživanja, postaja Sisak nije uključena u masenu bilancu. Masena bilanca načinjena je za dvije tipične hidrološke situacije: u svibnju, kod visokog vodostaja Save, te u srpnju, kada je vodostaj bio znatno niži. Ključni podatci na kojima se temelji masena bilanca obuhvaćaju podatke koji prikazuju unose putem efluenata UPOV-a izražene u g dan^{-1} (Tablica 26) te podatke o masenim protocima (g dan^{-1}) u rijeci Savi na pojedinim lokacijama (Tablica 27).

Što se tiče glavnih unosa, iz Tablice 26 se vidi da čak od 85 % do 92 % ukupnog unosa tramadola i metadona u rijeku Savu na istraživanom segmentu potječe od UPOV-a Ljubljana i UPOV-a Zagreb. Posebno treba ukazati da je unos iz UPOV-a Grada Zagreba u svibnju bio izuzetno visok, posebno za tramadol (1 388 g dan^{-1}).

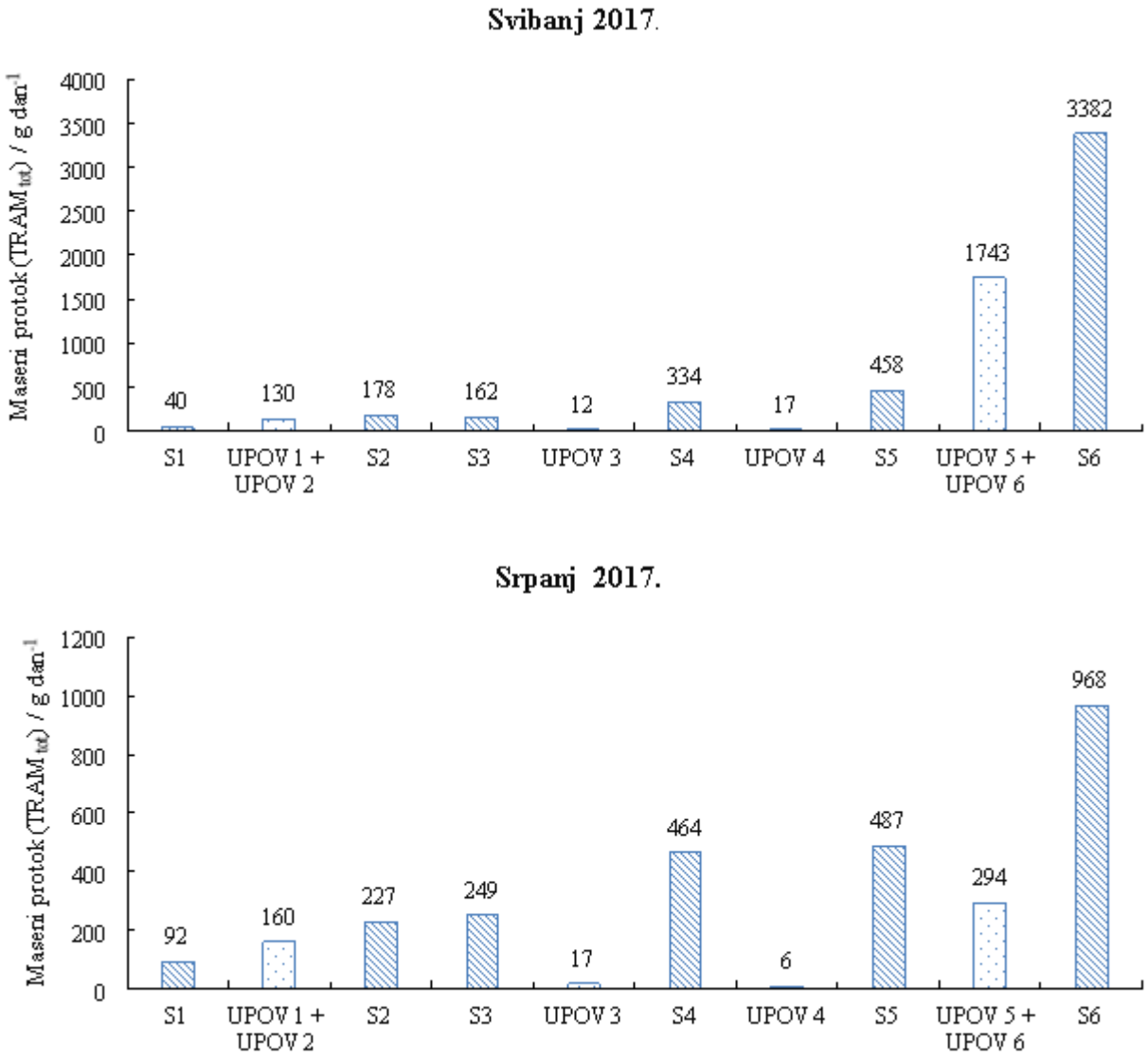
Tablica 26. Protoci otpadnih voda, masene koncentracije i dnevni maseni protoci najučestalijih opioida u uzorcima otpadne vode na 6 ispusta u rijeku Savu na odsječku od Šentjakoba u Republici Sloveniji do Oborova u Republici Hrvatskoj određeni u svibnju i srpnju 2017. godine. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Naziv postaje	Kratica	Protok	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
			m^3 dan^{-1}	γ / ng L^{-1}					Maseni protok / g dan^{-1}				
svibanj 2017.	Ljubljana	UPOV 1	66 994	633	692	213	40	113	42,4	46,3	14,3	2,7	7,5
	Domžale	UPOV 2	17 935	502	525	264	14	69	9,0	9,4	4,7	0,3	1,2
	N. Mesto	UPOV 3	4 636	996	1 247	309	33	57	4,6	5,8	1,4	0,2	0,3
	Zaprešić	UPOV 4	6 665	1 099	1 267	60	107	162	7,3	8,4	0,4	0,7	1,1
	Zagreb	UPOV 5	26 1126	5 316	840	360	61	167	1 388	219	94	15,8	43,6
	V. Gorica	UPOV 6	6 610	1 353	1 728	362	143	225	8,9	11,4	2,4	0,9	1,5
srpanj 2017.	Ljubljana	UPOV 1	69 916	701	922	210	37	105	49,0	64,5	14,7	2,6	7,3
	Domžale	UPOV 2	18 240	478	529	427	6	40	8,7	9,6	7,8	0,1	0,7
	N. Mesto	UPOV 3	4 337	1 091	1 196	230	32	45	4,7	5,2	1,0	0,1	0,2
	Zaprešić	UPOV 4	5 789	522	384	66	27	54	3,0	2,2	0,4	0,2	0,3
	Zagreb	UPOV 5	234 177	472	528	123	24	79	110	124	28,8	5,6	18,5
	V. Gorica	UPOV 6	5 928	1 448	1 852	397	57	136	8,6	11,0	2,4	0,3	0,8

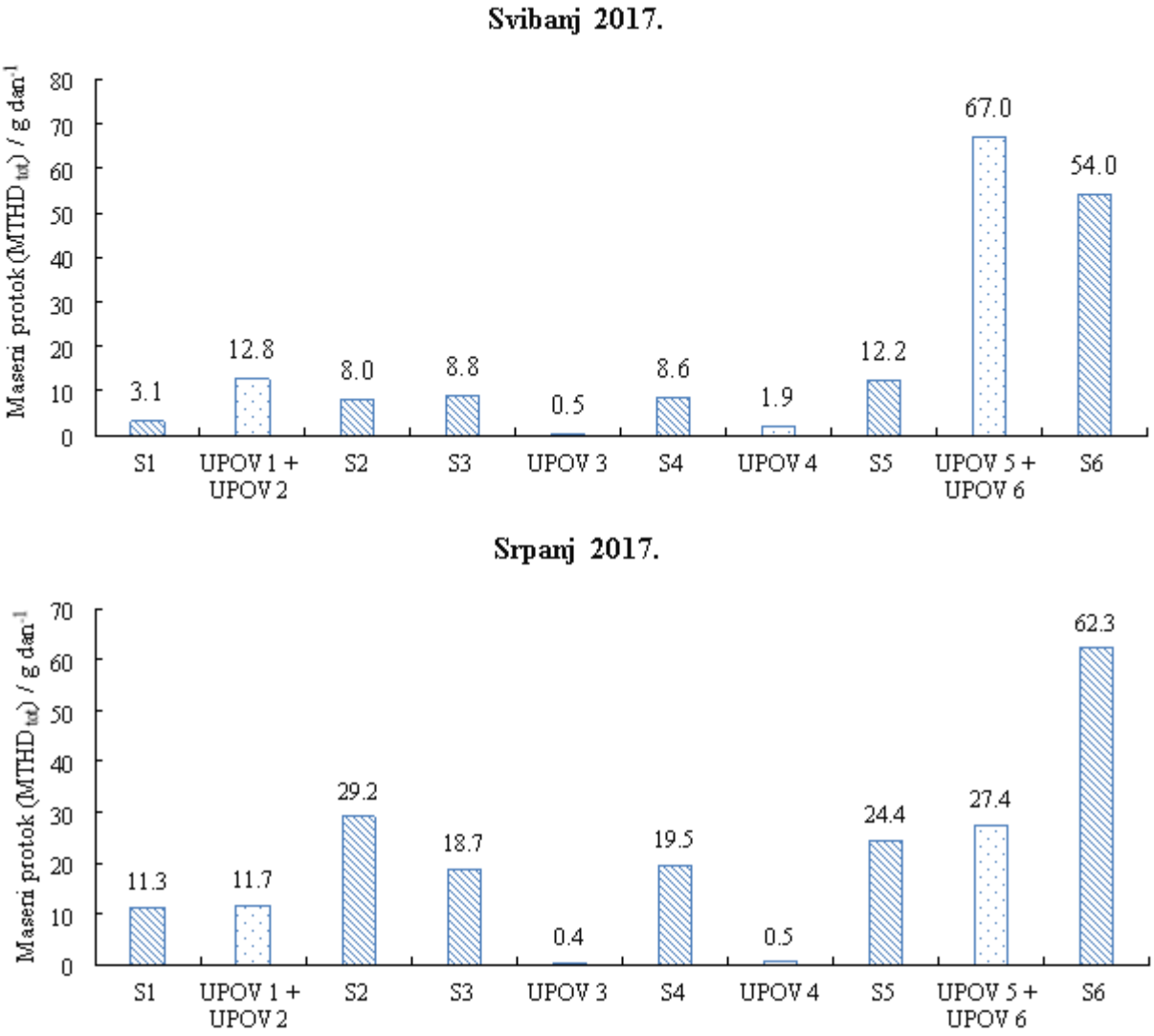
Tablica 27. Protoci riječne vode, masene koncentracije i dnevni maseni protoci najučestalijih opioida u uzorcima riječne vode na odsječku od Šentjakoba u Republici Sloveniji do Siska u Republici Hrvatskoj određeni u svibnju i srpnju 2017. godine. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Naziv postaje	Kratica	Protok	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
			m^3 dan $^{-1}$	γ / ng L^{-1}					Maseni protok / g dan^{-1}				
svibanj 2017.	Šentjakob	S1	4 959 360	3,7	2,9	1,3	0,3	0,3	18,3	14,4	6,3	1,5	1,5
	Jevnica	S2	7 456 320	8,3	12,2	2,5	0,4	0,6	61,9	91,0	18,7	3,0	4,5
	Brežice	S3	9 192 960	9,4	5,5	2,3	0,4	0,5	86,4	50,6	21,3	3,7	4,6
	O. Samoborski	S4	13 279 680	15,7	6,3	2,7	0,2	0,4	208,5	83,7	35,4	2,7	5,3
	Jankomir	S5	14 256 000	20,3	8,4	2,8	0,3	0,5	289,4	119,8	39,9	4,3	7,1
	Oborovo	S6	14 169 600	205,2	22,5	9,2	0,8	2,7	2 907,6	318,8	130,0	11,3	38,3
srpanj 2017.	Šentjakob	S1	4 976 640	13,5	3,5	1,3	1,6	0,6	67,2	17,4	6,5	8,0	3,0
	Jevnica	S2	6 376 320	20,9	9,7	4,2	2,9	1,5	133,3	61,9	26,8	18,5	9,6
	Brežice	S3	6 384 960	28,9	4,3	5,3	1,7	1,1	184,5	27,5	33,8	10,9	7,0
	O. Samoborski	S4	8 078 400	47,2	4,0	5,7	1,3	1,0	381,3	32,3	45,7	10,7	7,9
	Jankomir	S5	8 493 120	43,6	6,7	6,3	1,9	0,9	370,5	56,6	53,5	15,9	7,6
	Oborovo	S6	8 026 560	72,9	32,7	12,5	2,3	4,9	584,8	262,4	11,5	18,4	39,4

Na Slikama 24 i 25 prikazani su kombinirani podatci unosa i masenih protoka odabranih biomarkera u rijeci Savi na temelju uzorkovanja provedenih u svibnju i srpnju 2017. godine. Za interpretaciju rezultata treba naglasiti da su tijekom uzorkovanja prikupljani samo trenutni uzorci riječne vode pri čemu nije bilo moguće postići potpunu sinkronizaciju uzorkovanja na različitim postajama na način da se na svim postajama analizira isti "paket" vode. Osim toga, u uređaju u Zaprešiću nije bilo moguće osigurati 24-satni kompozitni uzorak.



Slika 24. Masena bilanca ukupnog tramadola ($TRAM_{tot}$) određena na temelju dnevnih masenih protoka tramadola i njegovih metabolita određenih u rijeci Savi i efluentima uređaja za pročišćavanje otpadnih voda na odsječku Šentjakob (S 1) – Oborovo (S 6) u svibnju i srpnju 2017.



Slika 25. Masena bilanca ukupnog metadona ($MTHD_{tot}$) određena na temelju dnevnih masenih protoka metadona i njegovog metabolita EDDP-a u rijeci Savi i efluentima uređaja za pročišćavanje otpadnih voda na odsječku Šentjakob (S 1) – Oborovo (S 6) u svibnju i srpnju 2017.

Unatoč nedostatcima vezanim uz provedbu uzorkovanja, longitudinalna raspodjela u rijeci Savi jasno ukazuje na glavne izvore unosa na širem području Zagreba (UPOV 5, UPOV 6) i Ljubljane (UPOV 1, UPOV 2) te omogućuje dublji uvid u ponašanje promatranih opioida u samoj rijeci. Za prikaz su odabrani maseni protoci ukupnog tramadola ($TRAM_{tot}$) i metadona ($MTHD_{tot}$) jer se na taj način istovremeno mogu pratiti promjene svih najvažnijih kemijskih oblika tih opioida. Iz prikaza se jasno može uočiti da je unos tih tvari u Savu znatno veći

putem efluenata hrvatskih UPOV-a (UPOV 4 – 6), nego putem efluenata slovenskih UPOV-a (UPOV 1 – 3). Tako je u svibnju unos $TRAM_{tot}$ iz hrvatskih UPOV-a bio 1 760 g dan^{-1}, a iz slovenskih 142 g dan^{-1}. Razlika je bila nešto manja u srpnju (300 g dan^{-1} prema 177 g dan^{-1}). Uočene razlike mogu se dijelom objasniti većom populacijom hrvatskih gradova, a samo u manjoj mjeri nedovoljnom učinkovitošću UPOV-a u Zaprešiću (samo mehanička obrada) i Velikoj Gorici jer je stupanj uklanjanja promatranih opioida tijekom biološke obrade zapravo neznatan. Ovdje treba još jednom napomenuti da se povišene količine unosa za $TRAM_{tot}$ mogu objasniti samo dodatnim unosom iz neterapijskih izvora.

Longitudinalna raspodjela masenih protoka $TRAM_{tot}$ u rijeci Savi pokazuje stalan porast u obje promatrane sezone (Slika 24). U svibnju je porast naglašeniji, od 40 g dan^{-1} na lokaciji Šentjakob do čak 3 382 g dan^{-1} kod Oborova. Porast je bio nešto umjereniji u srpnju (od 92 g dan^{-1} do 968 g dan^{-1}). Ako se svi unosi u svibnju pridodaju početnom masenom protoku u rijeci Savi, ukupni maseni protok nizvodno od Zagreba bio bi oko 2 000 g dan^{-1} što je oko 40 % manje nego izmjerena vrijednost od 3 382 g dan^{-1}. U srpnju je ta razlika također bila oko 60 % (569 g dan^{-1} naspram 968 g dan^{-1}). To ukazuje na postojanje drugih izvora unošenja osim UPOV-a koji su praćeni u ovom istraživanju, pri čemu bi za potpuniju bilancu pozornost trebalo posvetiti i ostalim UPOV-ima te pritocima Save na promatranom odsječku rijeke. Nadalje, treba naglasiti da rezultati ukazuju na vrlo slabo uklanjanje tramadola u rijeci Savi čak i u ljetnim uvjetima kada su uvjeti za mikrobiološku i fotokemijsku razgradnju znatno povoljniji. Međutim, pokazano je da je tramadol vrlo otporan na biološku razgradnju. Zbog niskih vrijednosti K_d, adsorpcija tramadola na sediment također ne bi trebala značajnije utjecati na masene protoke. Najvjerojatniji mehanizam za uklanjanje tramadola i njegovih metabolita je fotokemijska razgradnja[62].

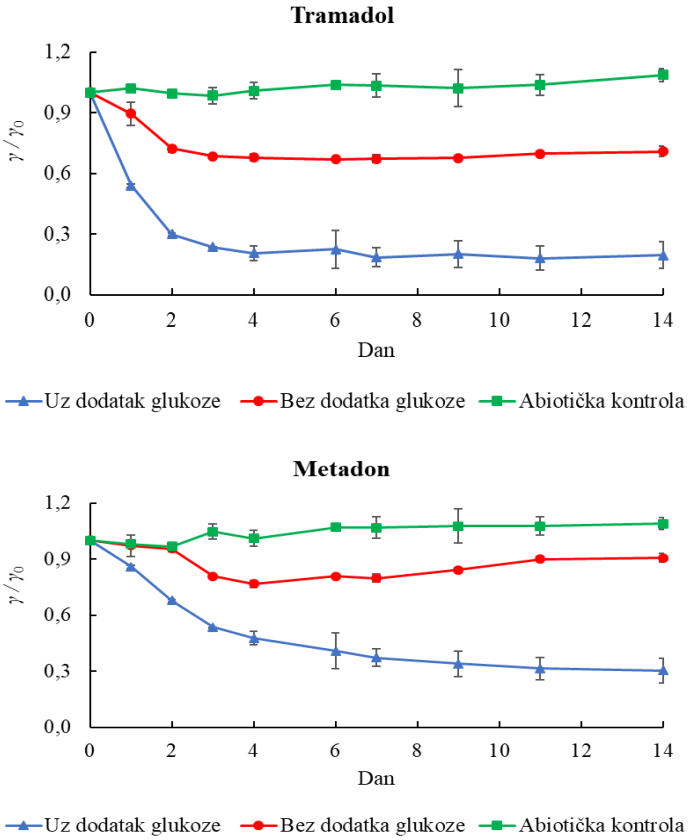
Raspodjela $MTHD_{tot}$ pokazala je dosta sličnosti s raspodjelom $TRAM_{tot}$, ali trend stalnog porasta nije tako izrazit (Slika 25). U svibnju je ukupni unos putem UPOV-a bio oko 83 g dan^{-1}, dok je ukupni protok na izlaznom profilu u Oborovu bio samo 54 g dan^{-1}. U srpnju je ukupni unos iz odabranih glavnih izvora bio 40 g dan^{-1}, a maseni protok na izlaznom profilu bio je 62,3 g dan^{-1}. Ako se uzme u obzir da procjenom unosa nisu obuhvaćeni svi izvori, raspodjela $MTHD_{tot}$ ukazuje da je u samoj rijeci najvjerojatnije došlo do uklanjanja tog opioida iz vodenog stupca, a mogući mehanizmi su adsorpcija na sediment, biološka razgradnja i fotokemijska razgradnja[24].

4.3. Biološka razgradnja tramadola i metadona

Modelni pokusi biološke razgradnje / transformacije dvaju odabranih opioidnih analgetika, tramadola i metadona, provedeni su na tresilici pomoću obogaćenih mješovitih mikrobnih kultura podrijetlom iz aktivnog mulja s CUPOVZ-a na način opisan u poglavlju 3.6.1. Kako bi se istražila potencijalna uloga kometaboličkih procesa u biorazgradnji ovih spojeva, pokusi su provedeni u podlozi s i bez glukoze kao dodatnog izvora ugljika. Osim kinetike uklanjanja roditeljskih spojeva, praćena je i dinamika nastanka transformacijskih proizvoda (TP) čija je identifikacija načinjena na temelju kromatografskih i masenospektrometrijskih podataka dobivenih analizom uzoraka sustavom UPLC-Q/ToF MS/MS te literaturnih podataka o transformacijskim procesima uključenim u razgradnju ovih ili sličnih spojeva. Osim toga, napravljena je i ekotoksikološka evaluacija učinka biotransformacijskih procesa na temelju određivanja inhibicije rasta slatkovodne zelene alge *Desmodesmus subspicatus*.

4.3.1. Učinkovitost i kinetika uklanjanja tramadola i metadona u pokusima biološke razgradnje

Originalna kultura aktivnog mulja podrijetlom s CUPOVZ-a nije imala sposobnost razgradnje ni tramadola ni metadona, što je u skladu s literaturnim podatcima o njihovom neučinkovitom uklanjaju u uređajima za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda[17,19], uključujući CUPOVZ (Poglavlje 4.2.2., Tablica 23). Međutim, njenim višestrukim dugotrajnim precjepljivanjem u mediju s povišenom koncentracijom tramadola (γ = 20 mg L^{-1}), odnosno metadona (γ = 10 mg L^{-1}), uzgojene su 2 obogaćene mješovite mikrobne kulture karakterizirane srazmjerno dobrom sposobnošću razgradnje, odnosno transformacije ovih spojeva. Te su kulture upotrijebljene u pokusima biološke razgradnje u kojima je istražen potencijalni utjecaj kometaboličkih uvjeta na kinetiku i stupanj uklanjanja roditeljskog spoja, uz istodobno praćenje dinamike nastanka transformacijskih proizvoda. U skladu s tim, istražena je razgradnja u mediju koji je sadržavao glukozu kao dodatni labilni izvor ugljika (kometabolički uvjeti) i u mediju bez dodatka glukoze (metabolički uvjeti). Rezultati eliminacije tramadola, odnosno metadona u uvjetima bez dodatka i uz dodatak glukoze prikazani su na Slici 26.



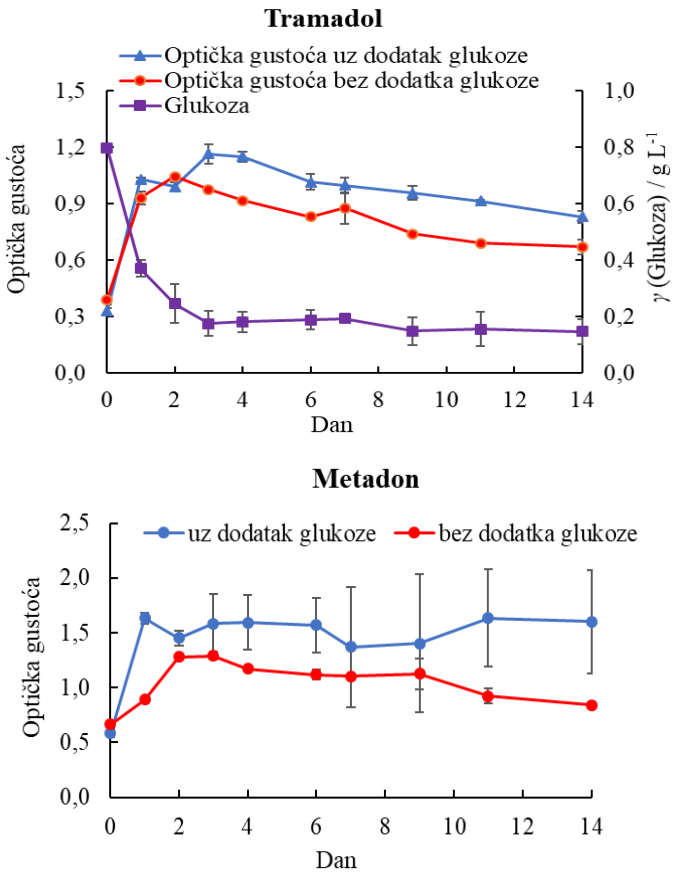
Slika 26. Uklanjanje tramadola i metadona u pokusima biološke razgradnje u mediju s dodatkom i bez dodatka glukoze

Kod kometaboličkih uvjeta postignuto je znatno učinkovitije uklanjanje obaju istraživanih opioida, nego u mediju u kojem su istraživani opioidi bili jedini izvor ugljika. Na kraju pokusa, iz medija s glukozom uklonjeno je 82 % tramadola i 70 % metadona, a iz medija bez glukoze samo 33 % tramadola i 9 % metadona. Treba napomenuti da je učinkovitost uklanjanja opioda u svim pokusima u stvarnosti bila i viša budući da rezultati pokusa nisu korigirani za blago ukoncentriravanje medija uslijed otparavanja, koje je procijenjeno na 5 % do 10 % u 14 dana.

Koncentracije abiotičkih kontrola (Slika 26) potvrdile su da uklanjanje istraživanih opioida u pokusima biološke razgradnje nije bilo rezultat adsorpcije na stijenke eksperimentalnih posuda. Osim toga, na temelju raspodjelnih koeficijenata (K_d) tramadola (64 L kg^{-1}) i metadona (230 L kg^{-1}) određenih za aktivni mulj s CUPOVZ-a u ovom radu (Tablica 24) i njihove koncentracije u mediju na kraju pokusa (3,6 mg L^{-1} tramadola i 2,4 mg L^{-1} metadona), procijenjeno je da je adsorpcijom na biomasu uklonjeno najviše 2 % do

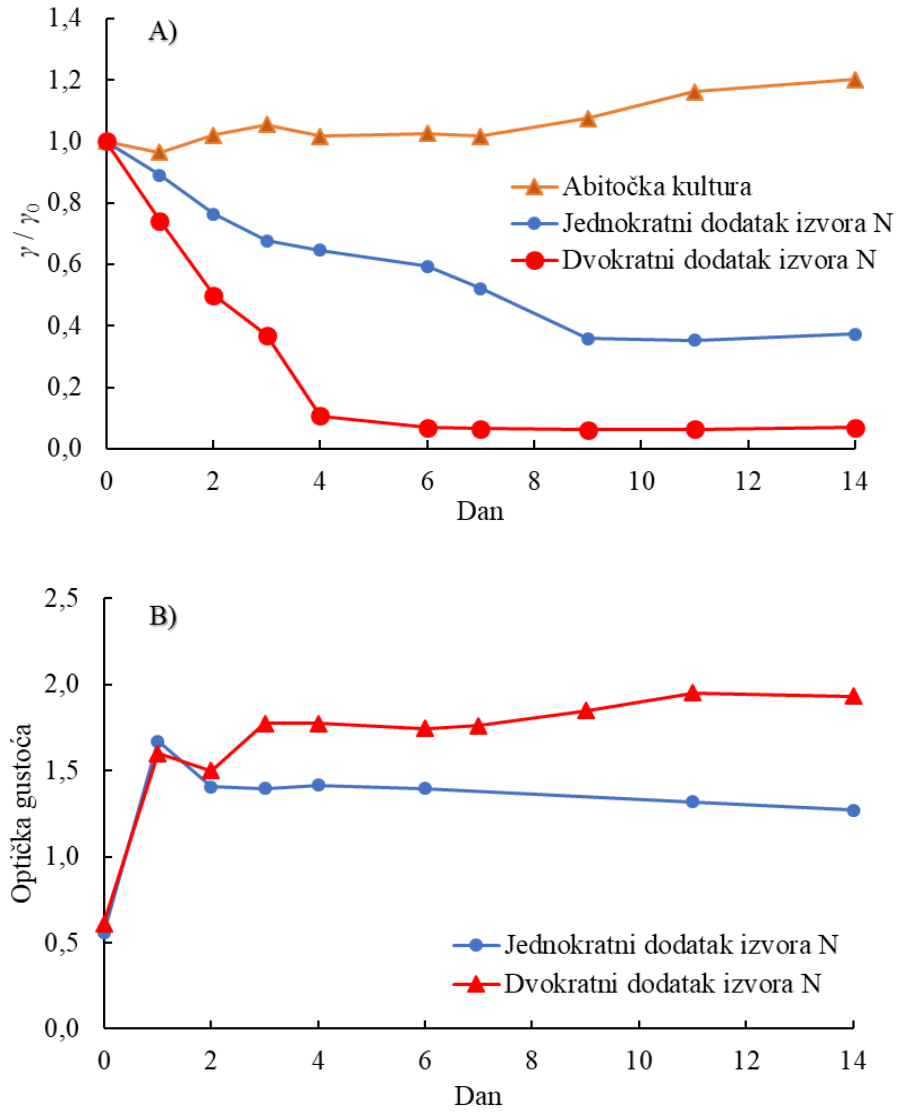
6 % tramadola i 11 % metadona. U skladu s tim, može se zaključiti da su glavnu ulogu u uklanjanju tramadola i metadona u provedenim pokusima imali biotransformacijski procesi.

Interesantno je uočiti da je u prvim danima pokusa razgradnje došlo do višestrukog porasta biomase u oba istraživana medija, pri čemu su razlike u krivuljama rasta biomase bile veće u pokusu s metadonom. Unatoč početnom porastu biomase kod svih eksperimentalnih uvjeta, efikasnost i brzina razgradnje obaju istraživanih spojeva bila je znatno viša u mediju s glukozom (Slika 26, Tablica 28). Na temelju toga se može zaključiti da bi kometabolički procesi mogli imati važnu ulogu u kinetici razgradnje istraživanih spojeva. Dodatno, u pokusu s tramadolom je, nakon 4. dana, uočen zastoj u razgradnji tramadola (Slika 26) i glukoze (Slika 27), uz istodobni blagi pad koncentracije biomase (Slika 27), što je najvjerojatnije posljedica nepovoljnog omjera ugljika i dušika u ovoj fazi pokusa te ukazuje na važnost daljnjeg istraživanja uloge omjera ugljika i dušika u kinetici razgradnje ovih spojeva.



Slika 27. Promjene u koncentraciji biomase izražene kao optička gustoća i masene koncentracije glukoze u pokusima aerobne biorazgradnje tramadola i metadona u podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze

Budući da je kod kometaboličkih uvjeta brzina razgradnje metadona (k = 0,169 dan^{-1}; $t_{1/2}$ = 4,1 dan) bila znatno niža od brzine razgradnje tramadola (k = 0,525 dan^{-1}; $t_{1/2}$ = 1,3 dan), u zasebnom je pokusu istražena i potencijalna uloga dostupnosti izvora dušika na kinetiku biološke razgradnje metadona. Pri tome je, u jednu od tikvica s glukozom, amonijev klorid, osim na početku pokusa, dodan i naknadno, u drugom danu pokusa, kako bi se nadoknadilo njegovo brzo trošenje na rast biomase tijekom prvog dana. Krivulje uklanjanja metadona i rasta biomase kod tih eksperimentalnih uvjeta prikazane su na Slici 28.



Slika 28. Kinetika uklanjanja metadona (A) i rasta biomase (B), izraženog kao optička gustoća, u pokusima biološke transformacije provedenim u kometaboličkim uvjetima s dodatkom i bez naknadnog dodatka amonijevog klorida kao dodatnog izvora dušika

U uvjetima dvokratnog dodatka amonijeva klorida (0. i 2. dan), zabilježen je dodatni rast biomase te znatno efikasnije (93 %) i brže uklanjanje metadona (k = 0,45 dan^{-1}; $t_{1/2}$ = 1,5 dan) nego u uvjetima jednokratnog (0. dan) dodatka amonijeva klorida (63 %, k = 5,8 dan^{-1}; $t_{1/2}$ = 5,8 dan). Kinetički pokazatelji određeni u pokusima razgradnje prikazanim na Slikama od 26 do 28 na način opisan u poglavlju 3.6.2. prikazani su u Tablici 28.

Tablica 28. Kinetički pokazatelji biološke razgradnje tramadola i metadona određeni u adaptiranoj kulturi aktivnog mulja u različitim eksperimentalnim uvjetima

Spoj	Uvjeti	k / dan^{-1}	$t_{1/2}$ / dan	r^2	Kinetički model
Tramadol	Bez dodatka glukoze	0,136	-	0,9592	Kinetika 1. reda
	Uz dodatak glukoze	0,525	1,3	0,9592	Kinetika 1. reda
Metadon	Bez dodatka glukoze	0,061	11,4	0,8621	Kinetika 1. reda
	Uz dodatak glukoze	0,169	4,1	0,9414	Kinetika 1. reda
	Bez naknadnog dodatka dušika	0,119	5,8	0,9740	Kinetika 1. reda
	Uz naknadni dodatak dušika	0,450	1,5	0,9338	Kinetika 1. reda

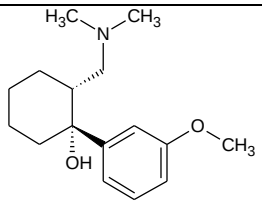
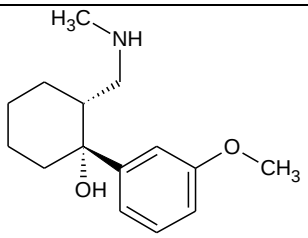
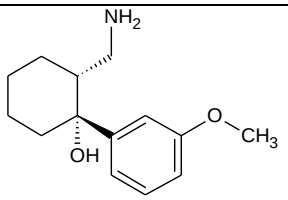
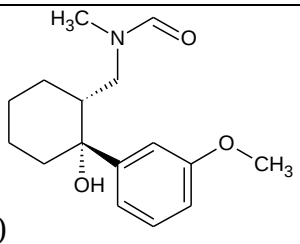
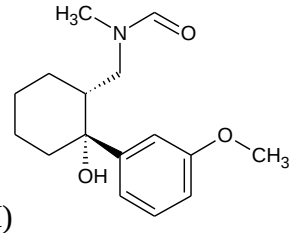
Sumarno se može zaključiti da je biološku razgradnju istraživanih opioida moguće postići isključivo upotrebom obogaćenih mikrobnih kultura pri čemu na kinetiku razgradnje u znatnoj mjeri utječe dostupnost i omjer dodatnih labilnih izvora ugljika i dušika, što treba dodatno istražiti.

4.3.2. Identifikacija biotransformacijskih proizvoda tramadola i metadona

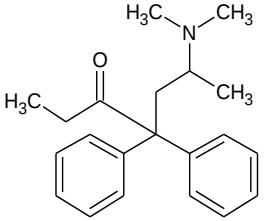
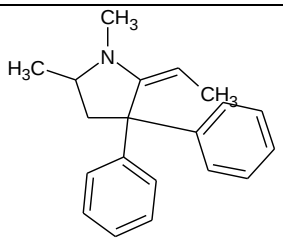
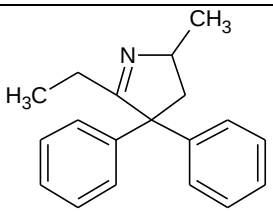
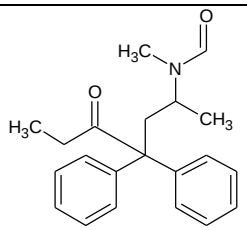
Mikrobna razgradnja tramadola i metadona je praćena istodobnim nastankom biotransformacijskih proizvoda. Svi identificirani transformacijski proizvodi detektirani su primjenom pozitivnog ionizacijskog polariteta. Analizom uzoraka u negativnom ionizacijskom polaritetu nisu detektirani dodatni transformacijski proizvodi. Analizom zabilježenih kromatograma i spektara masa detektirano je 5 transformacijskih proizvoda tramadola i 3 transformacijska proizvoda metadona čija su vremena zadržavanja, elementni sastavi, teorijske vrijednosti m/z, odstupanja eksperimentalno određenih vrijednosti m/z kao i

predložene kemijske strukture te ocjena pouzdanosti identifikacije prema Schymanski i suradnicima[100] prikazani u Tablici 29.

Tablica 29. Vremena zadržavanja, elementni sastavi, teorijske vrijednosti *m*/*z*, odstupanja eksperimentalno određenih vrijednosti *m*/*z*, kemijske strukture roditeljskih spojeva, predložene kemijske strukture transformacijskih proizvoda te stupanj pouzdanosti njihove identifikacije prema Schymanski i suradnicima[100]

Spoj	**t_R / min**	**Element. sastav $[M + H]^+$**	***m*/*z* teorijski**	**Δ *m*/*z* / mDa**	**Struktura**	**Stupanj pouzdanosti identifikacije***
TRAM	3,71	$C_{16}H_{26}NO_2$	264,1964	- 1,2		-
TRAM TP 249 (*N*-DM-TRAM)	3,78	$C_{15}H_{24}NO_2$	250,1806	- 0,3		1
TRAM TP 235 (*N*,*N*-diDM TRAM)	3,68	$C_{14}H_{22}NO_2$	236,1651	+ 2,4		2 b
TRAM TP 277 a, b, c	5,26; 5,69; 5,98	$C_{16}H_{24}NO_3$	278,1756	+0,1; +1,4; -2,0	I)  II) 	3 3

Tablica 29. - nastavak

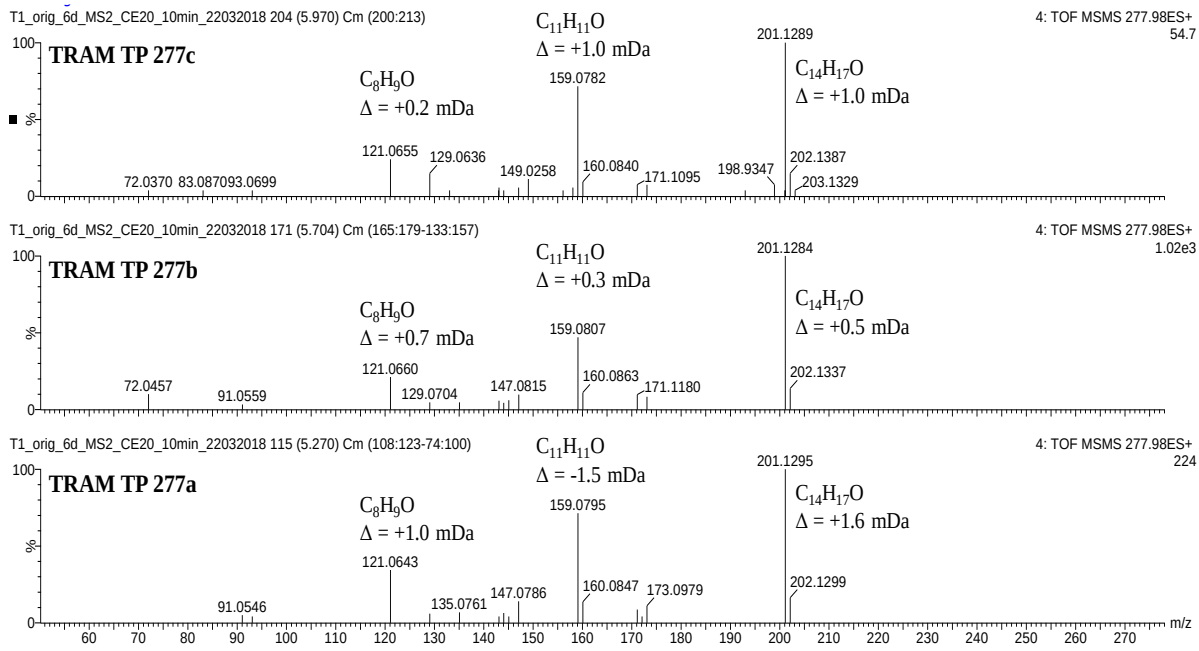
Spoj	t_R / min	Element. sastav $[M + H]^+$	*m/z* teorijski	Δ *m/z* / mDa	Struktura	Stupanj pouzdanosti identifikacije*
MTHD	6,33	$C_{21}H_{28}NO$	310,2171	- 0,3		-
MTHD TP 278 (EDDP)	5,67	$C_{20}H_{24}N$	278,1909	+ 0,1		1
MTHD TP 264 (EMDP)	5,79	$C_{19}H_{22}N$	264,1752	+ 1,5		1
MTHD TP 324	8,19	$C_{21}H_{26}NO_2$	324,1964	- 1,3		2 b

*određeno prema Schymanski i sur.[100], **TRAM** – tramadol, ***N*-DM-TRAM** – *N*-demetil-*cis*-tramadol, ***N,N*-diDM TRAM** – *N,N*-didemetil tramadol, **MTHD** – metadon, **EDDP** – 2-etildien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin, **EMDP** – 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin, t_R – vrijeme zadržavanja, **Element. sastav** – elementni sastav

Identifikacija transformacijskih proizvoda provedena je na temelju kromatografskih i masenospektrometrijskih podataka te je, kada god je to bilo moguće, načinjena i dodatna potvrda identificiranih spojeva usporedbom sa standardnim referencijskim tvarima. Stupanj pouzdanosti identifikacije prikazan u Tablici 29 određen je prema kriterijima koji su predložili Schymanski i suradnici[100]. Prva (najviša) razina pouzdanosti pripisana je transformacijskim proizvodima čija je identifikacija potvrđena usporedbom s referencijskim standardnim tvarima, dok su razine pouzdanosti 2 b i 3 pripisane spojevima za koje su, na temelju kromatografskih i masenospektrometrijskih podataka, pretpostavljene najvjerojatnije strukture nastalih transformacijskih proizvoda.

Identifikacija TP-a ukazala je na neke zajedničke mehanizme biološke transformacije TRAM i MTHD. Glavnu ulogu u nastanku transformacijskih proizvoda TRAM TP 249, TRAM TP 235, MTHD TP 278 i MTHD TP 264 imali su *N*-demetilacijski procesi, što je u skladu s literaturnim podatcima o ulozi *N*-demetilacije u biotransformaciji[101,102] i abiotičkoj transformaciji[103] ksenobiotika koji sadrže dialkilamino skupinu. TRAM TP 249 i TRAM TP 235 identificirani su kao *N*-demetil-*cis*-tramadol i *N*,*N*-didemetil tramadol, dok su MTHD TP 278 i MTHD TP 264 identificirani kao EDDP i EMDP. Identifikacija *N*-demetil-*cis*-tramadola, EDDP-a i EMDP-a potvrđena je na temelju usporedbe s analitičkim standardima te im je pripisana razina pouzdanosti identifikacije 1, dok je *N*,*N*-didemetil tramadol identificiran uz razinu pouzdanosti 2 b (Tablica 29). Zanimljivo je napomenuti da su ta 4 transformacijska proizvoda ujedno i poznati ljudski metaboliti tramadola i metadona, što ukazuje na općenitu važnost tih transformacija. Nadalje, ovo zapažanje je u skladu s hipotezom da transformacijski procesi zagađivala, čija struktura uključuje dialkilamino skupinu u sisavcima i mikroorganizmima, često slijede slične obrasce zbog čega bi dostupne spoznaje o ljudskom metabolizmu lijekova s takvim strukturnim značajkama mogle biti od velike koristi u usmjeravanju pretražnih analiza za njihovo sveobuhvatno praćenje u okolišu[104].

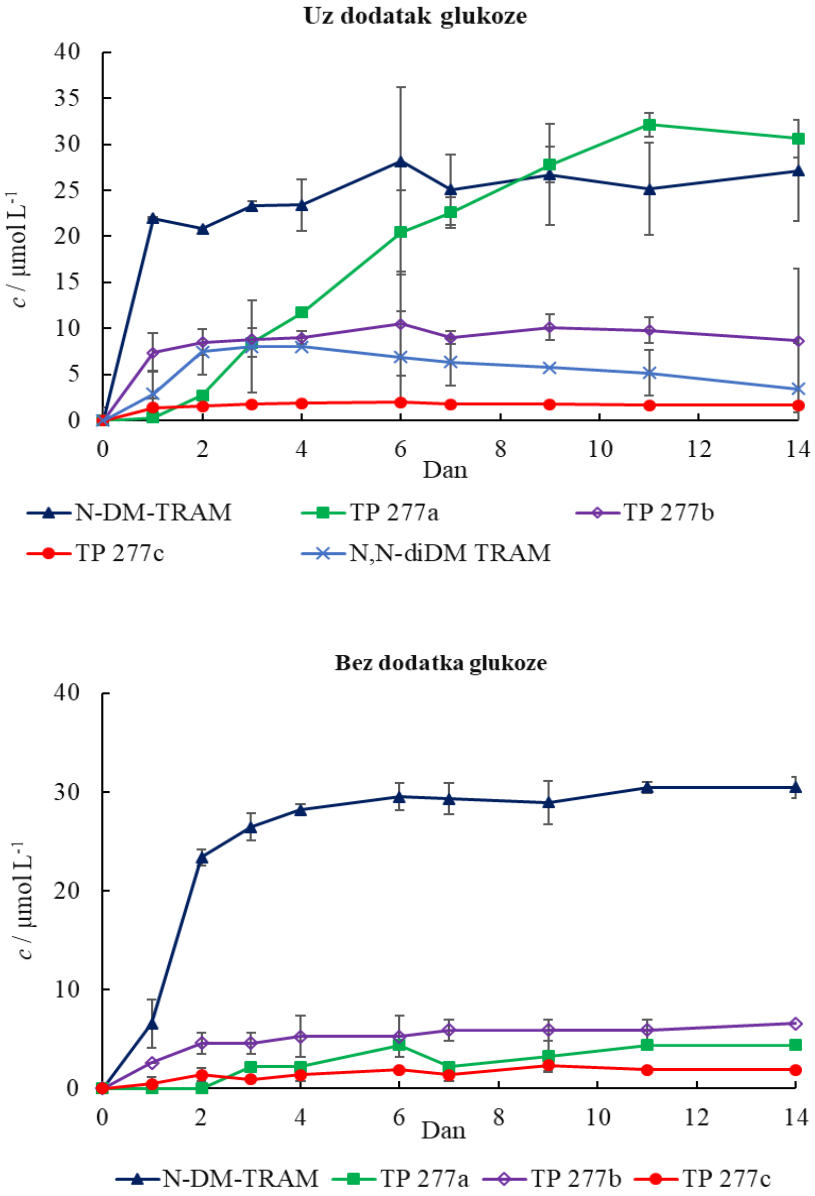
Za razliku od spomenutih četiriju transformacijskih proizvoda nastalih *N*-demetilacijom, preostala 3 transformacijska proizvoda tramadola (TRAM TP 277 a, b i c) i 1 transformacijski proizvod metadona (MTHD TP 324) do sada nisu opisani u literaturi. TRAM TP 277 a, b i c uključuju 3 kromatografski odvojena izomerna spoja,vrijednosti *m*/*z* 278,1756, što odgovara elementnom sastavu protonirane molekule $C_{16}H_{24}NO_3$ (Tablica 29). Nadalje, sva tri izomerna transformacijska proizvoda tramadola kromatografski su eluirana (t_R = 5,26; 5,69 i 5, 98 min) nakon roditeljskog spoja (t_R = 3,71 min), što ukazuje na relativni porast lipofilnosti u odnosu na roditeljski spoj. Spektri masa tramadola i svih izomernih transformacijskih proizvoda sadržavali su karakteristični ion produkt *m*/z 201,1279 ($C_{14}H_{17}O$) koji nastaje pucanjem veze C-N, što jasno upućuje na transformaciju na dimetilamino skupini, pri čemu je preostali dio molekule ostao nepromijenjen, što je prikazano na Slici 29.



Slika 29. Spektri masa transformacijskih produkata tramadola 277 a, b, c

Ovaj zaključak dodatno je potvrđen prisutnošću produkt-iona formiranih daljnjom fragmentacijom iona *m*/*z* 201, čije su vrijednosti *m*/*z* bile 159 ($C_{11}H_{11}O$) i 121 (C_8H_9O). Na temelju masenospektrometrijskih rezultata i literaturnih podataka o transformacijskim mehanizmima uključenim u razgradnju mikrozagađivala koja sadrže dialkilamino skupinu, predložene su dvije strukture izomernih transformacijskih proizvoda tramadola, dok je struktura trećeg izomernog transformacijskog produkta ostala nerazjašnjena. Prva predložena struktura (Tablica 29, Struktura I) mogla je nastati *N*-formilacijom *N*-demetil-*cis*-tramadola ili α-C-oksidacijom tramadola u formamid. Analizom spektara masa MTHD TP 324, pokazalo se da bi isti transformacijski mehanizam (α-C-oksidacija u formamid) mogao biti odgovoran za nastajanje tog TP-a. Alternativni mehanizam, koji bi uključivao *N*-demetilaciju i naknadnu *N*-formilaciju, kod metadona nije jako vjerojatan s obzirom na tendenciju *N*-demetiliranog metadona da se ciklizacijom stabilizira u EDDP. Druga predložena struktura izomernog transformacijskog proizvoda tramadola (Tablica 29, Struktura II) vjerojatno je nastala *N*-acetiliranjem *N*,*N*-didemetil tramadola. Predložene strukture TRAM TP 277 a,b,c i MTHD TP 324 dodatno podupire i pojava adukata s natrijevim ionima u njihovim spektrima masa, što je karakteristično za spojeve koji sadrže skupine amidnog karaktera.[105] Osim toga, predložene strukture dobro se slažu i s literaturno opisanim mehanizmima biotransformacije nekih drugih mikrozagađivala koja sadrže dialkilamino skupinu.[104] Međutim, budući da

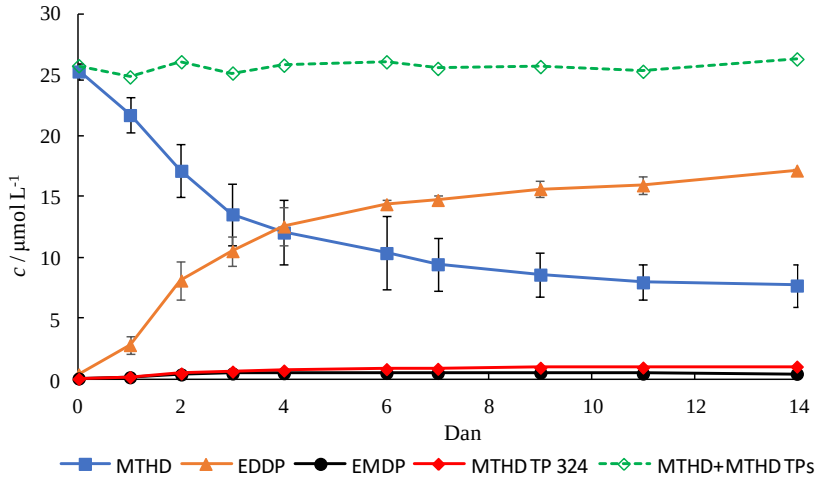
spektri masa ovih transformacijskih proizvoda nisu sadržavali fragmente koji bi omogućili nedvosmislenu potvrdu predloženih struktura, njima je, u nedostatku odgovarajućih referencijskih tvari, pripisan stupanj pouzdanosti identifikacije 3. Unatoč tome, pouzdanost identifikacije biotransformacijskih proizvoda, posebice izomernih tranformacijskih proizvoda tramadola, bila je dodatno potkrijepljena dinamikom njihova nastanka koja je prikazana na Slici 30.



Slika 30. Dinamika biotransformacijskih proizvoda tramadola u pokusima biološke razgradnje u mediju s dodatkom i bez dodatka glukoze

Svi identificirani transformacijski proizvodi tramadola, osim *N*,*N*-didemetil tramadola, bili su detektirani u oba medija (uz dodatak i bez dodatka glukoze), pri čemu je dinamika nastanka glavnog transformacijskog proizvoda nastalog *N*-demetilacijom, *N*-demetil-*cis*-tramadola, bila vrlo slična. Međutim, nastanak *N*,*N*-didemetil tramadola i naglašena akumulacija TRAM TP 277 a detektirani su isključivo kod kometaboličkih uvjeta, i to tek nakon inicijalne dvodnevne akumulacije *N*,*N*-didemetil tramadola, čija se koncentracija, nakon toga, postupno snižavala. U skladu s tim zapažanjem, može se pretpostaviti da je TRAM TP 277 a najvjerovatnije nastao *N*-acetiliranjem *N*,*N*-didemetil tramadola, zbog čega mu je pripisana struktura II prikazana u Tablici 29. Nasuprot tome, transformacijski proizvodi TRAM TP 277 b ili 277 c vjerojatno su nastali formilacijom dominantnog transformacijskog produkta, *N*-demetil-*cis*-tramadola koji je predstavljao ukupno 80 ± 5 % ukupne koncentracije *N*-demetiliranih transformacijskih produkata, premda su, alternativno, mogli nastati i α-C-oksidacijom tramadola u formamid. Teoretska alternativa za jedan od 3 izomerna transformacijska proizvoda je i *N*-oksoetil, *N*-demetil-*cis*-tramadol, koji ima isti elementni sastav kao i preostale 2 predložene strukture. Međutim, ne postoje literaturni podatci o biokemijskom mehanizmu koji bi mogao rezultirati nastajanjem ovog biotransformacijskog proizvoda zbog čega taj spoj nije uvršten kao jedan od kandidata za TRAM TP b ili c.

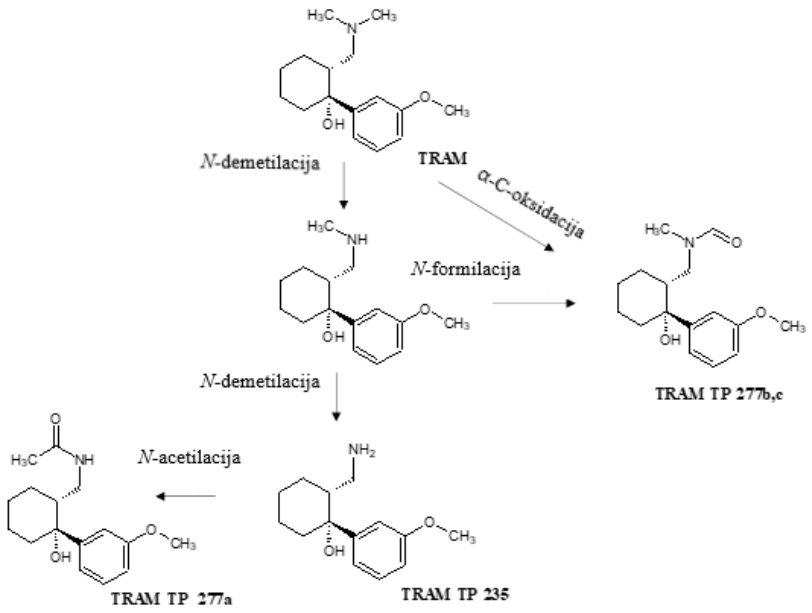
Najzastupljeniji biotransformacijski proizvod metadona bio je EDDP, čije je nastajanje bilo u korelaciji s istovremenim uklanjanjem metadona, kao što je prikazano na Slici 31.



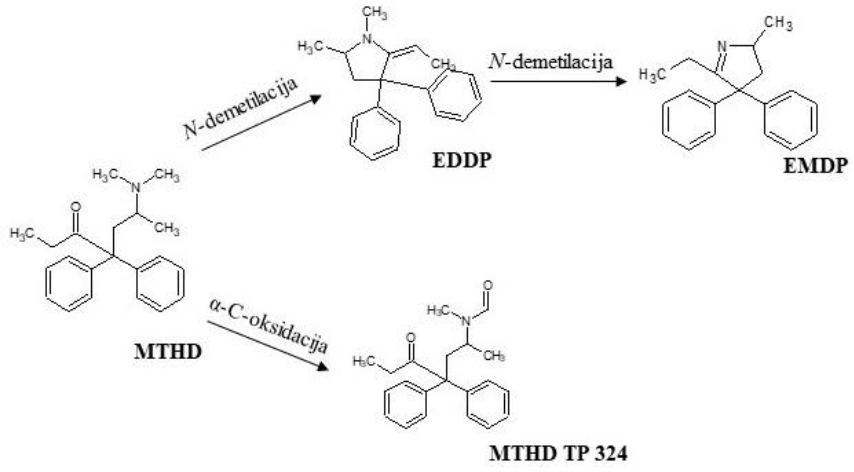
Slika 31. Uklanjanje metadona, nastajanje transformacijskih produkata i sumarna molarna koncentracija metadona i njegovih transformacijskih proizvoda u pokusima biološke razgradnje pomoću adaptirane kulture aktivnog mulja kod kometaboličkih uvjeta

EDDP je predstavljao od 82 % do 92 % ukupno nastalih transformacijskih proizvoda metadona, dok su preostala 2 transformacijska proizvoda bila znatno manje zastupljena.

Temeljem identifikacije transformacijskih proizvoda i uvida u dinamiku nastanka identificiranih transformacijskih proizvoda, predloženi su putevi biotransformacije tramadola i metadona u uvjetima mikrobne razgradnje u aerobnim uvjetima koji su prikazani na Slikama 32 i 33.

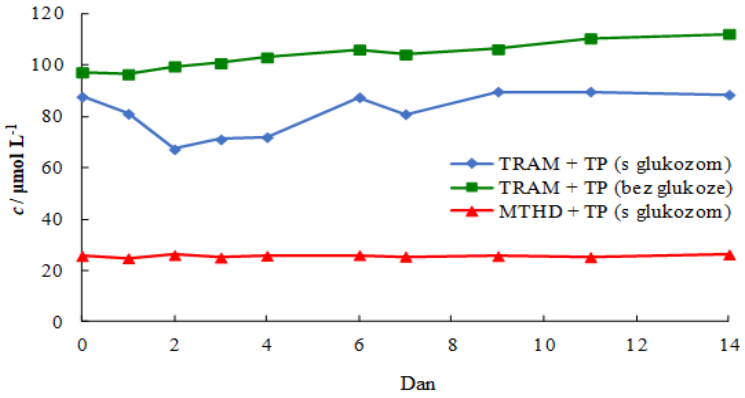


Slika 32. Predloženi biotransformacijski putevi tramadola u aerobnim uvjetima



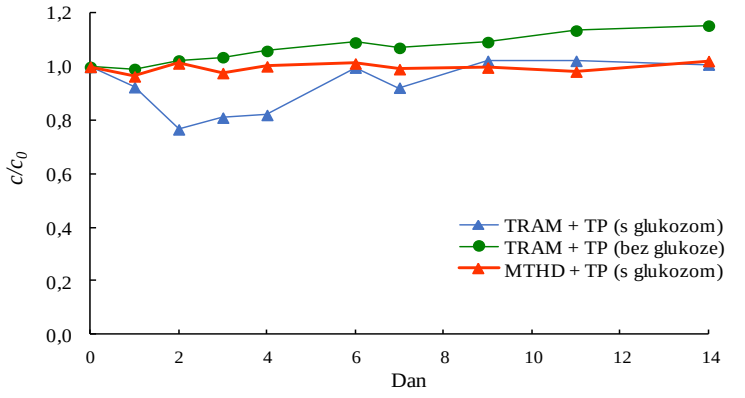
Slika 33. Predloženi biotransformacijski putevi metadona u aerobnim uvjetima

Na temelju semikvantitativnih procjena molarnih koncentracija transformacijskih proizvoda načinjena je masena bilanca tramadola i njegovih transformacijskih proizvoda te metadona i njegovih transformacijskih proizvoda koja je prikazana na slici 34.



Slika 34. Sumarne molarne koncentracije tramadola i metadona te njihovih transformacijskih proizvoda

Unatoč nesigurnostima vezanim uz semikvantitativnu procjenu koncentracija transformacijskih proizvoda, pokazalo se da je sumarna koncentracija tramadola i njegovih transformacijskih proizvoda kao i metadona i njegovih transformacijskih proizvoda bila srazmjerno stabilna tijekom cijelog 14-dnevnog razdoblja pokusa (Slika 35), što podcrtava perzistentan karakter transformacijskih proizvoda nastalih tijekom biorazgradnje istraživanih opioida kod aerobnih uvjeta.

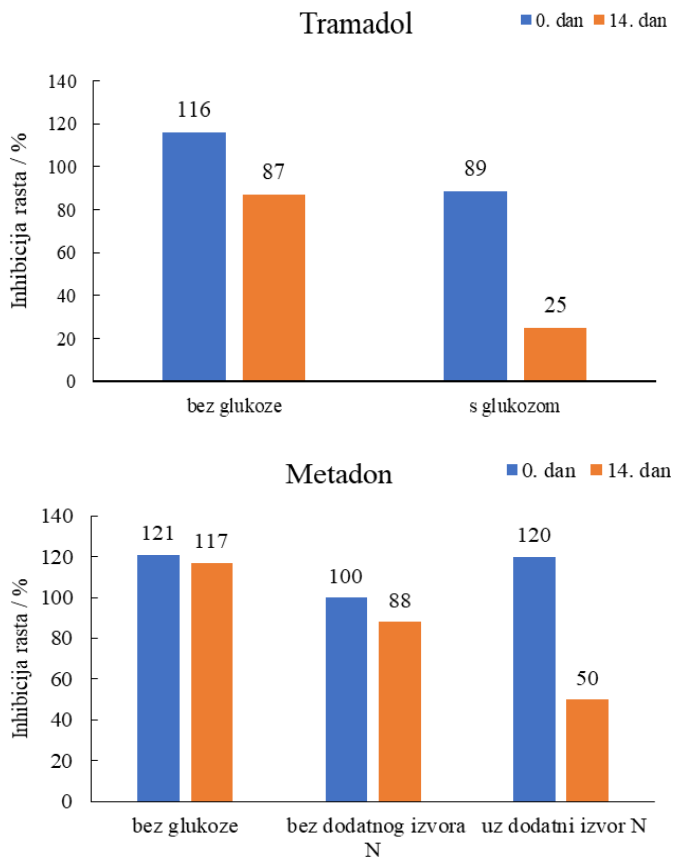


Slika 35. Promjene ukupne koncentracije tramadola i njegovih transformacijskih produkata tijekom aerobne razgradnje s dodatkom i bez dodatka glukoze kao lakorazgradljivog izvora ugljika

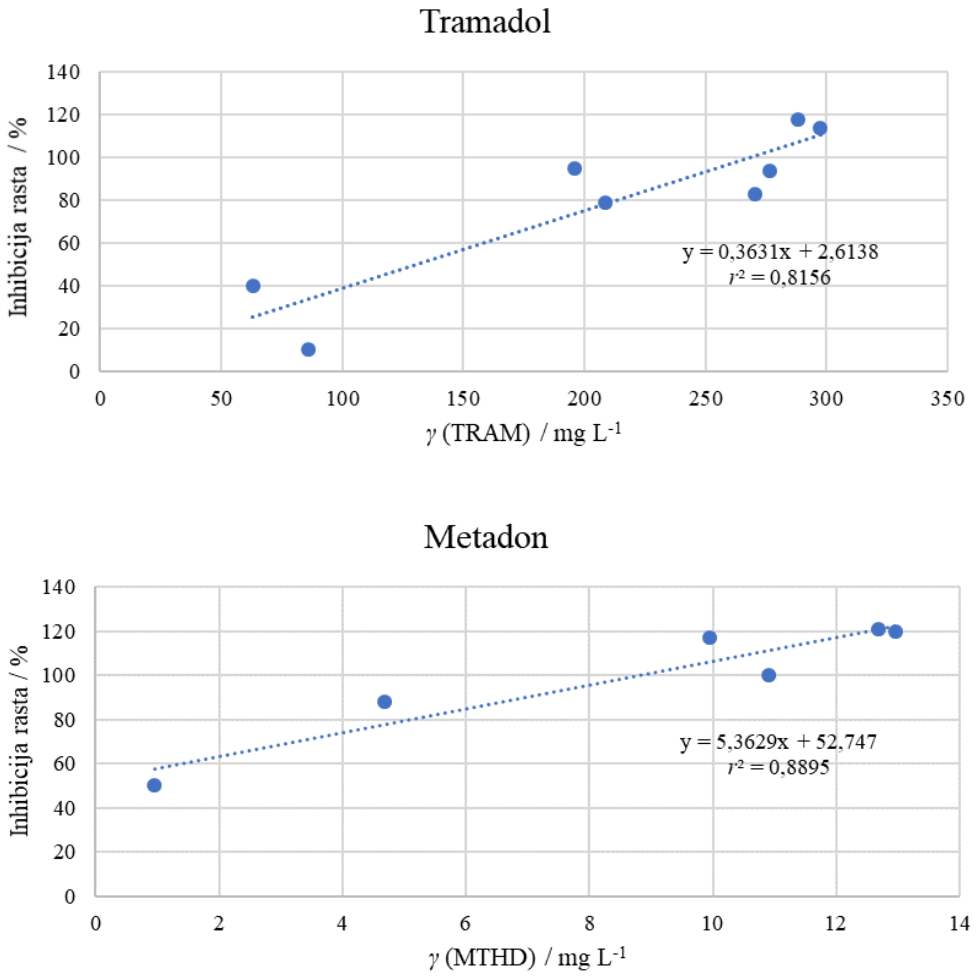
4.3.3. Ekotoksikološka evaluacija biološke transformacije tramadola i metadona

Provedeni pokusi biološke razgradnje tramadola i metadona rezultirali su uklanjanjem roditeljskih spojeva i istovremenim nastajanjem stabilnih transformacijskih proizvoda pri čemu niti u jednom od eksperimenata nije postignuta potpuna eliminacija odabranih opioidnih analgetika, odnosno uklanjanje iznad 99 %. Stoga su svi uzorci iz pokusa biološke razgradnje sadržavali različite udjele roditeljskih spojeva i njihovih transformacijskih proizvoda, što se odražava i na stupanj inhibicije rasta algi u različitim fazama pokusa.

Premda je razgradnja obaju opioida bila praćena akumulacijom prilično stabilnih transformacijskih proizvoda, uklanjanje roditeljskih spojeva rezultiralo je proporcionalnim smanjenjem toksičnosti za alge kod svih istraživanih uvjeta razgradnje (Slika 36), uz srazmjerno visok stupanj korelacije (Slika 37) između koncentracije roditeljskog spoja u podlozi i stupnja inhibicije rasta algi, što implicira pozitivan ekotoksikološki rezultat postignutih aerobnih biotransformacijskih procesa.



Slika 36. Razlike u inhibiciji rasta algi na početku i kraju pokusa biološke razgradnje tramadola i metadona provedenih kod odabranih eksperimentalnih uvjeta



Slika 37. Korelacija inhibicije rasta algi i koncentracije roditeljskih spojeva u podlozi u pokusima biološke razgradnje tramadola i metadona

Iako ni jedan od istraživanih opioida nije visokotoksičan za alge, u ovom je istraživanju pokazano da je metadon (EC_{50} = 5,42 mg L^{-1}) višestruko toksičniji od tramadola (EC_{50} = 47,5 mg L^{-1}).

Ipak, treba naglasiti da za transformacijske proizvode čije referencijske tvari nisu bile dostupne nije bilo moguće odrediti toksičnost za alge niti analitičke povrate, uslijed čega se ne može u potpunosti isključiti mogućnost utjecaja potencijalnog gubitka tih spojeva tijekom priprave uzoraka za ekotoksikološku analizu na rezultate određivanja inhibicije rasta algi u uzorcima izuzetim na kraju pokusa. Međutim, važno je istaknuti da je testiranje dostupnih biotransformacijskih proizvoda metadona, EDDP-a (EC_{50} = 10,9 mg L^{-1}) i EMDPA (EC_{50} = 15,5 mg L^{-1}) potvrdilo njihovu nižu toksičnost za alge u odnosu na toksičnost roditeljskog spoja (EC_{50} = 5,42 mg L^{-1}).

Nadalje, rezultati ovog istraživanja dobro se slažu s rezultatima istraživanja[24] koje je potvrdilo pozitivan ekotoksikološki učinak fotokemijske razgradnje metadona, uz primjenu testa s bioluminiscentnom bakterijom *Vibrio fischeri*. Osim toga, još su neka istraživanja ukazala na potencijalno povoljan ekotoksikološki učinak transformacija ksenobiotika koji uključuju dialkilamino skupinu[106,107,108]. Međutim, važno je istaknuti da je ekotoksikološka evaluacija biotransformacijskih procesa u ovom istraživanju utemeljena isključivo na određivanju toksičnosti za alge, što je nedovoljno za donošenje cjelovite procjene o ekotoksikološkoj prihvatljivosti procesa uključenih u biorazgradnju tramadola i metadona kod oksidativnih uvjeta. Naime, Bergheim i suradnici[109] su, na temelju testova toksičnosti na bakterije *Pseudomonas putida* i *Vibrio fischeri* pokazali da su transformacijski proizvodi nastali u pokusima fotorazgradnje tramadola toksičniji od roditeljskog spoja, dok su González-Mariño i suradnici[58] na temelju preliminarne ekotoksikološke procjene načinjene upotrebom programa US EPA TEST (engl. *Toxicity Estimation Software Tool*) zaključili da bi toksičnost EDDP-a za organizam *Daphnia magna* mogla biti 16 puta viša od toksičnosti metadona.

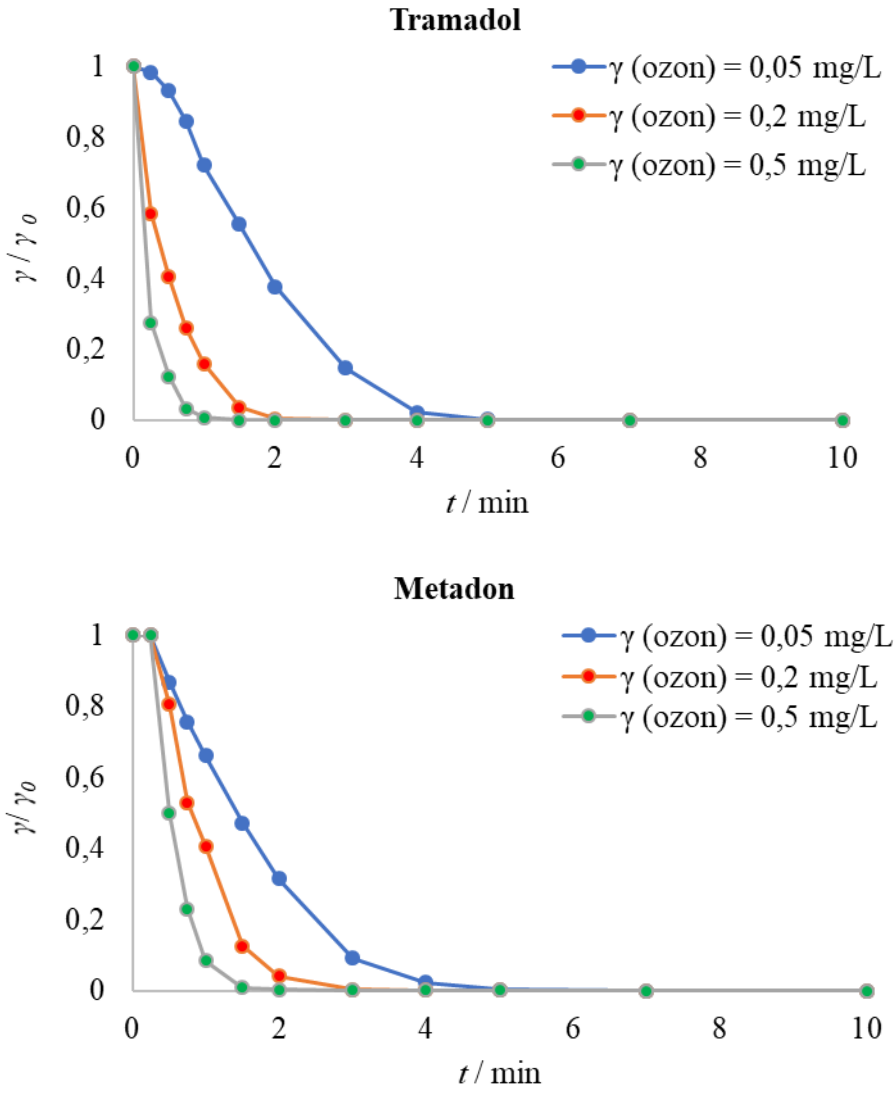
4.4. Uklanjanje tramadola i metadona ozoniranjem

Literaturni podatci jasno pokazuju da je uklanjanje tramadola i metadona u konvencionalnim uređajima s biološkim pročišćavanjem otpadnih voda vrlo slabo[2,4,39,42,43,44,47], a u prethodnom je poglavlju pokazano da su za njihovu biološku transformaciju neophodne visokospecijalizirane mikrobne kulture. Zbog toga je važno razmotriti alternativne i / ili dodatne postupke za njihovo uklanjanje iz opterećenih otpadnih voda, pri čemu istaknuto mjesto imaju napredne oksidacijske tehnike[110].

Stoga je u ovom radu istražena razgradnja dvaju odabranih predstavnika opioidnih analgetika, tramadola i metadona ozoniranjem. Istraživanja su provedena u laboratorijskim modelnim pokusima opisanim u poglavlju 3.6.3.

4.4.1. Učinkovitost i kinetika uklanjanja tramadola i metadona ozoniranjem

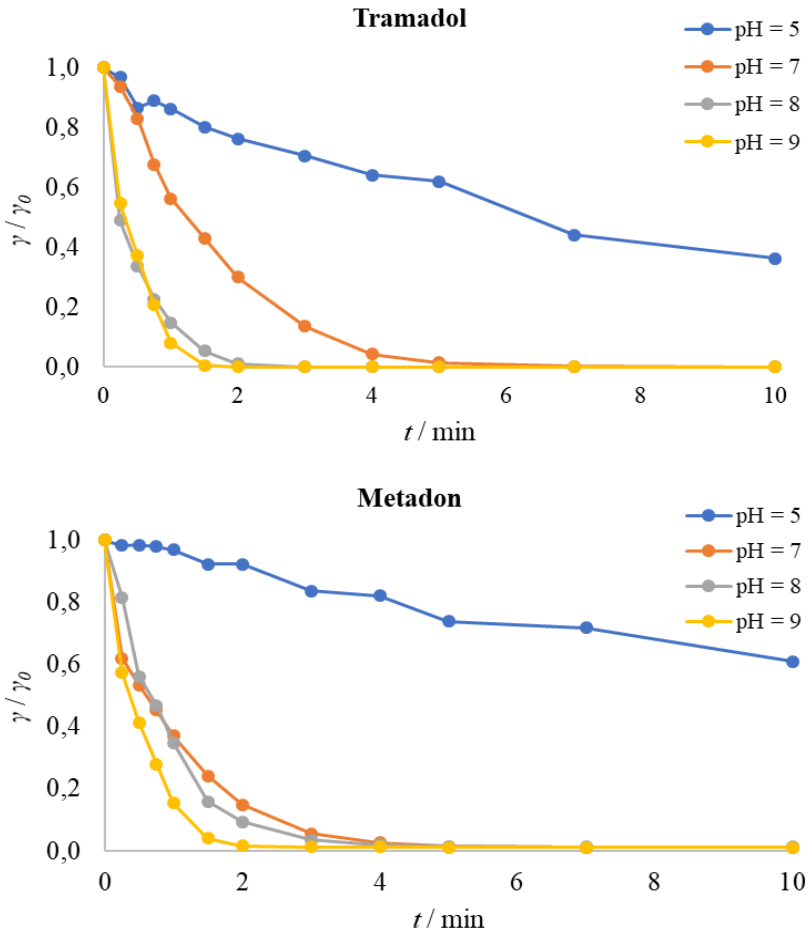
Pokusi ozoniranja provedeni su na nekoliko razina složenosti vodene matrice čime je bilo omogućeno sustavno proučavanje čimbenika koji utječu na učinkovitost procesa i nastajanje transformacijskih produkata. Kako bi se izbjegao utjecaj interferirajućih tvari iz matrice koje bi mogle utjecati na brzinu razgradnje i otežati identifikaciju transformacijskih proizvoda, u preliminarnim pokusima istražena je kinetika uklanjanja u ultračistoj vodi. Krivulje uklanjanja tramadola i metadona primjenom triju različitih masenih koncentracija ozona (0,05 mg L^{-1}, 0,2 mg L^{-1} te 0,5 mg L^{-1}) prikazane su na Slici 38.



Slika 38. Kinetika uklanjanja tramadola i metadona u ultračistoj vodi primjenom triju odabranih masenih koncentracija ozona

U skladu s očekivanjima, porastom koncentracije uvedenog ozona postignuto je brže uklanjanje obaju opioidna analgetika. Ovi rezultati su u skladu s onima o kojima su izvijestili Zoumpouli i suradnici[111]. U pokusima provedenim u ovom radu oba su opioida iz ultračiste vode u potpunosti uklonjena u manje od 5 minuta, kod svih istraživanih koncentracija ozona. Primjenom 0,2 mg L^{-1} ozona 99 %-tno uklanjanje tramadola postignuto je za manje od 2 minute, dok je za 99 %-tno uklanjanje metadona bilo potrebno 3 minute. Povećanjem koncentracije ozona nije postignuta proporcionalno viša brzina uklanjanja te je koncentracija ozona od 0,2 mg L^{-1} odabrana za provedbu daljnjih pokusa.

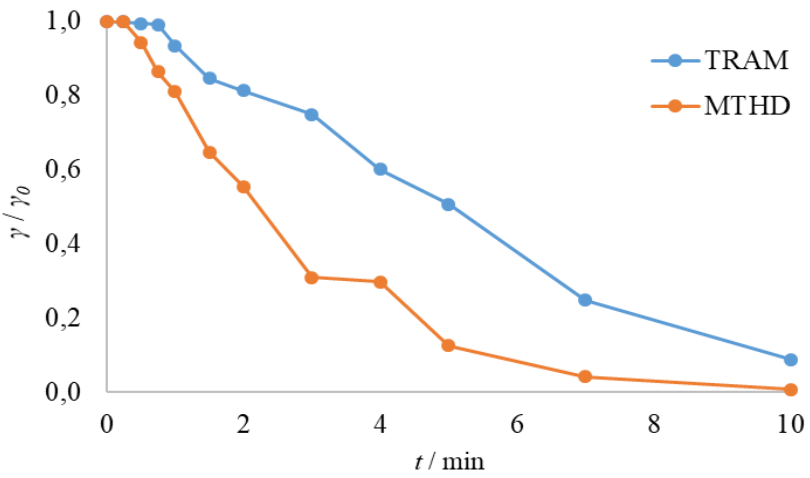
Kako bi se ispitao utjecaj vrijednosti pH medija na brzinu uklanjanja ozoniranjem, pokusi ozoniranja provedeni su u vodenoj matrici koja je sadržavala fosfatni pufer, pri čemu je vrijednost pH varirala od 5 do 9. Krivulje uklanjanja tramadola i metadona kod vrijednosti pH 5, 7, 8 i 9, prikazane su na Slici 39.



Slika 39. Kinetika uklanjanja tramadola i metadona u fosfatnim puferima različitih vrijednosti pH primjenom ozona koncentracije 0,2 mg L^{-1}

Ozoniranjem s 0,2 mg L^{-1} ozona u bazičnim i neutralnim uvjetima (pH = 9, 8, 7) oba opioidna analgetika u potpunosti su uklonjena u manje od 5 minuta, pri čemu je uklanjanje ipak bilo brže u bazičnim uvjetima (pH = 9). Uklanjanje tramadola i metadona bilo je znatno usporeno tek u kiselim uvjetima (pH = 5). U tim uvjetima u 5 je minuta uklonjeno svega 38 % tramadola i 26 % metadona. Rezultati ukazuju na važnost deprotoniranja amino grupe za učinkovitu reakciju s ozonom. Metadon i tramadol su spojevi čiji bazični karakter određuje dimetilamino skupina te imaju vrlo sličnu konstantu disocijacije (p*K*a metadona 9,2; p*K*a tramadola 9,4). Rezultati ukazuju da je za reakciju ozonom ključno da molekula bude raspoloživa u deprotoniranom obliku. Slično su zaključili i Zoumpouli i suradnici[111], koji su postigli dvostruko višu učinkovitost uklanjanja metadona ozoniranjem u puferu vrjednosti pH 11 u odnosu na pufer vrijednosti pH 3.

Kako bi se istražila učinkovitost uklanjanja obaju odabranih opioida u realnoj matrici, provedeno je njihovo ozoniranje u pročišćenoj otpadnoj vodi podrijetlom s CUPOVZ-a. Eksperimenti su provedeni primjenom prethodno optimizirane masene koncentracije ozona (γ = 0,2 mg L^{-1}) i pH matrice 7,9. Rezultati su prikazani su na Slici 40.



Slika 40. Kinetika uklanjanja tramadola i metadona u pročišćenoj otpadnoj vodi podrijetlom s Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba primjenom ozona koncentracije 0,2 mg L^{-1}

U 10 minuta, koncentracija tramadola u pročišćenoj otpadnoj vodi snižena je za 91 %, a metadona za 99 %. Treba naglasiti da se uklanjanje promatranih spojeva u pročišćenoj otpadnoj vodi odvijalo dvostruko sporije nego u matricama koje nisu sadržavale organsku tvar

(Tablica 30), što se može pripisati sniženju koncentracije raspoloživog otopljenog ozona zbog interakcije s organskom matricom pročišćene otpadne vode. Boleda i suradnici[51] uklanjali su metadon ozoniranjem u nepročišćenoj otpadnoj vodi te su postigli ukupnu eliminaciju od samo 44 %. To ukazuje da izravno ozoniranje nepročišćene vode nije dobra opcija za učinkovito uklanjanje opioida. Viši stupanj uklanjanja metadona (99 %) koji je postignut u ovom istraživanju najvjerojatnije je posljedica znatno nižeg organskog opterećenja pročišćene u odnosu na nepročišćenu otpadnu vodu. Taj rezultat ujedno sugerira da bi se ozoniranje moglo primijeniti pri dodatnoj obradi biološki pročišćenih otpadnih voda.

Kinetički parametri ozoniranja tramadola i metadona u različitim matricama primjenom različitih eksperimentalnih uvjeta određeni su primjenom kinetičkog modela prvog reda te prikazani u Tablici 30.

Tablica 30. Usporedba kinetike uklanjanja tramadola i metadona ozoniranjem za različite tipove vodenih matrica

Matrica	**pH**	**γ (O_3) / mg L^{-1}**	**Tramadol**		**Metadon**	
			***k* / min^{-1}**	**$t_{1/2}$ / min**	***k* / min^{-1}**	**$t_{1/2}$ / min**
Čista voda	7,6	0,05	0,53	1,31	0,87	0,78
		0,2	2,37	0,29	1,74	0,40
		0,5	5,07	0,14	2,41	0,29
Fosfatni pufer	5,0	0,2	0,13	5,55	0,05	13,9
	7,0		0,75	0,92	0,97	0,72
	8,0		2,14	0,32	1,14	0,61
	9,0		2,67	0,26	1,72	0,40
Pročišćena otpadna voda	7,9	0,2	0,23	3,01	0,40	1,72

Najdulje vrijeme poluraspada određeno je za tramadol (5,55 min) i metadon (13,9 min) u fosfatnom puferu čiji je pH bio podešen na 5. Očekivano, najbrža razgradnja ozoniranjem postiže se u čistoj vodi (najkraće vrijeme poluraspada zabilježeno je za tramadol ($t_{1/2}$ = 0,14 min), ali ti uvjeti nisu relevantni za realne matrice. Ozoniranjem u realnoj matrici pročišćene otpadne vode konstanta brzine reakcije uklanjanja tramadola bila je 0,23 min^{-1}, dok je za metadon bila 0,40 min^{-1}, što upućuje na bržu kinetiku uklanjanja metadona ozoniranjem u odnosu na tramadol.

4.4.2. Identifikacija transformacijskih proizvoda tramadola i metadona nastalih ozoniranjem

Uklanjanje tramadola i metadona ozoniranjem bilo je povezano s istovremenim nastajanjem njihovih transformacijskih produkata. Identifikacija nastalih transformacijskih produkata, načinjena je u ozoniranim uzorcima čiste vode čime je otklonjena opasnost intereferencije drugih tvari u postupku identifikacije. U pokusima ozoniranja tramadola identificirana su dva, a u pokusima ozoniranja metadona tri transformacijska produkta. U Tablici 31 prikazani su kromatografski i masenospektrometrijski parametri roditeljskih spojeva i njihovih transformacijskih proizvoda nastalih ozoniranjem.

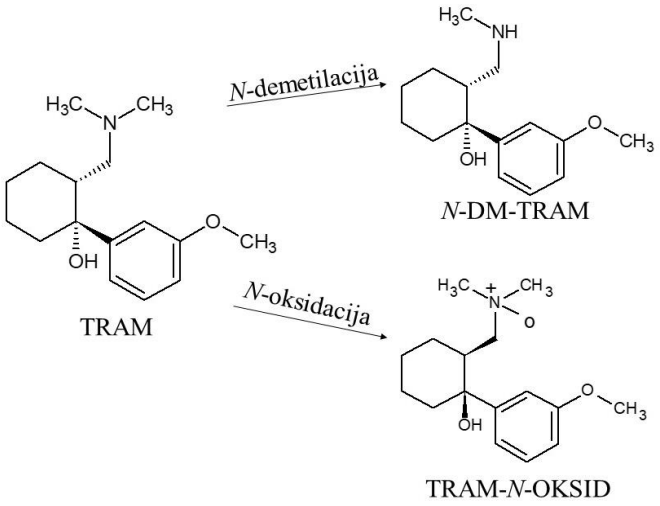
Tablica 31. Transformacijski proizvodi tramadola i metadona nastali ozoniranjem te njihovo kromatografsko vrijeme zadržavanja, elementni sastav, teorijske vrijednosti *m*/*z* te odstupanje eksperimentalnih vrijednosti *m*/*z* od teorijskih

Roditeljski spoj	**Naziv transformacijskog proizvoda***	**t_R / min**	**Elementni sastav $[M+H]^+$**	***m*/*z* (teorijski)**	**Δ *m*/*z* / mDa**
TRAM	-	3,78	$C_{16}H_{26}NO_2$	264,1964	+ 0,7
	N-DM-TRAM[1]	3,78	$C_{15}H_{24}NO_2$	250,1807	+ 1,3
	TRAM-*N*-oksid[2b]	3,98	$C_{16}H_{26}NO_3$	280,1913	- 0,8
MTHD	-	6,38	$C_{21}H_{28}NO$	310,2171	- 0,6
	EDDP[1]	5,87	$C_{20}H_{24}N$	278,1909	+ 0,8
	EDDP-*N*-oksid[2b]	5,34	$C_{20}H_{24}NO$	294,1858	- 0,4
	MTHD-*N*-oksid[2b]	8,26	$C_{21}H_{28}NO_2$	326,2120	- 1,8

*stupanj pouzdanosti identifikacije određen prema Schymanski i sur.[100]

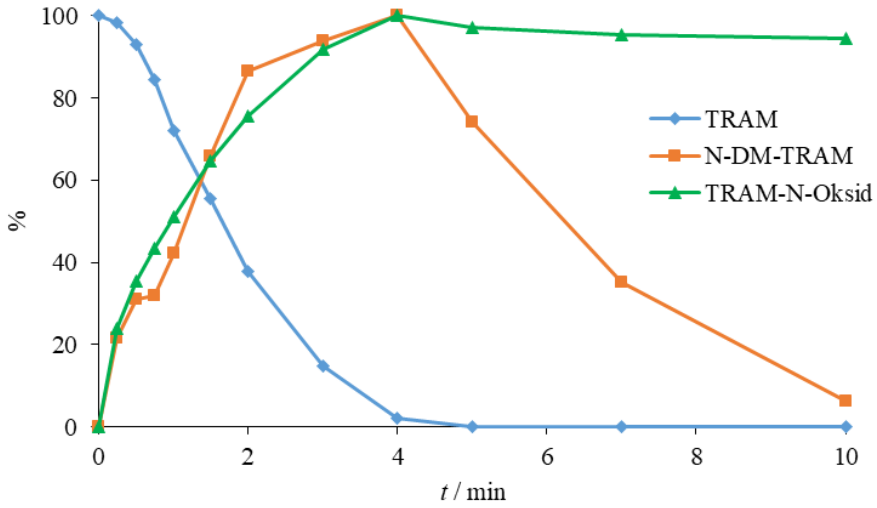
Ozoniranjem tramadola nastala su dva transformacijska proizvoda, od kojih je za jedan vrijednost *m*/*z* bila 250,1807, što odgovara sastavu protonirane molekule *N*-demetil-*cis*-tramadola, dok je vrijednost *m*/*z* drugog transformacijskog produkta bila 280,1913, što odgovara sastavu protonirane molekule tramadol-*N*-oksida. Iako su tramadol i *N*-demetil-*cis*-tramadol koeluirali s kromatografske kolone, nedvosmislena identifikacija *N*-demetil-*cis*-tramadola provedena je na temelju točne mase i usporedbe spektara masa novonastalog transformacijskog proizvoda i *N*-demetil-*cis*-tramadola. Glavni mehanizmi uključeni u transformaciju tramadola uključivali su *N*-demetilaciju i *N*-oksidaciju roditeljskog spoja

(Slika 41), što je u skladu s literaturno opisanim mehanizmima transformacije spojeva koji sadrže dialkilamino skupinu[24].



Slika 41. Transformacijski procesi i nastali transformacijski produkti tramadola u pokusima ozoniranja

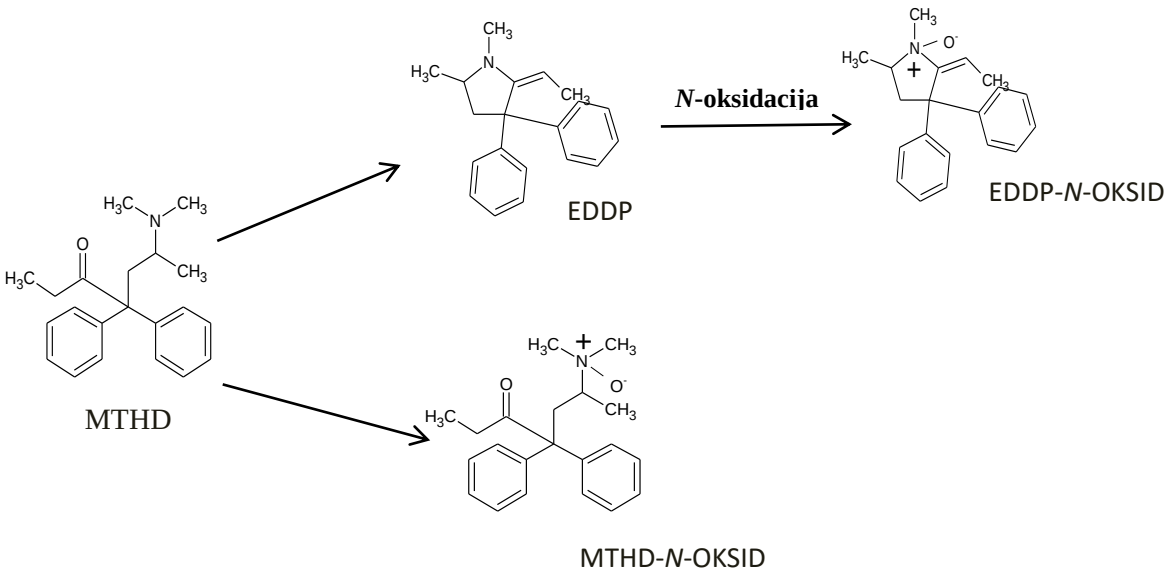
Dinamika uklanjanja tramadola u prve 4 minute pokusa bila je praćena istovremenim nastankom obaju identificiranih transformacijskih proizvoda (tramadol-*N*-oksida i *N*-demetil-*cis*-tramadola), kao što je prikazano na Slici 42.



Slika 42. Postotak uklanjanja tramadola te nastajanja njegovih transformacijskih produkata *N*-demetil-*cis*-tramadola (*N*-DM-TRAM) i tramadol-*N*-oksida (TRAM-*N*-oksid) ozoniranjem u čistoj vodi, γ (O_3) = 0,05 mg L^{-1}

Međutim, nakon četvrte minute, kada je tramadol bio u potpunosti uklonjen (> 99 %), daljnjim je ozoniranjem, u sljedećih 6 minuta, iz medija u potpunosti uklonjen i *N*-demetil-*cis*-tramadol (> 99 %), dok je koncentracija tramadol-*N*-oksida u tom razdoblju ostala praktički nepromijenjena, ukazujući na visoku stabilnost ovog transformacijskog proizvoda.

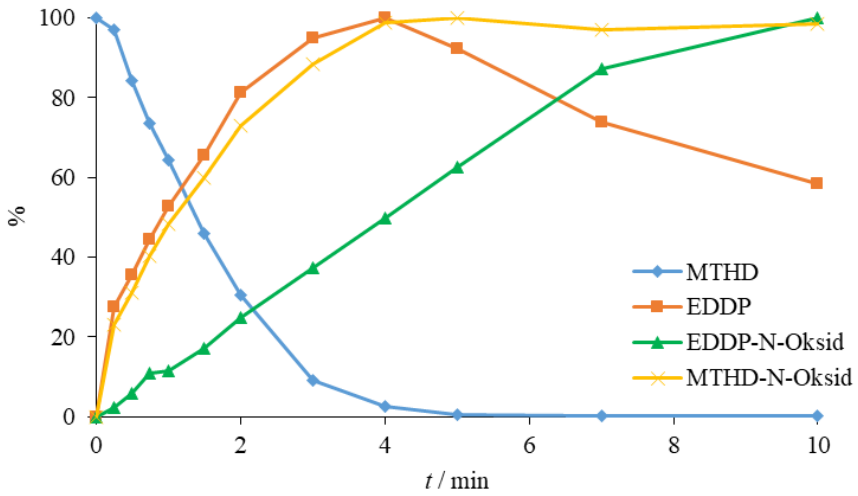
Ozoniranjem metadona nastala su tri transformacijska produkta, metadon-*N*-oksid (*m*/*z* 326,2120), EDDP (*m*/*z* 278,1909) i EDDP-*N*-oksid (*m*/*z* 294,1858), što je potvrdilo da su i u transformaciji MTHD glavnu ulogu imali isti mehanizmi (*N*-demetilacija i *N*-oksidacija) kao i u transformaciji tramadola. Metadon-*N*-oksid nastao je *N*-oksidacijom metadona, EDDP njegovom *N*-demetilacijom i ciklizacijom, dok je EDDP-*N*-oksid nastao *N*-oksidacijom EDDP-a (Slika 43). Iste su transformacijske proizvode detektirali i Postigo i suradnici[24] u pokusima fotokatalitičke i fotolitičke transformacije metadona u demineraliziranoj i pročišćenoj otpadnoj vodi.



Slika 43. Transformacija metadona u pokusima ozoniranja

Dinamika uklanjanja metadona ozoniranjem te nastajanja njegovih transformacijskih proizvoda prikazana je na Slici 44. Uklanjanje metadona u prve 4 minute pokusa bilo je praćeno paralelnim nastankom EDDP-a i metadon-*N*-oksida te sporijim nastankom EDDP-*N*-oksida. Međutim, nakon četvrte minute, kada je metadon bio u potpunosti uklonjen (> 99 %), daljnjim je ozoniranjem zabilježeno sniženje koncentracije EDDP-a koje je bilo

praćeno porastom koncentracije EDDP-*N*-oksida. Koncentracija metadon-*N*-oksida se, nakon 4. minute pokusa, kada je dostigla svoj maksimum, nije snižavala do kraja pokusa.



Slika 44. Uklanjanje metadona te nastajanje njegovih transformacijskih produkata ozoniranjem u čistoj vodi, γ (O_3) = 0,05 mg L^{-1}. Metadon (MTHD), 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolina (EDDP), 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin-*N*-oksid (EDDP-*N*-oksid) te metadon-*N*-oksid (MTHD-*N*-oksid)

Ovaj rezultat je u skladu s rezultatom za tramadol-*N*-oksid i ukazuje na izrazito visoku stabilnost *N*-oksidiranih spojeva na daljnju razgradnju zbog čega bi trebalo istražiti njihovu ekotoksikološku prihvatljivost.

§ 5. ZAKLJUČAK

Strukturna raznolikost i brojnost opioidnih analgetika i njihovih metabolita predstavlja značajan analitički izazov te u dostupnoj literaturi ima vrlo malo radova koji pitanju izloženosti vodenog okoliša toj skupini spojeva pristupaju na sveoubuhvatan način. U ovom doktorskom radu su stoga razvijene analitičke metode za multirezidualno određivanje tragova 27 opioidnih analgetika i njihovih transformacijskih produkata u otopljenoj i čvrstoj frakciji otpadnih i prirodnih voda upotrebom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa s trostrukim kvadrupolom. Da bi se postigla potrebna osjetljivost i selektivnost metode, razvijeni analitički protokoli za analizu okolišnih uzoraka obuhvaćaju i predobradu uzoraka u više koraka s ciljem da se prije same instrumentne analize postigne što veći stupanj obogaćenja (koncentriranja) uzorka uz istovremeno uklanjanje interferirajućih tvari. Za uzorke vode (otopljena faza) to je postignuto selektivnom ekstrakcijom uz primjenu miješanog polimernog sorbensa koji omogućava učinkovito obogaćivanje bazičnih opioidnih analita hidrofilno-lipofilnim interakcijama te kationskom izmjenom. Zahvaljujući tome razvijene metode obuhvaćaju i izrazito polarne opioide, kao što su morfin i njegovi derivati, dihidromorfin, hidromorfin, oksimorfon, morfin-3-β-D-glukuronid i morfin-6-β-D-glukuronid. Dodatna prednost takvog miješanog sorbensa je povećanje selektivnosti metode primjenom sekvencijalnog eluiranja, čime se uklanjaju glavne anionske interferencije što je posebno važno kada se radi o teško opterećenim uzorcima nepročišćenih otpadnih voda.

Što se tiče čvrstih uzoraka (suspendirana tvar, mulj i sediment), učinkovita ekstrakcija postignuta je ubrzanom visokotlačnom ekstrakcijom otapalom, a selektivnost metode povećana je dodatnim pročišćavanjem ekstrakata na slabim anionsko-izmjenjivačkim sorbensima. Usprkos svim poduzetim mjerama za smanjenje utjecaja matrice, ključan preduvjet za visoku točnost i preciznost razvijenih metoda bila je upotreba prikladnih izotopno obilježenih surogata analiziranih spojeva.

Tijekom razvoja metoda, posebna pozornost posvećena je očuvanju integriteta uzoraka te je istraženo nekoliko načina skladištenja uzoraka prije instrumentne analize. Kao najbolji odabir pokazalo se skladištenje uzoraka u sorbiranom obliku (nakon propuštanja uzorka vode

i sušenja sorbensa) te eluacija analita sa sorbensa i priprava konačnog ekstrakta na dan analize.

Validacijom konačnih protokola za analizu tekućih i čvrstih uzoraka potvrđena je visoka pouzdanost razvijenih metoda za multirezidualnu analizu niskih koncentracija 27 opioidnih analgetika i njihovih metabolita u svim relevantnim matricama u vodenom okolišu. Na taj način stvoren je ključni alat za sustavno praćenje rasprostranjenosti i ponašanja opioidnih analgetika u otpadnim i prirodnim vodama s ciljem procjene njihova mogućeg utjecaja na okoliš. Osim toga, analizom otpadnih voda moguće je procijeniti dinamiku upotrebe raznih opiodnih spojeva s ciljem da se ukaže na ilegalne izvore i potencijalnu zloupotrebu tih tvari (epidemiologija otpadnih voda).

Razvijene metode primijenjene su za sustavno istraživanje pojavnosti i zastupljenosti opioidnih analgetika u vodenom okolišu te se pokazalo kako je doprinos metabolita u ukupnoj zastupljenosti opioidnih spojeva značajan.

Sustavno istraživanje provedeno u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba od 2017. do 2020. godine pokazalo je da je od analiziranih 27 opioidnih spojeva njih 13 bilo prisutno u detektabilnim koncentracijama. Ukupna masena koncentracija opioidnih analgetika u nepročišćenim otpadnim vodama najčešće je prelazila razinu od 1 μg L^{-1}, a najzastupljeniji predstavnici bili su tramadol, metadon i njihovi metaboliti. Značajan udio u ukupnoj koncentraciji tih opioida potjecao je od njihovih humanih metabolita *O*- i *N*-demetil-*cis*-tramadola te EDDP-a. Treba naglasiti da je glavnina detektiranih opioida bila prisutna u otopljenoj frakciji, dok je doprinos opioidnih analgetika vezanih za suspendirane čestice bio manji od 5 %. Povišeni udjeli opioida mogu se naći na aktivnom mulju u aearacijskom bazenu, ali te čestice ne dospijevaju izravno u vodeni okoliš jer se izdvajaju u sekundarnom taložniku. Zbog toga se može zaključiti da se sekundarnim efluentima u prirodne vode (u slučaju zagrebačkog uređaja u rijeku Savu) opioidi unose gotovo isključivo u otopljenom obliku.

Učinkovitost uklanjanja pojedinih opioidnih spojeva u CUPOVZ-u detaljno je proučena tijekom četverogodišnjeg razdoblja. Za manji broj opioida (6-acetilmorfin, morfin-3-β-D-glukuronid i morfin-6-β-D-glukuronid) postiže se relativno visok stupanj uklanjanja. Međutim, za većinu opioida, a posebno za najzastupljenije predstavnike, tramadol i metadon, zabilježeni su vrlo niski stupnjevi uklanjanja (6 %, odnosno 19 %) u klasičnom uređaju za mehaničko-biološko pročišćavanje s aktivnim muljem. To ukazuje da bi za uspješnu

eliminaciju takvih postojanih spojeva trebalo primijeniti dodatne naprednije tehnološke procese.

Analize opioidnih spojeva na CUPOVZ-u omogućile su procjenu trendova potrošnje tih farmaceutika na području Grada Zagreba. Praćenjem tjedne dinamike zaključeno je da je stopa potrošnje vikendom i radnim danom ujednačena, što i jest karakteristično za opijate. Osim toga, podatci o masenim protocima glavnih opioida u CUPOVZ-u uspoređeni su sa službenim godišnjim izvješćima o potrošnji lijekova koju izdaje HALMED te je utvrđena dobra korelacija.

U tom je kontekstu zanimljivo napomenuti da su izmjerene koncentracije opioida u pročišćenim otpadnim vodama kod nas bile slične ili niže od literaturno dostupnih podataka, osim anomalno povišene koncentracije tramadola u otpadnoj vodi Grada Zaprešića. Budući da je u tom uzorku udio roditeljskog spoja bio mnogo viši nego u tipičnim komunalnim otpadnim vodama, takva situacija ukazala je na postojanje dodatnog neterapijskog izvora tramadola, kao što su otpadne vode farmaceutske industrije ili odbačeni lijekovi.

Određivanja opioida u rijeci Savi pokazala su prisutnost promatranih spojeva u vrlo niskim koncentracijama reda veličine ng L^{-1} i samo su najzastupljeniji opioidi, tramadol, metadon i njihovi metaboliti, detektirani u svim uzorcima. Općenito se može reći da izmjerene koncentracije opioidnih analgetika u Savi ne predstavljaju opasnost u pogledu akutne toksičnosti za vodene organizme. Prostorna raspodjela, koja je praćena na longitudinalnom odsječku od Šentjakoba u Sloveniji do Siska, odražavala je položaj glavnih ispusta komunalnih otpadnih voda, a glavni izvori unosa bili su otpadne vode najvećih gradova, Zagreba i Ljubljane. Istodobno praćenje koncentracija najrasprostranjenijih opioida tramadola i metadona i njihovih metabolita u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda i rijeci Savi omogućilo je promatranje masene bilance tih spojeva na promatranom odsječku rijeke Save. Bilanca je ukazala na vrlo konzervativno ponašanje tramadola, a u manjoj mjeri i metadona, što ukazuje da su mogući eliminacijski procesi (biološka razgradnja, fotokemijska razgradnja) bili vrlo slabi.

Zbog visoke zastupljenosti u otpadnim vodama, slabe učinkovitosti uobičajenog pročišćavanja otpadnih voda u postupku s aktivnim muljem i postojanosti u okolišu, nužno je razmotriti alternativne tehnološke procese za uklanjanje teško razgradljivih opioida kao što su tramadol i metadon. Istraživanja provedena u ovom radu pokazala su da je biološka razgradnja tramadola i metadona moguća tek s posebno obogaćenim mješovitim mikrobnim

kulturama. Proces adaptacije prilikom kojega se odvija selekcija mikroorganizama sposobnih za transformaciju je vrlo dugotrajan i zahtijeva pažljiv odabir medija u pogledu dostupnosti dodatnih izvora ugljika i dušika. U optimalnim kometaboličkim uvjetima za oba opioidna analgetika postignuta je relativno visoka učinkovitost uklanjanja (> 80 %). Međutim mikrobna razgradnja bila je praćena istodobnim formiranjem i akumulacijom 5 stabilnih transformacijskih produkata tramadola te 3 transformacijska produkta metadona, a glavni mehanizam transformacije bio je *N*-demetilacija. Uklanjanje roditeljskih spojeva rezultiralo je proporcionalnim smanjenjem toksičnosti za alge, što implicira pozitivan ekotoksikološki rezultat provedenih biotransformacijskih procesa.

Budući da je za provedbu biotičkih transformacijskih procesa nužna dugotrajna prethodna priprava visokospecijalizirane mikrobne kulture, alternativno je istražena abiotička razgradnja tramadola i metadona ozoniranjem. Pokazano je da je kinetika uklanjanja vrlo brza pri čemu su uklanjanju tramadola i metadona pogodovali bazični uvjeti. To ukazuje na važnost deprotoniranja amino grupe za učinkovitu reakciju s ozonom. U pročišćenoj otpadnoj vodi ozoniranjem je u 10 minuta postignuto uklanjanje više od 90 % obaju opioidna analgetika, što upućuje da bi se ozoniranje moglo primijeniti u dodatnoj obradi biološki pročišćenih otpadnih voda. Međutim, kao i u slučaju biološke razgradnje, uklanjanje roditeljskih spojeva bilo je povezano s nastajanjem stabilnih transformacijskih produkata, pri čemu su glavni mehanizmi u transformaciji bili *N*-demetilacija i *N*-oksidacija. Moguće štetne učinke tih transformacijskih produkata trebalo bi uzeti u obzir prilikom procjene učinkovitosti ozoniranja za smanjenje okolišnog rizika.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

APCI – kemijska ionizacija na atmosferskom tlaku

APPI – fotoionizacija na atmosferskom tlaku

BUP – buprenorfin

BUP-d^4 – buprenorfin-d_4

COD – kodein

COD-d^3 – kodein-d_3

CUPOVZ – Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba

DCOD – dihidrokodein

DCOD-d^3 – dihidrokodein-d_3

DDD / 1000 / dan – definirana dnevna doza na tisuću stanovnika po danu

DMOR – dihidromorfin

EC – novi tipovi zagađivala (engl. *emerging contaminants*)

EDA – analiza usmjerena učincima

EDDP – 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolin

EDDP-d^3 – 2-etilidien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin-d_3

EM – etilmorfin

EMDP – 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin

ESI – ionizacija elektroraspršenjem

FNT – fentanil

FNT-d^5 – fentanil-d_5

GC – plinska kromatografija

HALMED – Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HC – hidrokodon

HC-d^3 – hidrokodon-d_3

HM – hidromorfon

HM-d^3 – hidromorfon-d_3

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HRMS – spektrometrija masa visoke rezolucije

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LC – tekućinska kromatografija

LC-MS/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa

Leu-Enk – leucin-enkefalin

MOR – morfin

MOR-d^3 – morfin-d_3

MRM – tehnika praćenja višestrukih reakcijskih tranzicijskih iona

MS – spektrometrija masa

MS-MS – tandemna spektrometrija masa

MTHD – metadon

MTHD-d^3 – metadon-d_3

M3G – morfin-3-β-D-glukuronid

M3G-d^3 – morfin-3- β-D-glukuronid-d_3

M6G – morfin-6-β-D-glukuronid

NFNT – norfentanil

NFNT-d^5 – norfentanil-d_5

NHC – norhidrokodon

NHC-d^3 – norhidrokodon-d_3

NOC – noroksikodon

norBUP – norbuprenorfin

norBUP-d^3 – norbuprenorfin-d_3

norCOD – norkodein

norMOR – normorfin

N-DM-TRAM – *N*-demetil-*cis*-tramadol

OC – oksikodon

OC-d^6 – oksikodon-d_6

OM – oksimorfon

OM-d^3 – oksimorfon-d_3

Orbitrap – analizator masa s linearnom stupicom za ione

O-DM-TRAM – *O*-demetil-*cis*-tramadol

PLE – ubrzana visokotlačna ekstrakcija otapalom

POCIS – diskovi sa sorbensima prikladnima za ekstrakciju polarnih organskih tvari

PP – propoksifen

PP-d^5 – propoksifen-d_5

t_R – vrijeme zadržavanja

SD – standardna devijacija

SFNT – sufentanil

SFNT-d^5 – sufentanil-d_5

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi

SPM – suspendirane čestice

TP – transformacijski proizvodi

TRAM – tramadol

TRAM-O-Cd^3 – tramadol-O-Cd_3

UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

UPOV – uređaj za pročišćavanje otpadnih voda

Q/ToF – analizator masa mjerenjem vremena leta

QqQ – analizator masa s trostrukim kvadrupolom

6-AM – 6-acetilmorfin

6-AM-d^3 – 6-acetilmorfin-d_3

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. S. Martins, A. Sarvet, J. Santaella-Tenorio, T. Saha, B. F. Grant i D. S. Hasin, *JAMA Psychiatry* **74 (5)** (2017) 445-455.
2. S. Terzić, I. Senta i M. Ahel, *Environ. Pollut.* **158** (2010) 2686-2693.
3. M. J. Andrés-Costa, V. Andreu i Y. Picó, *J. Chromatogr. A* **1461** (2016) 98-106.
4. A. J. Skees, K. S. Foppe, B. Loganathan i B. Subedi, *Sci. Total Environ.* **631-632** (2018) 1457-1464.
5. A. Z. DePriest, B. L. Puet, A. C. Holt, A. Roberts i E. J. Cone, *Forensic Sci. Rev.* **27 (2)** (2015) 142-145.
6. U. Boerner, R. L. Roe i C. E. Becker, *J. Pharm. Pharmacol.* **26** (1974) 393-398.
7. C. E. Inturrisi i K. Verebely, *Clin. Pharmacol. Ther.* **13 (5)** (1972) 633-637.
8. M. J. Kreek, F. A. Bencsath, A. Fanizza i F. H. Field, *Biomed. Mass Spectrom.* **10 (10)** (1983) 544-549.
9. B. I. Escher i K. Fenner, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 3835-3847.
10. M. C. Campos-Mañas, I. Ferrer, E. M. Thurman i A. Agüera, *Trends Environ. Anal. Chem.* **20** (2018) 1-12.
11. F. Mari, L. Politi, A. Biggeri, G. Accetta, C. Trignano, M. Di Padua i E. Bertol, *Forensic Sci. Int.* **189** (2009) 88-92.
12. I. González-Mariño, J. B. Quintana, I. Rodríguez i R. Cela, *J. Chromatgr. A* **1217** (2010) 1748-1760.
13. A. J. Gushgari, A. K. Venkatesan, J. Chen, J. C. Steele i R. U. Halden, *Water Res.* **161** (2019) 171-180.
14. V. Brieudes, S. Lardy-Fontan, B. Lalere, S. Vaslin-Reimann i H. Budzinski, *Talanta* **146** (2016) 138-147.
15. J. A. Baz-Lomba, M. J. Reid i K. V. Thomas, *Anal. Chim. Acta* **914** (2016) 81-90.
16. K. M. Dimpe i P. N. Nomngongo, *Trends Anal. Chem.* **82** (2016) 199-207.
17. D. R. Baker i B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 1620-1631.
18. S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli i R. Bagnati, *Anal. Chem.* **78** (2006) 8421-8429.
19. A. Rodayan, M. Majewski i V. Yargeau, *Sci. Total Environ.* **487** (2014) 731-739.

20. C. Postigo, M. J. López de Alda i D. Barceló, *Environ. Int.* **36** (2010) 75-84.
21. V. Yorgeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan i C. D. Metcalfe, *Sci. Total Environ.* **487** (2014) 722-730.
22. L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández i P. De Voogt, *Chemosphere* **89** (2012) 1399-1406.
23. B. Stamper, W. Gul, M. Godfrey, S. W. Gul i M. A. ElSohly, *J. Anal. Toxicol.* **40 (8)** (2016) 694-699.
24. C. Postigo, C. Sirtori, I. Oller, S. Malato, M. I. Maldonado, M. J. López de Alda i D. Barceló, *Water Res.* **45** (2011) 4815-4826.
25. L. Bijlsma, C. Boix, W. M. A. Niessen, M. Ibáñez, J. V. Sansco i F. Hernández, *Sci. Total Environ.* **443** (2013) 200-208.
26. H. Cheng, D. Song, Y. Chang, H. Liu i J. Qu, *Chemosphere* **141** (2015) 282-289.
27. M.-C. Hsieh, S. C. Panchangam, W. W.-P. Lai i A. Y.-C. Lin, *Chemosphere* **209** (2018) 104-112.
28. A. Wick, M. Wagner i T. A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* **45 (8)** (2011) 3374-3385.
29. P. Falås, A. Wick, S. Castronovo, J. Habermacher, T. A. Ternes i A. Joss, *Water Res.* **95** (2016) 240-249.
30. J. Gao, A. Banks, J. Li, G. Jiang, F. Y. Lai, J. F. Mueller i P. K. Thai, *Sci. Total Environ.* **609** (2017) 1172-1181.
31. M. Bergheim, R. Gieré i K. Kümmerer, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **19** (2012) 72-85.
32. E. Sverrisdóttir, T. M. Lund, A. E. Olesen, A. M. Drewes, L. L. Christrup i M. Kreilgaard, *Eur. J. Pharm. Sci.* **74** (2015) 45-62.
33. H. Pathan i J. Williams, *B. J. Pain* **6 (1)** (2012) 11-16.
34. https://www.cdc.gov/drugoverdose/data/index.html (pristup 21. 01. 2021.)
35. C. Bosetti, C. Santucci, S. Radrezza, J. Erthal, S. Berterame i O. Corli, *Eur. J. Pain* **23** (2018) 697-707.
36. https://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Promet/Potrosnja-lijekova/Izvjesca-o-prometu-lijekova/ (pristup: 04. 02. 2021.)
37. R. C. Baselt, Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 8th ed., Biomedical Publications, Foster City, California, SAD, 2008., str. 730.
38. J. Lötsch, *J. Pain Symptom Manage.* **29** (2005) 10-29.
39. T. Nefau, S. Karolak, L. Castillo, V. Boireau i Y. Levi, *Sci. Total Environ.* **461-462** (2013) 712-722.

40. J. D. Berset, R. Brenneisen i C. Mathieu, *Chemosphere* **81** (2010) 859-866.
41. M. R. Boleda, M. T. Galceran i F. Ventura, *J. Chromatogr. A* **1175** (2007) 38-48.
42. M. J. Martínez Bueno, S. Uclés, M. D. Hernando i A. R. Fernández-Alba, *Talanta* **85** (2011) 157-166.
43. D. R. Baker i B. Kasprzyk-Hordern, *Sci. Total Environ.* **454-455** (2013) 442-465.
44. D. R. Baker, V. Očenášková, M. Kvicalova i B. Kasprzyk-Hordern, *Environ. Int.* **48** (2012) 28-38.
45. A. C. Chiaia, C. Banta-Green i J. Field, *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 8841-8848.
46. T. Mackul′ak, L. Birošová, M. Gál, I. Bodík, R. Grabic, J. Ryba i J. Škubák, *Environ. Monit. Assess.* **188 (18)** (2016) 1-12.
47. D. Hummel, D. Löffler, G. Fink i T. A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 7321-7328.
48. A. Y. C. Lin, X. H. Wang i C. F. Lin, *Chemosphere* **81** (2010) 562-570.
49. L. Bijlsma, A. M. Botero-Coy, R. J. Rincón, G. A. Peñuela i F. Hernández, *Sci. Total Environ.* **565** (2016) 984-993.
50. E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi i R. Fanelli, *Water Res.* **42** (2008) 961-968.
51. M. R. Boleda, M. T. Galceran i F. Ventura, *Water Res.* **43** (2009) 1126-1136
52. N. Mastroianni, M. J. Bleda, M. López de Alda i D. Barceló, *J. Hazard. Mater.* **316** (2016) 134-142.
53. A. Jurado, N. Mastroianni, E. Vàzquez-Suñé, J. Carrera, I. Tubau, E. Pujades, C. Postigo, M. López de Alda i D. Barceló, *Sci. Total Environ.* **424** (2012) 280-288.
54. A. Mendoza, M. López de Alda, S. González-Alonso, N. Mastroianni, D. Barceló i Y. Valcárcel, *Chemosphere* **95** (2014) 247-255.
55. M. Van der Aa, L. Bijlsma, E. Emke, E. Dijkman, A. L. N. Van Nuijs, B. Van de Ven, F. Hernández, A. Versteegh i P. De Voogt, *Water Res.* **47** (2013) 1848-1857.
56. D.-G. Wang, Q.-D. Zheng, X.-P. Wang, J. Du, C.-G. Tian, Z. Wang i L.-K. Ge, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (2016) 16495-16503.
57. J. Radjenović, M. Petrović i D. Barceló, *Water Res.* **43** (2009) 831-841.
58. I. González-Mariño, J. B. Quintana, I. Rodríguez, M. Cores i R. Cela, *Water Res.* **68** (2015) 759-770.

59. A. L. N. Van Nuijs, K. Abdellat, L. Bervoets, R. Blust, P. G. Jorens, H. Neels i A. Covaci, *J. Hazard. Mater.* **239-240** (2012) 19-23.
60. I. Senta, I. Krizman, M. Ahel i S. Terzić, *Sci. Total Environ.* **487** (2014) 659-665.
61. P. Ramin, A. L. Brock, F. Polesel, A. Causanilles, E. Emke, P. De Voogt i B. G. Peósz, *Environ. Sci. Tehnol.* **50 (24)** (2016) 13397-13408.
62. P. C. Rúa-Gómez i W. Püttmann, *Chemosphere* **90** (2013) 1952-1959.
63. Y. Meng, W. Liu, X. Liu, J. Zhang, M. Peng i T. Zhang, *J. Environ. Sci.* **101** (2021) 260-281.
64. C. Castillo-Zacarías, M. E. Barocio, E. Hidalgo-Vázquez, J. E. Sosa-Hernández, L. Parra-Arroyo, I. Y. López-Pacheco, D. Barceló, H. N. M. Iqbal i R. Parra-Saldívar, *Sci. Total Environ.* **757** (2021) u tisku, članak br. 143722
65. O. Muter i V. Bartkevics, *Current Opin. Environ. Sci. Heal.* **18** (2020) 1-6.
66. D. A. Alvarez, M. R. Rosen, S. D. Perkins, W. L. Cranor, V. L. Schroeder i T. L. Jones-Lepp, *Chemosphere* **88** (2012) 605-611.
67. D. R. Baker i B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 8036-8059.
68. C. Postigo, M. J. Lopez De Alda i D. Barceló, *Anal. Chem.* **80** (2008) 3123-3134.
69. N. Fontanals, F. Borrull i R, M. Marcé, *J. Chromatogr. A* **1286** (2013) 16-21.
70. N. V. Heuett, C. E. Ramirez, A. Fernandez i P. R. Gardinali, *Sci. Total Environ.* **511** (2015) 319-330.
71. D. R. Baker i B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 7901-7913.
72. I. Brčić Karačonji i N. Brajenović, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **65 (2)** (2014) 225-230.
73. Lj. Skender, V. Karačić, I. Brčić i A. Bagarić, *Forensic Sci. Int.* **125** (2002) 120-126.
74. M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu i S. A. Ozkan, *Chromatographia* **76** (2013) 1365-1427.
75. W. L. Shelver, H. Hakk, G. L. Larsen, T. M. DeSutter i F. X. M. Casey, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 1273-1282.
76. K. Yu, B. Li i T. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **738** (2012) 59-68.
77. T. Anumol, S. Merel, B. O. Clarke i S. A. Snyder, *Chem. Cent. J.* **104** (2013) 1-14.
78. K. Sharma i R. Mullangi, *Biomed. Chromatogr.* **27 (10)** (2013) 1243-1258.
79. W. Gul, B. Stamper, M. Godfrey, S. W. Gul i M. A. ElSohly, *J. Anal. Toxicol.* **40** (2016) 330-337.

80. W. Brack, J. Hollender, M. L. de Alda, C. Müller, T. Schulze, E. Schymanski, J. Slobodnik i M. Krauss, *Environ. Sci. Eur.* **31 (62)** (2019) 1-6.
81. K. J. Bisceglia, A. L. Roberts, M. M. Schantz i K. A. Lippa, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 2701-2712.
82. L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández i P. De Voogt, *Anal. Chim. Acta* **768** (2013) 102-110.
83. M. Huerta-Fontela, M. T. Galceran i F. Ventura, *Anal. Chem.* **79** (2007) 3821-3829.
84. M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull i R. M. Marcé, *J. Sep. Sci.* **34** (2011) 1091-1101.
85. V. L. Borova, N. C. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos i N. S. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 4273-4285.
86. E. Vuori, M. Happonen, M. Gergov, T. Nenonen, A. Järvinen, R. A. Ketola i R. Vahala, *Sci. Total Environ.* **487** (2014) 688-695.
87. L. Bijlsma, E. Beltrán, C. Boix, J. V. Sancho i F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 4261-4272.
88. M. Česen, M. Ahel, S. Terzić, D. Heath i E. Heath, *Sci. Total Environ.* **650** (2019) 2446-2453.
89. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers i F. Smith, *Anal. Chem.* **28** (1956) 350-356.
90. I. Senta, I. Krizman, M. Ahel i S. Terzić, *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 3255-3268.
91. I. Senta, S. Terzić i M. Ahel, *Environ. Pollut.* **273** (2021) u tisku, članak br. 116433
92. P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu i Y. Picó, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2471-2483.
93. K. D. Thakker, T. Higuchi i L. A. Sternson, *J. Pharm. Sci.* **68** (1979) 93-95.
94. J. Jednačak-Bišćan, V. Pravdić i W. Haller, *J. Colloid Interface Sci.* **121** (1988) 345-354.
95. N. W. Cant i L. H. Little, *Can. J. Chem.* **46** (1968) 1373-1379.
96. B. Petrie, J. Youdan, R. Barden i B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* **1431** (2016) 64-78.
97. I. Krizman-Matasić, I. Senta, P. Kostanjevečki, M. Ahel i S. Terzić, *Sci. Total Environ.* **647** (2019) 474-485.
98. C. Lindim, D. de Zwart, I. T. Cousins, S. Kutsarova, R. Kühne i G. Schüürmann, *Chemosphere* **220** (2019) 344-352.

99. M. Buřič, K. Grabicová, J. Kubec, A. Kouba, I. Kuklina, P. Kozák, R. Grabic i T. Randák, *Aquat. Toxicol.* **200** (2018) 226-232.
100. E. L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. P. Singer i J. Hollender, *Environ. Sci. Tehnol.* **48** (2014) 2097-2098.
101. J. Jeon, D. Kurth i J. Hollender, *Chemical Research in Toxicology* **26** (2013) 313-324.
102. M. Llorca, F. Castellet-Rovira, M.-J. Farré, A. Jaén-Gil, M. Martínez-Alonso, S. Rodríguez-Mozaz, M. Sarrà i D. Barceló, *Environ. Pollut.* **246** (2019) 346-356.
103. M. Antonopoulou i I. Konstantinou, *Appl. Catal. A. Gen.* **515** (2016) 136-142.
104. R. Gulde, U. Meier, E. L. Schymanski, H.-P. E. Kohler, D. E. Helbling, S. Derrer, D. Rentsch i K. Fenner, *Environ. Sci. Tehnol.* **50 (6)** (2016) 2908-2920.
105. A. Kruve, K. Kaupmees, J. Liigand, M. Oss i I. Leito, *J. Mass Spectrom.* **48** (2013) 695-702.
106. F. Lange, S. Cornelissen, D. Kubac, M. M. Sein, J. Von Sonntag, C. B. Hannich, A. Golloch, H. J. Heipieper, M. Möder i C. Von Sonntag, *Chemosphere* **65** (2006) 17-23.
107. M. Rusch, A. Kauschat, A. Spielmeyer, A. Römpp, H. Hausmann, H. Zorn i G. Hamscher, *J. Agric. Food Chem.* **63 (31)** (2015) 6897-6904.
108. S. Terzić, N. Udiković-Kolić, T. Jurina, I. Krizman-Matasić, I. Senta, I. Mihaljević, j. Lončar, T. Smital i M. Ahel, *J. Hazard. Mater.* **349** (2018) 143-152.
109. M. Bergheim, R. Gminski, B. Spangenberg, M. Dębiak, A. Bürkle, V. Mersch-Sundermann, K. Kümmerer i R. Gieré, *Environ. Chem.* **11** (2014) 431-444.
110. M. Bourgin, B. Beck, M. Boehler, E. Borowska, J. Fleiner, E. Salhi, R. Teichler, U. von Gunten, H. Siegrist i C. S. McArdell, *Water Res.* **129** (2018) 486-498.
111. G. A. Zoumpouli, F. S. Souza, B. Petrie, L. A. Féris, B. Kasprzyk-Hordern i J. Wenk, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **6** (2020) 2465-2478.

§ 8. DODATAK

Popis dodataka:

Tablica I. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2017. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... VII

Tablica II. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2017. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba VIII

Tablica III. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2018. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... IX

Tablica IV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2018. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... X

Tablica V. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2019. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... XI

Tablica VI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2019. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... XII

Tablica VII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2020. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... XIII

Tablica VIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2020. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... XIV

Tablica IX. Masene koncentracije opioida i maseni protoci nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda izmjerene od 21. 03. do 27. 03. 2017. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba.....XV

Tablica X. Masene koncentracije opioida i maseni protoci nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda izmjerene od 13. 03. do 19. 03. 2018. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba..... XVI

Tablica XI. Masene koncentracije mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda izmjerene 2019. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba.....XVII

Tablica XII. Maseni udjeli mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda izmjereni 2019. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba.....XVIII

Tablica XIII. Masene koncentracije mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji aktivnog mulja izmjerene na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba XIX

Tablica XIV. Maseni udjeli mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji aktivnog mulja izmjereni na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba XIX

Tablica XV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postajama Šentjakob (S1), Jevnica (S2) i Brežice (S3) u svibnju i srpnju 2017.godine.....XX

Tablica XVI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Otok Samoborski od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine..... XXI

Tablica XVII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u pritoku rijeke Save na postaji Gradna od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine.....XXII

Tablica XVIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u pritoku rijeke Save na postaji Krapina od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine XXIII

Tablica XIX. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Jankomir od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine XXIV

Tablica XX. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Petruševec od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine XXV

Tablica XXI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Oborovo od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine XXVI

Tablica XXII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Sisak od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine..... XXVII

Tablica XXIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenim otpadnim vodama u UPOV Ljubljana, Domžale-Kamnik i Novo Mesto u svibnju i srpnju 2017. godine..... XXVIII

Tablica XXIV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenim otpadnim vodama u UPOV Zaprešić od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine .XXIX

Tablica XXV. Masene koncentracije opioidnih analgetika u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine XXX

Tablica XXVI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenim otpadnim vodama u UPOV Velika Gorica od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine.....XXXI

Tablica I. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2017. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2017. godina																							
	15 .01. 2017.	17. 01. 2017.	05. 02. 2017.	07. 02. 2017.	12. 03. 2017.	14. 03. 2017.	09. 04. 2017.	11. 04. 2017.	28. 05. 2017.	30. 05. 2017.	25. 06. 2017.	27. 06. 2017.	02. 07. 2017.	04. 07. 2017.	27. 08. 2017.	29. 08. 2017.	24. 09. 2017.	26. 09. 2017.	15. 10. 2017.	17. 10. 2017.	26. 11. 2017.	28. 11. 2017.	10. 12. 2017.	12. 12. 2017.
Q **/m^3 dan^{-1}**	**306618**	**275270**	**364598**	**484362**	**284323**	**289428**	**266747**	**279441**	**246064**	**257166**	**326643**	**249069**	**245564**	**242609**	**216545**	**320202**	**306437**	**298111**	**258759**	**262648**	**638451**	**334950**	**406582**	**549807**
M3G	24,2	12,2	10,7	8,9	12,9	14,0	15,2	9,2	9,1	9,3	10,2	18,4	6,3	2,6	< GK	7,5	< GK	3,6	< GK	< GK	7,9	13,0	4,9	2,6
norMOR	3,5	4,1	4,1	8,3	22,6	18,9	18,1	19,0	35,5	29,2	18,5	26,6	16,6	21,3	11,6	11,5	2,3	9,3	17,1	16,9	3,9	7,5	2,1	4,6
M6G	3,7	< GK	2,1	< GK	7,2	7,1	4,3	2,3	< GK	< GK	< GK	2,8	3,4	3,3	< GK	2,5	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	51,9	58,5	50,1	72,3	96,6	90,6	101,1	99,6	106,0	117,3	72,9	88,0	85,9	98,3	89,2	78,0	86,7	76,7	100,1	92,2	37,1	85,5	24,2	41,1
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	12,4	10,5	13,9	11,2	20,4	24,5	17,2	13,9	20,3	22,3	11,5	17,3	22,4	28,0	17,3	12,5	15,8	5,2	13,5	23,7	6,8	12,0	2,2	5,7
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	429,7	430,7	467,7	698,3	806,5	801,5	687,4	654,2	870,6	892,8	522,8	622,1	659,4	827,3	798,6	699,5	592,2	357,1	792,6	869,2	300,4	486,9	124,4	235,2
COD	177,0	185,3	155,3	157,3	183,5	178,5	219,5	183,5	175,7	181,6	92,1	194,8	180,5	183,3	189,0	149,3	165,0	155,4	166,8	186,0	79,8	146,6	26,2	66,1
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	4,2	5,3	8,2	6,4	6,0	4,0	5,1	5,6	6,1	3,8	3,8	5,6	4,9	7,1	6,3	4,2	7,6	6,2	7,6	5,7	3,3	8,0	3,6	3,2
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	497,0	469,1	516,5	702,3	897,0	848,0	742,0	640,1	1114,0	966,6	858,3	998,0	673,8	947,0	822,4	707,1	667,7	415,8	872,0	914,0	344,4	614,5	325,2	792,1
N-DM-TRAM	156,3	135,8	148,7	214,3	334,3	330,8	199,1	177,5	268,8	249,1	168,9	198,1	229,8	252,7	219,0	202,0	171,8	104,5	227,8	215,1	96,2	176,1	57,3	72,1
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	8,6	7,3	9,4	3,9	8,5	8,8	5,9	5,0	9,1	8,0	5,2	5,5	4,9	5,5	3,9	4,0	4,8	2,9	3,2	< GK	4,9	2,7	2,1	4,6
EDDP	80,7	69,9	70,7	114,3	136,4	122,8	154,4	152,6	142,2	139,8	128,6	133,5	135,5	140,7	116,3	124,3	132,2	123,6	149,2	150,1	88,1	132,1	122,3	67,2
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	37,5	38,1	37,0	56,9	70,4	66,2	72,3	68,4	62,6	69,9	71,4	61,9	63,4	74,6	64,9	69,5	74,1	73,7	82,4	88,0	47,4	79,4	68,9	30,0

Tablica II. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2017. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2017. godina																								
	15. 01. 2017.	17. 01. 2017.	05. 02. 2017.	07. 02. 2017.	12. 03. 2017.	14. 03. 2017.	09. 04. 2017.	11. 04. 2017.	28. 05. 2017.	30. 05. 2017.	25. 06. 2017.	27. 06. 2017.	02. 07. 2017.	04. 07. 2017.	27. 08. 2017.	29. 08. 2017.	24. 09. 2017.	26. 09. 2017.	15. 10. 2017.	17. 10. 2017.	26. 11. 2017.	28. 11. 2017.	10. 12. 2017.	12. 12. 2017.
Q **/m^3 dan^{-1}**	**304233**	**268498**	**357105**	**475635**	**277202**	**279838**	**259613**	**270712**	**237792**	**249730**	**316007**	**241779**	**237117**	**234728**	**213244**	**318441**	**298095**	**289452**	**252749**	**256356**	**623097**	**327121**	**396295**	**535422**
M3G	< GK	< GK	1,0	< GK	< GK	1,0	< GK	1,2	< GK	< GK	< GK	< GK	0,8	< GK	< GK	< GK	< GK	2,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	4,3	3,8	2,2	3,6	9,0	8,0	10,6	8,9	4,4	6,3	5,3	3,0	2,6	5,8	2,8	2,8	1,6	3,4	2,4	2,9	1,6	1,9	1,0	1,4
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	1,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	29,3	24,3	30,6	41,0	32,3	45,9	46,0	52,4	41,3	28,2	17,8	17,2	13,3	23,0	17,2	9,6	11,3	13,2	15,9	12,8	17,5	18,7	12,0	23,3
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	11,2	8,1	14,2	6,5	23,4	21,5	20,4	18,0	22,4	20,6	12,8	13,8	14,0	28,9	15,2	6,5	9,8	6,3	13,4	8,2	10,3	10,3	1,7	5,6
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	372,3	335,2	411,7	675,3	806,7	801,1	609,7	598,1	852,3	845,3	595,4	607,5	625,4	808,1	798,1	673,2	541,0	342,6	732,5	764,0	303,3	469,1	111,0	234,4
COD	75,3	70,6	81,0	97,3	99,5	94,4	99,3	114,3	104,2	184,4	57,1	105,0	75,4	165,6	118,3	63,8	91,3	93,6	119,3	88,3	74,8	107,8	25,1	80,5
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	1,7	1,6	< GK	< GK	1,2	< GK	< GK	< GK	1,5	< GK	< GK	1,6	< GK	1,3	< GK	1,1	< GK	< GK	< GK	2,2
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	389,6	342,3	419,6	686,3	807,7	802,8	687,4	646,8	1138,8	1005,6	704,9	951,9	778,2	879,1	718,5	674,0	587,5	375,3	872,0	707,6	316,6	603,7	306,5	698,4
N-DM-TRAM	198,3	242,0	222,6	138,3	332,4	475,4	251,4	226,6	398,4	327,5	233,3	233,4	195,0	254,9	238,9	134,3	171,2	185,3	334,9	229,6	99,5	188,6	52,7	92,6
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	2,3	5,9	1,2	6,7	6,4	3,9	3,1	5,0	4,4	4,0	2,5	2,9	2,5	3,7	3,8	5,2	< GK	4,3	1,9	3,6	3,8	1,1	2,1
EDDP	102,3	81,1	94,4	100,1	89,6	86,2	79,5	109,7	107,3	92,4	96,2	104,3	106,4	116,4	111,6	98,0	128,8	131,8	130,1	118,3	79,7	97,0	118,6	83,9
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	49,8	38,3	38,2	56,3	41,1	43,2	37,1	58,5	60,6	45,5	45,1	52,9	55,1	58,1	63,2	44,9	58,2	69,1	60,3	50,0	41,6	44,1	32,6	42,3

Tablica III. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2018. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2018. godina																								
	14. 01. 2018.	16. 01. 2018.	18. 02. 2018.	20. 02. 2018.	11. 03. 2018.	13. 03. 2018.	22. 04. 2018.	24. 04. 2018.	20. 05. 2018.	22. 05. 2018.	10. 06. 2018.	12. 06. 2018.	08. 07. 2018.	10. 07. 2018.	26. 08. 2018.	28. 08. 2018.	23. 09. 2018.	25 .09. 2018.	28. 10. 2018.	30. 10. 2018.	25. 11. 2018.	27. 11. 2018.	16. 12. 2018.	18. 12. 2018.
***Q* /m^3 dan^{-1}**	**400138**	**393813**	**612570**	**439436**	**536889**	**567265**	**369747**	**359593**	**306632**	**302497**	**269596**	**332237**	**266024**	**260057**	**620111**	**246561**	**230270**	**253697**	**347915**	**292059**	**615626**	**317702**	**294719**	**294325**
M3G	8,6	8,7	14,2	15,8	5,9	8,9	7,6	4,5	8,4	5,0	8,7	5,1	8,2	6,3	16,8	10,3	7,0	17,8	7,8	15,6	9,6	10,9	8,3	12,5
norMOR	9,4	14,9	4,7	10,1	7,5	8,6	8,8	10,7	7,3	10,5	14,6	7,2	14,2	16,6	5,1	18,8	18,3	10,8	8,7	10,4	6,2	10,8	15,8	16,8
M6G	3,3	< GK	< GK	< GK	2,6	2,5	4,3	2,1	3,1	< GK	3,7	2,2	4,2	4,3	2,4	4,2	< GK	4,0	2,3	4,1	< GK	3,0	3,8	3,2
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	96,5	80,3	44,9	77,7	66,9	69,0	129,8	137,7	117,0	147,3	141,8	101,8	135,7	131,3	58,4	127,4	144,9	136,9	99,3	139,8	39,6	104,4	152,2	155,2
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	17,4	10,9	9,2	9,4	9,3	8,2	11,3	20,3	15,8	11,5	15,1	9,6	16,4	15,2	6,2	18,3	16,8	12,0	8,9	14,8	6,2	13,0	18,2	17,2
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	498,7	525,9	338,3	429,5	313,4	366,5	532,9	620,6	671,4	601,6	601,9	458,6	613,5	648,8	258,2	669,5	911,0	566,4	566,1	640,4	207,1	533,2	774,1	760,5
COD	135,6	106,5	55,6	94,8	102,6	117,0	150,8	161,7	158,7	165,4	190,3	117,6	208,0	182,8	73,7	183,7	213,6	163,7	128,9	171,4	53,0	132,8	196,6	191,8
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	5,0	4,8	4,1	6,8	4,5	5,0	6,2	5,7	4,4	7,2	6,6	6,9	6,0	6,4	3,4	7,1	4,3	6,9	8,2	21,1	2,7	5,5	9,3	10,5
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	647,9	676,2	467,5	650,8	725,8	1030,0	692,3	756,6	793,1	620,4	761,6	582,0	1391,9	1805,0	375,9	873,2	1911,2	979,2	559,3	878,7	282,0	700,3	969,0	938,6
N-DM-TRAM	173,8	176,2	123,6	163,1	104,3	118,8	160,1	194,0	199,9	163,6	203,6	145,4	217,2	192,6	96,0	229,6	238,1	183,8	139,3	191,8	67,3	184,4	252,0	264,1
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	9,2	6,2	4,9	< GK	5,6	5,1	6,6	22,4	5,1	7,5	4,9	5,9	8,1	3,9	< GK	10,9	14,8	5,9	< GK	4,3	< GK	4,5	9,1	9,6
EDDP	124,2	105,1	70,4	109,9	112,3	128,7	141,2	147,4	143,3	154,0	155,5	140,1	159,2	167,1	85,9	154,3	186,3	154,8	133,6	142,0	72,4	127,3	167,8	164,3
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	65,8	64,6	32,1	53,3	54,7	65,0	68,2	71,1	69,5	77,7	74,2	61,9	87,0	88,0	41,6	83,0	79,2	84,2	58,4	79,6	33,4	68,7	77,6	78,1

Tablica IV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2018. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2018. godina																								
	14. 01. 2018.	16. 01. 2018.	18. 02. 2018.	20. 02. 2018.	11. 03. 2018.	13. 03. 2018.	22. 04. 2018.	24. 04. 2018.	20. 05. 2018.	22. 05. 2018.	10. 06. 2018.	12. 06. 2018.	08. 07. 2018.	10. 07. 2018.	26. 08. 2018.	28. 08. 2018.	23. 09. 2018.	25. 09. 2018.	28. 10. 2018.	30. 10. 2018.	25. 11. 2018.	27. 11. 2018.	16. 12. 2018.	18. 12. 2018.
Q **/m^3 dan^{-1}**	**387299**	**380639**	**596359**	**430212**	**524708**	**555871**	**363764**	**351707**	**298241**	**295487**	**258827**	**319119**	**256639**	**253738**	**612254**	**241659**	**223412**	**246790**	**337077**	**287239**	**599314**	**311695**	**285090**	**284661**
M3G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	1,3	6,0	3,3	2,1	< GK	2,3	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	13,1	8,7	3,2	5,1	3,3	4,5	2,3	6,9	4,7	3,0	8,7	8,7	4,9	2,6	2,4	3,2	< GK	< GK	< GK	< GK	2,8	3,4	7,3	7,4
M6G	1,9	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	4,8	2,3	1,5	1,6	1,5	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	28,1	30,3	26,2	31,2	38,6	42,9	37,5	51,3	28,6	29,2	22,9	18,8	10,1	11,8	6,4	11,1	17,7	13,8	24,5	21,7	30,5	26,5	59,8	60,3
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	27,5	20,9	6,2	9,1	5,1	12,5	14,6	14,0	12,9	6,8	16,7	10,8	10,6	8,2	4,1	7,3	12,4	11,4	12,3	9,4	10,0	10,6	12,3	17,7
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	671,7	663,4	336,3	424,0	324,8	418,2	615,2	657,2	732,2	604,6	710,8	570,6	612,0	685,9	268,1	697,3	802,6	670,3	846,4	546,9	462,9	548,5	853,0	792,0
COD	109,6	105,3	81,6	97,0	101,2	98,6	97,5	129,0	74,0	75,4	76,8	65,2	41,5	55,7	29,5	45,6	103,7	79,6	130,3	88,8	94,7	93,9	174,2	175,4
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	1,5	1,0	< GK	< GK	< GK	1,5	1,4	1,6	1,0	< GK	3,1	1,7	< GK	< GK	1,5	1,4	< GK	< GK	< GK	1,5	< GK	< GK	1,4	2,0
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	675,7	651,8	283,9	395,4	374,7	800,1	622,0	649,7	682,8	533,0	651,4	573,6	1242,5	1507,5	306,7	752,9	2337,5	2271,2	836,7	541,9	459,0	501,7	898,5	852,0
N-DM-TRAM	192,9	185,3	108,8	143,2	97,3	155,5	189,4	215,6	256,9	211,2	206,1	193,0	221,7	249,6	76,7	211,0	304,3	210,5	242,0	143,0	125,6	134,1	286,6	256,7
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	3,3	3,8	2,8	3,7	3,6	5,6	3,6	4,1	3,1	4,6	3,0	2,4	< GK	3,6	< GK	3,5	< GK	< GK	4,2	2,4	4,6	< GK	3,1	5,1
EDDP	110,5	92,0	82,9	111,3	92,3	102,6	129,0	137,1	147,4	141,4	158,4	152,0	129,3	165,3	81,4	128,4	165,3	119,4	184,6	106,0	100,8	100,9	157,4	145,5
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	53,7	44,5	33,4	44,0	45,2	49,3	49,2	56,0	51,3	45,6	51,1	50,9	59,2	61,0	41,0	51,4	68,0	54,1	74,6	45,5	44,2	42,6	70,6	62,3

Tablica V. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2019. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2019. godina																								
	13. 01. 2019.	15. 01. 2019.	03. 02. 2019.	05. 02. 2019.	24. 03. 2019.	26. 03. 2019.	14. 04. 2019.	16. 04. 2019.	05. 05. 2019.	07. 05. 2019.	02. 06. 2019.	04. 06. 2019.	30. 06. 2019.	02. 07. 2019.	25. 08. 2019.	27. 08. 2019.	08. 09. 2019.	10. 09. 2019.	27. 10. 2019.	29. 10. 2019.	24. 11. 2019.	26. 11. 2019.	08. 12. 2019.	10. 12. 2019.
Q **/m^3 dan^{-1}**	**284013**	**280728**	**387085**	**332821**	**263594**	**407262**	**357845**	**317337**	**559723**	**282239**	**471840**	**328060**	**253276**	**277997**	**224558**	**243665**	**428998**	**267896**	**260237**	**401095**	**423228**	**388287**	**363330**	**553307**
M3G	10,7	12,8	7,5	21,6	4,9	51,7	21,9	28,1	23,1	15,7	25,1	4,4	5,9	3,0	2,3	5,7	7,2	11,8	5,3	8,6	9,4	11,1	8,2	40,1
norMOR	13,0	18,3	10,5	13,5	19,8	17,2	13,9	11,6	7,1	17,7	12,4	15,8	17,5	20,1	16,7	15,1	10,6	9,2	27,6	17,4	12,4	19,0	16,7	14,0
M6G	2,3	3,8	< GK	3,4	3,6	5,5	5,8	7,3	3,3	4,1	5,6	2,1	3,7	2,9	< GK	3,5	< GK	7,4	2,3	< GK	2,2	< GK	< GK	4,9
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	129,8	144,4	82,0	97,9	170,9	118,8	145,5	161,9	76,9	169,3	124,1	145,2	177,1	151,2	95,8	104,3	95,7	119,0	163,3	119,1	110,7	132,8	140,7	177,6
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	13,3	20,6	8,5	9,7	19,3	15,6	17,4	9,9	9,3	19,4	9,7	15,9	17,4	13,2	11,3	10,5	7,7	15,6	16,0	11,8	11,3	15,9	9,6	8,0
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	776,5	867,9	485,8	544,5	773,6	669,4	619,3	470,7	355,4	678,1	504,0	646,1	777,8	667,9	912,6	983,8	534,1	764,3	907,2	651,6	639,9	774,0	749,5	467,0
COD	204,3	204,2	141,4	134,0	276,9	170,4	194,2	165,5	116,8	240,4	168,7	198,4	264,7	225,4	223,0	118,3	109,9	178,5	225,5	193,6	144,1	187,3	202,2	119,3
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	10,5	8,9	5,1	8,0	5,3	5,7	6,1	4,9	5,7	7,5	8,3	4,4	5,3	4,9	2,5	5,6	2,8	7,5	9,5	6,8	8,2	8,8	12,6	7,2
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	850,6	874,0	556,0	753,2	1045,2	865,7	690,9	655,9	505,4	2059,9	667,1	854,3	913,9	793,8	1908,9	858,2	487,2	714,4	851,4	651,7	572,0	680,1	918,2	805,1
N-DM-TRAM	254,3	271,5	171,9	221,1	285,1	223,1	188,1	147,0	149,1	235,3	166,2	200,7	241,4	196,1	373,8	267,5	148,9	165,1	237,4	168,3	185,5	223,8	218,0	145,2
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	18,0	17,1	11,5	3,6	3,6	7,0	< GK	4,7	4,9	5,3	3,7	5,0	3,8	6,0	< GK	4,6	< GK	< GK	5,2	7,2	3,9	6,0	4,2	4,1
EDDP	158,8	154,2	111,2	115,2	184,5	133,0	137,5	127,4	118,2	156,7	112,3	130,8	188,3	167,3	173,1	151,3	106,0	123,6	165,7	153,5	110,5	122,5	130,5	99,1
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	75,4	82,6	53,9	61,2	95,4	72,3	69,3	74,1	57,5	85,6	53,9	68,2	98,6	86,5	82,9	61,8	49,6	67,9	77,9	76,6	54,0	66,2	68,8	54,2

Tablica VI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2019. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2019. godina																								
	13. 01. 2019.	15. 01. 2019.	03. 02. 2019.	05. 02. 2019.	24. 03. 2019.	26. 03. 2019.	14. 04. 2019.	16. 04. 2019.	05. 05. 2019.	07. 05. 2019.	02. 06. 2019.	04. 06. 2019.	30. 06. 2019.	02. 07. 2019.	25 .08. 2019.	27. 08. 2019.	08. 09. 2019.	10. 09. 2019.	27. 10. 2019.	29. 10. 2019.	24. 11. 2019.	26. 11. 2019.	08. 12. 2019.	10. 12. 2019.
***Q* /m^3 dan^{-1}**	**274911**	**270103**	**377586**	**326988**	**256431**	**400801**	**345644**	**310148**	**544604**	**274388**	**459698**	**317976**	**246945**	**269140**	**222594**	**239906**	**421261**	**260797**	**253795**	**388709**	**409451**	**379697**	**351081**	**542019**
M3G	1,3	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	1,8	2,0	1,3	1,8	1,4	1,2
norMOR	11,0	12,5	11,8	5,0	7,7	5,2	3,1	3,9	4,6	4,8	3,2	3,9	2,1	4,3	1,6	3,1	2,8	4,2	3,5	6,3	3,6	3,7	4,1	5,0
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	91,2	79,1	64,1	64,4	66,5	46,0	28,8	44,3	42,6	32,4	26,6	28,1	16,8	22,9	13,2	17,3	17,2	12,0	34,4	77,5	54,9	53,0	85,7	65,7
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	16,9	20,8	17,0	15,0	21,3	14,3	12,6	14,8	9,3	16,5	8,6	12,2	9,2	12,5	9,1	9,8	7,6	10,2	18,8	19,5	12,3	9,8	13,9	7,8
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	851,7	877,1	787,2	700,3	1047,9	595,3	650,0	779,2	496,7	788,0	491,4	777,8	865,5	834,0	1304,5	1000,4	804,8	728,3	934,1	762,4	610,3	644,6	731,8	468,7
COD	200,5	200,7	147,4	168,9	189,1	117,8	125,2	146,0	129,3	129,5	106,9	134,0	91,7	100,0	79,9	72,7	76,3	66,4	154,9	166,6	114,1	112,1	162,4	96,9
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	1,2	1,5	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	1,5	2,4	1,1	< GK	< GK	< GK	1,9	< GK	1,6	2,4
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	860,9	859,7	717,4	634,0	1028,0	611,4	684,7	771,4	588,7	1547,3	573,5	791,8	883,7	835,1	858,8	836,6	646,5	689,3	878,8	758,1	574,6	585,4	1144,3	706,1
N-DM-TRAM	298,7	291,4	272,0	228,6	309,4	166,9	204,1	229,6	165,0	257,7	161,0	227,9	279,2	264,9	287,1	228,7	189,8	162,2	257,5	202,3	154,5	161,1	177,7	108,3
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	5,4	11,1	8,3	9,0	7,3	2,8	4,5	3,6	2,1	2,1	4,0	1,5	2,8	3,6	< GK	< GK	4,3	4,3	2,3	3,3	< GK	< GK	2,0	1,3
EDDP	156,6	146,9	118,5	110,0	170,0	102,3	125,2	144,4	117,4	134,3	112,2	130,6	186,7	171,9	156,9	159,4	100,5	99,7	162,6	155,8	104,3	114,9	126,3	88,1
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	77,1	68,4	55,9	53,4	84,9	50,8	58,5	65,1	56,5	56,9	48,6	54,3	76,4	69,0	75,2	73,2	48,6	43,7	74,7	68,1	44,9	48,8	55,9	37,7

Tablica VII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2020. godine u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2020. godina																						
	26. 01. 2020.	28. 01. 2020.	23. 02. 2020.	25. 02. 2020.	15. 03. 2020.	17. 03. 2020.	10. 05. 2020.	12. 05. 2020.	07. 06. 2020.	09. 06. 2020.	05. 07. 2020.	07. 07. 2020.	30. 08. 2020.	01. 09. 2020.	27. 09. 2020.	29. 09. 2020.	25. 10. 2020.	27. 10. 2020.	08. 11. 2020.	10. 11. 2020.	13. 12. 2020.	15. 12. 2020.
***Q* /m^3 dan^{-1}**	**305538**	**333015**	**283709**	**286837**	**291733**	**294224**	**257749**	**466261**	**272849**	**381362**	**246617**	**465361**	**228563**	**573744**	**246195**	**312881**	**624271**	**484387**	**282779**	**277426**	**364501**	**326089**
M3G	11,8	7,6	19,3	16,0	17,3	13,7	9,4	28,4	19,1	29,2	17,7	27,3	8,9	36,7	16,1	28,2	30,8	19,9	8,6	10,3	10,8	11,5
norMOR	22,0	20,2	20,0	20,2	21,9	18,1	14,1	9,8	20,4	20,8	23,9	10,2	10,2	8,9	20,5	17,6	7,5	9,7	17,4	16,5	12,8	12,8
M6G	< GK	< GK	< GK	2,0	2,2	2,7	3,5	3,3	3,9	3,3	3,4	2,3	< GK	3,8	2,9	4,7	3,7	2,9	2,1	2,5	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	143,2	117,9	114,8	107,0	109,9	107,6	64,3	60,8	70,8	60,1	68,4	60,9	66,6	39,5	60,3	97,5	59,4	74,9	138,9	135,4	101,2	113,0
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	14,9	17,0	20,8	13,5	12,6	10,0	9,9	9,6	12,6	10,6	10,7	7,5	11,4	7,1	10,6	10,4	6,5	6,5	11,5	11,2	4,9	9,7
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	775,8	736,5	737,6	818,1	658,8	710,1	796,0	463,7	883,2	678,8	889,9	544,9	955,3	451,5	725,9	963,3	346,4	460,7	739,2	761,5	547,9	590,2
COD	203,8	191,5	220,0	208,4	213,7	192,2	128,1	117,6	141,2	106,5	135,3	125,7	137,9	72,2	133,3	178,8	79,6	107,2	210,5	218,2	153,6	156,5
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	10,5	7,8	9,5	7,3	11,4	12,1	10,8	8,5	10,1	6,6	8,0	3,7	7,1	5,2	3,8	5,1	4,5	3,4	4,7	4,7	4,8	4,7
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	827,8	815,1	780,3	886,4	785,4	883,6	850,1	515,9	1079,8	983,6	938,0	662,1	994,6	517,8	792,0	1041,9	406,1	471,6	770,3	799,0	573,0	595,5
N-DM-TRAM	222,0	211,7	249,4	262,7	242,2	225,0	234,1	152,2	279,8	211,7	280,2	146,2	108,3	154,3	225,9	307,8	110,0	113,3	190,2	197,2	148,0	166,8
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	7,6	4,7	7,0	10,5	3,9	8,7	7,6	6,3	6,0	4,0	3,1	3,5	5,0	4,3	6,2	5,8	6,7	< GK	8,1	10,1	9,2	4,8
EDDP	123,8	99,9	136,9	156,0	164,5	102,6	81,2	74,1	102,7	82,3	84,3	76,8	110,2	67,0	74,1	83,1	92,3	91,9	138,3	136,2	111,7	142,6
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	63,5	47,4	57,6	73,3	72,5	50,2	38,4	36,8	50,5	43,7	39,8	32,5	54,8	29,6	33,1	42,7	50,4	48,4	68,9	66,5	51,1	73,3

Tablica VIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene 2020. godine u pročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}) – 2020. godina																						
	26. 01. 2020.	28. 01. 2020.	23. 02. 2020.	25. 02. 2020.	15. 03. 2020.	17. 03. 2020.	10. 05. 2020.	12. 05. 2020.	07. 06. 2020.	09. 06. 2020.	05. 07. 2020.	07. 07. 2020.	30. 08. 2020.	01. 09. 2020.	27. 09. 2020.	29. 09. 2020.	25. 10. 2020.	27. 10. 2020.	08. 11. 2020.	10. 11. 2020.	13. 12. 2020.	15. 12. 2020.
Q **/m^3 dan^{-1}**	**296897**	**323023**	**277520**	**278225**	**284537**	**285144**	**249749**	**454275**	**266814**	**373203**	**239338**	**455562**	**223737**	**568101**	**256890**	**307167**	**612788**	**469968**	**274209**	**268333**	**354248**	**316551**
M3G	1,5	1,1	5,5	4,8	< GK	1,1	1,6	1,2	1,3	< GK	< GK	1,1	1,2	< GK	< GK	< GK	1,3	< GK	< GK	< GK	< GK	1,0
norMOR	10,0	8,2	12,3	20,5	10,5	10,9	3,3	4,9	4,3	3,6	3,4	4,0	1,9	0,6	1,3	1,0	2,7	2,8	2,6	2,0	3,8	3,4
M6G	< GK	< GK	5,8	3,1	< GK	< GK	1,4	1,4	1,3	1,1	1,0	< GK	< GK	1,0	1,0	< GK	1,0	< GK	< GK	1,2	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	71,6	76,3	46,3	40,7	38,0	29,4	19,0	20,0	24,3	22,3	11,5	13,8	8,6	6,6	10,5	8,0	7,3	14,7	21,8	19,1	26,5	25,2
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	21,5	14,2	23,5	23,6	18,3	20,5	9,8	7,8	9,2	7,1	8,0	6,9	8,3	4,1	6,3	5,7	4,3	5,7	4,8	10,1	8,9	10,1
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	808,9	824,7	799,1	811,7	761,7	930,6	813,0	506,4	840,8	629,9	856,5	475,7	935,7	339,9	620,6	691,5	339,7	523,9	785,6	827,9	603,3	642,6
COD	161,8	111,5	107,7	106,6	91,5	120,6	71,3	51,8	61,1	58,4	41,5	37,9	44,4	31,8	40,2	46,1	39,6	67,1	115,2	116,8	104,9	102,6
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	2,6	2,6	< GK	< GK	2,5	1,7	< GK	< GK	< GK	1,0	< GK	1,6	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	1133,1	986,2	722,5	752,7	770,9	751,2	721,4	475,0	1007,0	1063,2	747,8	465,6	840,1	298,4	541,2	607,2	283,0	457,9	920,1	815,3	546,0	626,7
N-DM-TRAM	225,1	208,6	240,7	236,8	228,9	289,0	240,1	146,7	268,6	178,5	252,3	135,6	264,6	88,4	152,8	168,7	71,7	114,5	188,0	188,0	142,0	149,9
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	3,4	4,6	4,9	4,2	3,4	9,0	4,1	2,0	8,2	3,4	2,7	2,8	2,0	1,3	1,7	2,1	< GK	3,2	1,4	4,8	3,3	2,5
EDDP	111,4	119,6	113,1	137,9	116,8	114,7	91,2	61,8	82,1	80,7	78,4	65,7	107,3	45,3	66,0	60,0	78,4	114,5	96,7	137,3	127,3	122,6
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	46,8	50,1	46,3	54,4	40,2	67,6	34,9	28,2	35,3	33,3	28,1	22,2	40,5	20,3	29,1	29,5	29,8	32,9	47,0	49,1	40,6	38,3

Tablica IX. Masene koncentracije opioida i maseni protoci nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda izmjerene od 21. 03. do 27. 03. 2017. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

	Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}), *n* = 7							**Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}), *n* = 7**						
Datum	21. 03. 2017.	22. 03. 2017.	23. 03. 2017.	24. 03. 2017.	25. 03. 2017.	26. 03. 2017.	27. 03. 2017.	21. 03. 2017.	22. 03. 2017.	23. 03. 2017.	24. 03. 2017.	25. 03. 2017.	26. 03. 2017.	27. 03. 2017.
***Q* / m^3 dan^{-1}**	**284163**	**282999**	**284538**	**282301**	**274539**	**261031**	**277065**	**275273**	**278374**	**276180**	**276795**	**268172**	**253542**	**269790**
M3G	8,3	5,8	7,8	4,0	6,6	5,2	6,2	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	21,0	19,1	17,6	23,8	25,2	18,6	20,0	5,1	5,7	5,4	6,8	4,5	4,1	5,8
M6G	3,3	2,6	2,4	2,9	2,9	2,2	2,3	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	155,4	140,9	128,8	150,5	156,0	143,2	143,1	54,5	55,3	52,7	48,3	47,4	45,3	51,8
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	15,8	22,7	19,4	22,7	21,1	18,0	20,4	15,9	22,3	7,4	18,6	15,5	20,3	21,5
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	684,6	694,1	716,9	719,1	781,8	807,8	704,9	836,3	728,0	840,3	862,3	763,1	785,5	735,9
COD	263,8	184,2	387,6	314,0	298,8	267,8	240,0	197,0	733,7	312,1	268,0	177,9	200,3	216,8
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	4,0	2,9	4,1	2,8	4,5	3,8	5,0	1,4	1,3	< GK	1,2	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	730,5	692,0	754,1	734,4	813,5	763,5	715,4	788,9	702,5	796,7	704,3	699,9	708,1	656,6
N-DM-TRAM	207,9	204,4	205,6	211,9	231,1	229,8	214,4	253,2	220,1	252,5	268,7	250,3	256,5	237,5
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	5,8	7,5	6,4	7,8	7,7	8,3	6,9	4,0	3,2	2,4	3,8	3,8	4,2	4,2
EDDP	154,4	159,9	153,9	141,8	169,4	182,4	143,8	171,8	170,1	178,5	177,8	182,0	167,7	147,5
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	75,6	86,8	79,5	74,5	83,7	93,9	68,5	65,7	70,0	72,5	64,5	77,7	71,7	60,8

Tablica X. Masene koncentracije opioida i maseni protoci nepročišćenih i pročišćenih otpadnih voda izmjerene od 13. 03. do 19. 03. 2018. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

	Nepročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}), *n* = 7							**Pročišćena otpadna voda (γ / ng L^{-1}), *n* = 7**						
Datum	13. 03. 2018.	14. 03. 2018.	15. 03. 2018.	16. 03. 2018.	17. 03. 2018.	18. 03. 2018.	19. 03. 2018.	13. 03. 2018.	14. 03. 2018.	15. 03. 2018.	16. 03. 2018.	17. 03. 2018.	18. 03. 2018.	19. 03. 2018.
***Q* / m^3 dan^{-1}**	**567265**	**555209**	**523133**	**578533**	**651880**	**732240**	**675950**	**555871**	**543885**	**513270**	**567985**	**639438**	**732240**	**664630**
M3G	8,9	< GK	12,1	7,0	6,1	16,7	7,6	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	8,6	6,8	6,0	2,9	2,9	2,4	5,9	4,5	6,6	2,4	2,5	1,1	1,1	4,7
M6G	2,5	2,7	2,1	2,5	< GK	< GK	< GK	< GK	1,2	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	69,0	59,9	78,7	61,6	24,1	44,0	46,8	42,9	38,1	38,9	30,5	11,1	11,2	32,1
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	12,5	10,3	13,6	8,6	5,4	6,3	8,0	12,5	10,0	9,6	6,6	4,4	5,2	5,7
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	418,2	491,0	431,2	356,6	239,0	207,3	331,7	418,2	403,5	381,3	273,9	136,3	227,8	271,5
COD	122,4	121,6	116,0	95,4	61,5	64,1	92,2	98,6	120,6	107,3	88,5	54,7	59,9	79,6
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	5,0	4,4	3,3	3,8	2,6	2,8	2,4	1,5	1,4	< GK	1,7	< GK	1,2	1,3
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	1030,0	1225,0	1545,9	1993,9	1741,0	577,9	462,2	800,1	1094,8	1017,0	1051,3	1224,8	512,1	407,5
N-DM-TRAM	155,5	197,3	342,7	184,7	147,8	82,6	92,9	155,5	134,4	179,7	108,6	53,0	85,7	105,7
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	5,6	8,2	6,7	3,7	< GK	5,1	3,7	5,6	3,8	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	106,5	96,3	123,0	80,2	73,7	77,2	89,9	102,6	92,0	82,0	82,3	74,9	75,9	93,2
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	45,0	61,5	57,6	40,1	41,1	36,4	37,6	49,3	38,0	42,9	49,6	44,9	37,3	48,2

Tablica XI. Masene koncentracije mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda izmjerene 2019. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba, n = 24. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Suha tvar, γ / g L^{-1}	Nepročišćena otpadna voda, γ / ng L^{-1}					
		COD	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
13. 01. 2019.	0,1474	5,5	7,2	4,2	2,6	3,7	3,9
15. 01. 2019.	0,1621	2,6	4,4	3,3	2,3	3,4	4,1
03. 02. 2019.	0,1791	2,0	6,9	5,2	13,2	4,2	4,6
05. 02. 2019.	0,1019	1,5	3,1	2,6	1,2	2,6	0,8
24. 03. 2019.	0,1471	2,8	6,9	3,6	2,2	4,4	1,7
26. 03. 2019.	0,1488	4,3	6,6	5,1	2,1	5,3	3,1
14. 04. 2019.	0,1066	1,6	3,6	4,9	2,9	1,9	0,8
16. 04. 2019.	0,1036	1,8	4,1	6,1	1,9	3,3	2,7
05. 05. 2019.	0,2002	1,8	3,6	1,7	4,2	3,7	4,8
07. 05. 2019.	0,1575	1,8	8,4	4,6	2,7	2,7	3,1
02. 06. 2019.	0,0833	0,6	3,4	3,1	2,4	2,0	2,1
04. 06. 2019.	0,1473	1,0	5,1	3,6	2,1	2,5	1,7
30. 06. 2019.	0,1426	1,3	3,1	3,1	1,5	3,4	1,3
02. 07. 2019.	0,2271	1,8	9,1	5,2	2,7	4,1	4,0
25. 08. 2019.	0,1078	2,9	7,6	5,2	4,6	5,4	4,7
27. 08. 2019.	0,1082	1,5	2,3	1,7	2,8	3,3	1,4
08. 09. 2019.	0,2214	2,1	4,4	3,1	2,0	3,6	3,6
10. 09. 2019.	0,1250	2,5	4,8	6,9	2,8	3,3	0,5
27. 10. 2019.	0,1378	1,7	4,8	6,6	2,8	1,9	1,9
29. 10. 2019.	0,3045	2,3	6,9	7,0	2,8	2,5	3,2
24. 11. 2019.	0,1155	2,1	5,6	5,1	3,0	2,5	0,1
26. 11. 2019.	0,1297	1,7	3,8	4,5	1,9	2,9	0,8
08. 12. 2019.	0,1887	2,4	4,4	2,6	3,2	2,6	0,9
10. 12. 2019.	0,0808	3,1	6,2	4,5	1,6	2,4	1,6

Tablica XII. Maseni udjeli mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji nepročišćenih otpadnih voda izmjereni 2019. godine u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba, n = 24. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Suha tvar, γ / g L^{-1}	Nepročišćena otpadna voda, w / ng g^{-1}					
		COD	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
13. 01. 2019.	0,1474	37,4	48,9	28,7	17,6	25,3	26,6
15. 01. 2019.	0,1621	16,2	26,9	20,6	14,2	21,2	25,4
03. 02. 2019.	0,1791	11,2	38,6	29,2	73,5	23,4	25,8
05. 02. 2019.	0,1019	14,3	30,4	25,4	12,0	25,6	7,8
24. 03. 2019.	0,1471	19,4	46,9	24,4	15,1	30,0	11,2
26. 03. 2019.	0,1488	29,2	44,0	34,6	13,8	35,9	21,0
14. 04. 2019.	0,1066	15,5	33,7	46,3	27,0	18,0	7,1
16. 04. 2019.	0,1036	17,1	39,4	58,4	18,0	32,3	25,7
05. 05. 2019.	0,2002	8,9	17,9	8,3	21,2	18,4	24,2
07. 05. 2019.	0,1575	11,3	53,6	29,5	17,4	17,3	19,6
02. 06. 2019.	0,0833	7,2	40,3	37,4	28,8	23,4	24,9
04. 06. 2019.	0,1473	6,9	34,5	24,6	14,3	17,1	11,6
30. 06. 2019.	0,1426	9,3	21,6	21,6	10,3	23,9	9,2
02. 07. 2019.	0,2271	8,0	40,1	23,0	12,1	18,0	17,6
25. 08. 2019.	0,1078	26,6	70,8	48,4	42,7	50,3	43,9
27. 08. 2019.	0,1082	14,2	20,9	15,4	26,3	30,1	12,6
08. 09. 2019.	0,2214	9,4	20,0	14,0	9,3	16,4	16,2
10. 09. 2019.	0,1250	19,7	38,7	55,3	22,7	26,3	4,4
27. 10. 2019.	0,1378	12,6	35,1	48,0	20,4	13,7	14,0
29. 10. 2019.	0,3045	5,7	15,9	21,7	9,3	6,2	6,3
24. 11. 2019.	0,1155	17,9	48,6	44,5	26,1	21,7	1,1
26. 11. 2019.	0,1297	12,8	29,2	34,8	14,8	22,5	6,4
08. 12. 2019.	0,1887	12,5	23,2	13,7	16,9	13,6	4,9
10. 12. 2019.	0,0808	38,9	77,2	55,8	20,3	29,3	19,4

Tablica XIII. Masene koncentracije mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji aktivnog mulja izmjerene na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba, n = 3. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Suha tvar, γ / g L^{-1}	Aktivni mulj, γ / ng L^{-1}					
		COD	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
04. 06. 2018.	2,8	37,0	133,0	44,0	47,6	211,7	126,0
08. 06. 2020.	3,9	< GK	395,2	82,3	63,7	144,7	215,7
20. 06. 2020.	3,8	36,1	351,1	73,7	57,0	128,1	190,0

Tablica XIV. Maseni udjeli mjerljivih opioidnih analgetika u partikulatnoj frakciji aktivnog mulja izmjereni u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba, n = 3. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Datum	Suha tvar, γ / g L^{-1}	Aktivni mulj, w / ng g^{-1}					
		COD	TRAM	*O*-DM-TRAM	*N*-DM-TRAM	MTHD	EDDP
04. 06. 2018.	2,8	13,2	47,5	15,7	17,0	75,6	45,0
08. 06. 2020.	3,9	< GK	101,2	21,1	16,3	37,0	55,2
20. 06. 2020.	3,8	9,5	92,4	19,4	15,0	33,7	50,0

Tablica XV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postajama Šentjakob (S 1), Jevnica (S 2) i Brežice (S 3) u svibnju i srpnju 2017. godine, $n = 2$. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Šentjakob**, γ / ng L^{-1}		**Jevnica**, γ / ng L^{-1}		**Brežice**, γ / ng L^{-1}	
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.
M3G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	< GK	< GK	0,5	1,3	< GK	< GK
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	2,6	3,5	10,6	9,7	7,1	4,3
COD	< GK	< GK	0,3	0,6	0,3	< GK
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	0,1	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	3,7	13,5	8,3	20,9	9,4	28,9
N-DM-TRAM	1,3	1,3	2,5	4,2	2,3	5,3
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	0,3	0,6	0,6	1,5	0,5	1,1
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,3	1,6	0,4	2,9	0,4	1,7

Tablica XVI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Otok Samoborski od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, *n* = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Otok Samoborski**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	0,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	< GK	< GK	0,4	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,2
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	5,4	4,0	5,9	2,5	5,5	4,3	1,5	8,9	2,2	9,0
COD	0,3	< GK	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	< GK	< GK
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	15,7	47,2	11,1	9,1	9,0	13,5	7,9	23,3	20,8	16,0
N-DM-TRAM	2,7	5,7	1,6	0,3	1,7	1,1	1,4	3,9	2,9	3,9
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	0,4	1,0	0,6	0,8	0,7	0,5	0,5	1,1	0,2	0,7
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,2	1,3	0,3	1,4	0,7	0,4	0,8	0,5	0,3	0,5

Tablica XVII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u pritoku rijeke Save na postaji Gradna od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine, n = 8. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Gradna**, γ / ng L^{-1}							
	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	0,1	0,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	0,6	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	8,9	0,5	2,0	5,2	5,0	8,3	7,5	7,5
COD	0,3	< GK	0,3	0,6	0,5	0,8	0,4	0,6
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	9,0	1,9	3,2	5,0	5,6	8,4	8,0	9,1
N-DM-TRAM	2,8	< GK	0,6	0,8	1,1	2,0	2,9	2,6
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	0,6	1,4	0,5	0,6	0,4	0,2	0,1	< GK
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,8	0,9	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3	< GK

Tablica XVIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u pritoku rijeke Save na postaji Krapina od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine, *n* = 8. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Krapina**, γ / ng L^{-1}							
	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	0,1	0,1	< GK	< GK	< GK	0,1	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	0,7	0,3	0,5	< GK	< GK	< GK	< GK	0,9
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	1,6
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	39,1	18,0	27,6	65,3	78,3	66,3	99,3	136,7
COD	4,7	4,5	2,0	3,4	4,8	3,2	3,1	8,4
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	40,4	24,4	21,5	47,7	74,3	64,1	126,2	127,2
N-DM-TRAM	7,8	2,8	7,2	10,0	14,2	17,5	34,3	43,3
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,5
EDDP	1,6	1,7	0,2	0,4	0,2	0,6	0,2	0,6
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,8	3,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,4	0,2

Tablica XIX. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Jankomir od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Jankomir**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	0,1	< GK	< GK	< GK	0,1	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,4	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	< GK	1,5	0,6	< GK	0,3	< GK	< GK	3,4	< GK	3,0
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	11,6	6,7	8,9	3,5	8,7	8,7	14,3	14,7	9,2	13,5
COD	0,3	0,5	0,3	0,1	0,7	0,2	1,2	0,9	0,4	< GK
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	20,3	43,6	13,0	11,1	10,6	16,6	21,0	24,2	48,1	21,6
N-DM-TRAM	2,8	6,3	1,4	0,3	2,7	3,2	5,8	3,2	5,7	5,4
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,1
EDDP	0,5	0,9	0,8	0,9	0,4	0,6	1,1	0,9	0,7	2,1
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,3	1,9	1,0	3,0	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4

Tablica XX. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Petruševec od studenoga 2017. do studenoga 2018. godine, *n* = 8. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Petruševec**, γ / ng L^{-1}							
	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	0,1	0,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	0,3	0,4	< GK	< GK	< GK	3,1	0,3	2,1
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	6,0	2,9	7,5	6,7	5,4	11,6	5,4	10,5
COD	0,4	0,2	0,5	0,2	0,7	1,0	< GK	< GK
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	12,2	9,8	10,3	16,6	15,4	25,0	37,2	18,3
N-DM-TRAM	1,3	0,3	2,3	2,7	1,2	3,6	4,3	4,4
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	0,2	0,6	0,6	0,4	0,9	1,1	0,9	1,0
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	1,3	1,6	0,3	0,3	0,9	0,6	0,5	0,4

Tablica XXI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Oborovo od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Oborovo**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	0,1	0,1	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	0,3	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,2	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	0,7	1,9	< GK	0,3	0,7	< GK	< GK	2,0	1,5	2,6
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	24,7	32,7	6,5	7,0	16,5	14,4	26,3	31,1	28,2	31,2
COD	3,4	3,6	1,7	1,2	2,4	1,7	2,6	3,4	4,5	3,7
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	205,2	72,9	28,0	16,6	16,4	21,5	31,6	57,3	75,4	34,9
N-DM-TRAM	9,2	12,5	1,6	1,1	3,3	3,5	9,4	12,9	13,2	11,3
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,4	< GK	0,1
EDDP	2,7	4,9	1,6	0,9	2,0	1,7	3,1	3,5	1,9	7,0
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,8	2,3	2,2	0,7	0,8	0,9	0,7	1,9	1,3	1,3

Tablica XXII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u rijeci Savi na postaji Sisak od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Sisak**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	< GK	0,5	< GK	0,4	< GK	< GK	< GK	0,8	0,1	0,8
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	15,8	15,3	50,6	46,9	6,7	27,7	19,5	18,1	1,8	27,2
COD	2,2	1,9	14,4	3,5	1,1	5,6	1,4	2,2	0,1	2,7
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	20,5	50,8	62,3	45,4	8,3	19,8	26,8	33,5	1,8	29,9
N-DM-TRAM	5,4	9,8	16,7	11,1	1,4	9,0	5,8	8,8	0,6	8,5
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,5	< GK	< GK	< GK	< GK
EDDP	1,5	2,6	3,8	0,2	0,9	1,3	2,2	2,1	0,1	4,2
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	0,6	4,0	1,5	0,7	0,5	0,5	0,6	1,0	0,2	1,3

Tablica XXIII. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenim otpadnim vodama u UPOV Ljubljana, Domžale-Kamnik i Novo Mesto u svibnju i srpnju 2017. godine, $n = 2$. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Ljubljana**, γ / ng L^{-1}		**Domžale-Kamnik**, γ / ng L^{-1}		**Novo Mesto**, γ / ng L^{-1}	
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.
M3G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	< GK	2,3	7,5	13,9	< GK	< GK
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	32,8	41,6	95,9	148,7	3,2	8,5
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	691,6	922,4	524,7	528,9	1247,2	1196,4
COD	35,5	38,6	47,5	69,2	12,9	8,7
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	0,7	< GK	0,9	< GK	0,9
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	633,3	700,8	502,3	477,5	996,3	1090,8
N-DM-TRAM	213,2	209,6	263,8	427,4	309,1	230,2
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	1,1	2,5	3,4	2,2	0,5	0,8
EDDP	112,6	105,1	68,5	40,0	57,3	45,0
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	40,4	36,5	14,3	5,6	33,3	31,9

Tablica XXIV. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenoj otpadnoj vodi u UPOV Zaprešić od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 9. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Zaprešić, γ / ng L^{-1}									
Analit	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	0,7	< GK	< GK
norMOR	< GK	12,9	< GK	< GK	36,5	27,1	16,4	29,4	21,1
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	53,6	192,1	145,2	32,5	56,2	244,9	383,7	560,9	672,1
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	1266,7	384,1	946,3	488,0	581,6	970,3	316,9	2168,2	740,0
COD	431,7	140,7	43,9	245,1	434,0	417,6	100,6	359,0	260,3
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	1099,2	521,7	28641,3	397,3	1996,5	1854,8	569,2	1395,6	17593,2
N-DM-TRAM	59,7	65,9	24,0	126,4	268,8	164,2	73,6	462,9	211,1
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	< GK	20,3	< GK	< GK	< GK	< GK	13,5	7,6	< GK
EDDP	162,0	54,2	169,3	41,6	57,6	136,7	38,4	97,7	65,8
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	106,5	27,1	71,9	20,9	21,3	57,2	16,9	48,6	50,2

Tablica XXV. Masene koncentracije opioidnih analgetika u nepročišćenim otpadnim vodama u Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Zagreb**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	13,0	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norMOR	4,5	2,3	7,5	2,3	3,9	7,8	1,3	1,2	0,8	4,5
M6G	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	27,5	11,6	85,5	20,7	39,4	44,3	8,7	14,4	17,6	39,2
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	12,0	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	15,4
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	840,4	528,2	486,9	401,7	493,2	783,4	828,8	901,6	971,0	867,4
COD	146,4	57,2	146,6	79,7	120,9	122,7	60,0	67,7	122,2	171,3
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	0,3	1,0	8,0	0,1	0,3	0,6	1,2	0,9	0,6	0,4
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	5316,3	471,5	614,5	960,3	404,1	563,2	607,9	1508,0	933,3	768,8
N-DM-TRAM	359,9	122,9	176,1	87,5	162,3	195,3	221,5	243,3	259,5	235,5
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	1,7	2,2	2,7	1,0	3,9	5,7	< GK	< GK	3,3	3,2
EDDP	166,9	78,9	132,1	90,2	110,1	128,0	132,6	135,8	135,0	155,2
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	60,5	23,9	79,4	66,7	47,8	28,5	46,0	64,4	74,9	74,4

Tablica XXVI. Masene koncentracije opioidnih analgetika izmjerene u nepročišćenim otpadnim vodama u UPOV Velika Gorica od svibnja 2017. do studenoga 2018. godine, n = 10. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 6.

Analit	**Velika Gorica**, γ / ng L^{-1}									
	24. 05. 2017.	12. 07. 2017.	29. 11. 2017.	18. 12. 2017.	27. 03. 2018.	25. 04. 2018.	27. 06. 2018.	11. 07. 2018.	18. 09. 2018.	20. 11. 2018.
M3G	< GK	< GK	0,8	2,5	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	5,5
norMOR	27,2	73,3	66,4	63,1	81,1	92,7	61,2	59,0	57,9	120,3
M6G	< GK	< GK	< GK	1,9	< GK	6,2	< GK	< GK	< GK	< GK
DMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MOR	216,7	286,9	350,8	323,5	400,7	438,5	291,5	339,0	400,7	653,2
OM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HM	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
norCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
DCOD	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
O-DM-TRAM	1728,4	1852,3	2428,4	1787,2	2435,9	2301,6	2048,2	2147,3	2041,5	1782,1
COD	763,1	544,8	810,8	694,6	895,1	704,9	829,5	509,5	672,8	870,6
NOC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NHC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
OC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
6-AM	2,7	< GK	12,0	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
HC	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
EMOR	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
NFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
TRAM	1352,7	1447,8	1427,0	1288,0	1411,7	1868,4	1593,6	1472,6	1585,0	1567,9
N-DM-TRAM	362,3	397,0	286,0	220,7	415,6	286,2	367,6	279,0	520,9	453,1
norBUP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
FNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
BUP	7,0	7,2	11,5	5,0	5,3	5,1	4,4	1,7	8,8	8,1
EDDP	224,5	135,6	281,8	279,1	247,9	303,5	250,1	185,4	282,5	489,5
PP	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
SFNT	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK	< GK
MTHD	142,5	57,0	82,7	52,9	51,6	71,7	79,9	71,1	102,2	51,7

§ 9. ŽIVOTOPIS

Petra Kostanjevečki rođena je 20. lipnja 1992. godine u Zaboku. Gimnaziju Antuna Gustava Matoša završila je 2011. godine te je upisala preddiplomski sveučilišni studij Kemijskog inženjerstva. Sveučilišni diplomski studij Kemijskog inženjerstva Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu završila je 2016. godine. Dobitnica je Rektorove nagrade za individualni znanstveni rad te Dekanove nagrade „Cum laude magister“ za izvrsnost u studiranju. Doktorski studij Analitičke kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2016. godine, od kada je i zaposlenica Laboratorija za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva Zavoda za istraživanje mora i okoliša u Institutu Ruđer Bošković. Objavila je 5 znanstvenih publikacija u Q1 časopisima, od čega je nositelj prvog autorstva dva znanstvena rada, a u izradi triju radova doprinijela je kao koautor. Sumarno ima 8 usmenih i posterskih priopćenja na konferencijskim skupovima te objava u zbornicima. U 2019. i 2020. dobitnica je Godišnje nagrade Instituta Ruđer Bošković za znanstvene radove objavljene u bazi *Web of Science Core Collection* s faktorom utjecaja unutar prvih 10 % u predmetnoj kategoriji. Sudjeluje u realizaciji međunarodno evaluiranih znanstvenih projekata, kao i u provedbi interdisciplinarnih projektnih zadataka kroz međuinstitucionalnu i inozemnu suradnju. U 2019., 2020. i 2021. aktivno je sudjelovala u interkalibraciji i aktivnostima međunarodne mreže laboratorija SCORE grupe. Članica je Hrvatskog društva kemijskih inženjera od 2015. godine. Predmetno područje njenog znanstvenog istraživanja je određivanje organskih spojeva, posebice terapijskih opioida, ilegalnih droga te antibiotika u okolišnim uzorcima te epidemiologija otpadnih voda.

Popis radova u CC časopisima:

1. I. Krizman-Matasić, P. Kostanjevečki, M. Ahel, S. Terzić, Simultaneous analysis of opioid analgesics and their metabolites in municipal wastewaters and river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1533** (2018) 102-111.
2. I. Krizman-Matasić, I. Senta, P. Kostanjevečki, M. Ahel, S. Terzić, Long-term monitoring of drug consumption patterns in a large-sized European city using

wastewater-based epidemiology: Comparison of two sampling schemes for the assessment of multiannual trends, *Sci. Total Environ.* **647** (2019) 476-485.

3. P. Kostanjevečki, I. Sviličić Petrić, J. Lončar, T. Smital, M. Ahel, S. Terzić, Biodegradation study of methadone by adapted activated sludge: Elimination kinetics, transformation products and ecotoxicological evaluation, *Chemosphere* **214** (2019) 719-728.
4. P. Kostanjevečki, I. Sviličić Petrić, J. Lončar, T. Smital, M. Ahel, S. Terzić, Aerobic biodegradation of tramadol by pre-adapted activated sludge culture: Cometabolic transformations and bacterial community changes during enrichment, *Sci. Total Environ.* **687** (2019) 858-866.
5. I. Senta, P. Kostanjevečki, I. Krizman-Matasić, S. Terzić, M. Ahel, Occurrence and Behavior of Macrolide Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment: Possible Importance of Metabolites, Synthesis Byproducts, and Transformation Products, *Environ. Sci. Technol.* **53** (2019) 7463-7472.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. P. Kostanjevečki, E. Kristan Mioč, H. Otmačić Ćurković, Ekološki prihvatljiva modifikacija površine čelika uz primjenu samoorganizirajućih monoslojeva s ciljem korozijske zaštite u morskoj vodi, *Book of Abstracts: 6th ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry*, predavanje, Zagreb (2016) 36-37.
2. E. Kristan Mioč, P. Kostanjevečki, H. Otmačić Ćurković, Formiranje samoorganizirajućih monoslojeva na kemijski modificiranim površinama čelika, *Knjiga sažetaka: XI. Susret mladih kemijskih inženjera*, poster, Zagreb (2016) 85.
3. I. Krizman-Matasić, P. Kostanjevečki, M. Ahel, S. Terzić, Determination of opioid analgesics and their metabolite sin municipal wastewaters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Book of Abstracts: SETAC Europe, 27th Annual Meeting*, predavanje, Brisel (2017) 102-103.
4. S. Terzić, I. Krizman-Matasić, I. Senta, P. Kostanjevečki, I. González-Mariño, R. Rodil, J. Benito Quintana, M. Ahel, The impact of major music festival and tourist season on the drug, alcohol and tobacco consumption in a Croatian coastal city, *Book of Abstracts: Wastewater based epidemiology: current applications and future perspectives*, predavanje, Lisabon (2017) 11.

5. S. Terzić, P. Kostanjevečki, I. Krizman-Matasić, I. Senta, T. Jurina, N. Udiković-Kolić, J. Ćurko, M. Matošić, J. Lončar, I. Mihaljević, T. Smital, M. Ahel, Evaluation of macrolide antibiotic transformation in model biodegradation and ozonation experiments using target and non-target analyses and ecotoxicological bioassays, *Book of Abstracts: SETAC Europe, 28th Annual Meeting*, predavanje, Rim (2018) 19.
6. P. Kostanjevečki, J. Ćurko, M. Matošić, M. Ahel, S. Terzić, Elimination of tramadol and methadone in model ozonation experiments: removal kinetics and identification of transformation products, *Book of Abstracts: SETAC Europe, 28th Annual Meeting*, poster, Rim (2018) 205.
7. S. Terzić, P. Kostanjevečki, I. Sviličić Petrić, J. Ćurko, M. Matošić, M. Ahel, Degradation of methadone in model biodegradation and ozonation experiments: elimination kinetics and transformation products, *15th International Symposium on Persistent Toxic Substances*, poster, Basel (2018)
8. P. Kostanjevečki, J. Ćurko, M. Matošić, M. Ahel, T. Senka, Uklanjanje opioidnih analgetika iz otpadnih voda ozoniranjem: kinetika eliminacije i identifikacija transformacijskih produkata, *Knjiga sažetaka: Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a*, predavanje, Zagreb (2020) 40.