

Stanovení vybraných drog a jejich metabolitů v odpadních vodách metodou kapalinové chromatografie

**DANICA POSPÍCHALOVÁ, DIANA MAREŠOVÁ, VĚRA OČENÁŠKOVÁ,
TEREZA ŠAFRÁNKOVÁ, EVA BOHADLOVÁ**

Klíčová slova: odpadní voda – drogy – nikotin – metabolity nikotinu – alkohol – ethylsulfát

SOUHRN

Epidemiologie odpadních vod byla navržena v roce 2001 ke sledování koncentrace nelegálních drog a jejich metabolitů v odpadních vodách přitékajících do komunálních čistíren odpadních vod, do kterých se zmíněné sloučeniny dostávají z moče konzumentů drog cestou kanalizační sítě. Poprvé byla použita v roce 2005 ke sledování kokainu v Itálii. Postupně byl přístup aplikován na sledování dalších nezákonných drog jako např. heroin, kanabis nebo stimulantů na bázi amfetaminu. Analýza odpadních vod je velmi slibný způsob k monitorování legálních stimulantů, jako je nikotin a jeho metabolity a alkohol, resp. metabolity alkoholu. Ve VÚV TGM, v. v. i., je od roku 2012 rozvíjena metoda LC-MS umožňující současné stanovení řady těchto látek. Příspěvek shrnuje analytické možnosti stanovení a metodiku vyvinutou na pracovišti se zaměřením na analyty nikotin a jeho metabolity a na metabolit alkoholu ethylsulfát, nově doplněné v rámci řešení projektu „Čistá voda – zdravé město: Komunální odpadní voda jako diagnostické médium hlavního města Prahy“ v rámci Konceptu IV.

ÚVOD

Epidemiologie odpadních vod byla navržena v roce 2001 [1] ke sledování koncentrace nelegálních drog a jejich metabolitů v odpadních vodách přitékajících do komunálních čistíren odpadních vod, do kterých se zmíněné sloučeniny dostávají z moče konzumentů drog cestou kanalizační sítě. Poprvé byla použita v roce 2005 ke sledování kokainu v Itálii [2]. Postupně byl přístup aplikován na sledování dalších nezákonných drog jako např. heroin, kanabis nebo stimulantů na bázi amfetaminu [3–6]. V České republice proběhlo např. sledování v rámci projektu Dragon (projekt Ministerstva vnitra, VG20122015101 Stanovení množství nelegálních drog a jejich metabolitů v komunálních odpadních vodách – nový nástroj pro doplnění údajů o spotřebě drog v České republice) [7]. Sledovány byly metamfetaminy, kokain a jeho metabolity, opioidy, LSD, buprenorfin, metadon a jeho metabolit EDDP, efedrin, tramadol a nor-THC s využitím dříve vyvinuté metodiky [8].

V rámci řešení projektu „Čistá voda – zdravé město: Komunální odpadní voda jako diagnostické médium hlavního města Prahy“ (dále jen Projekt) byly analyzovány možnosti rozšíření stávající metodiky o další zneužívané látky. Na základě literatury a dřívějších prací byly vybrány nikotin a jeho metabolity, metabolit alkoholu ethylsulfát a katinin (nové syntetické drogy).

Analýza odpadních vod je velmi slibný způsob k monitorování legálních stimulantů, jako je nikotin a jeho metabolity. Avšak koncentrace těchto látek značně kolísá v průběhu roku a často dosahuje velmi nízkých hodnot. Je to způsobeno hlavně nestabilitou nikotinu v odpadní vodě. Proto se sledují hlavně stabilní metabolity – kotinin a *trans*-3'-hydroxykotinin. V lidském těle je nikotin metabolizován na kotinin (70–80 %) a nikotin-N'-oxid (4–7 %). Kotinin je potom dále metabolizován na další submetabolity, tj. jenom 10–15 % zkonsumovaného nikotinu je vyloučeno jako kotinin [9]. Část nikotinu přechází do moči nemetabolizována. Nikotin se ale může dostávat do odpadní vody nejen s močí, ale i oplachem z nedopalků cigaret a popela [10, 11]. Dalším zdrojem nikotinu je substituční léčba (nikotinové náplasti a žvýkačky) a elektronické cigarety [11]. Analýza nikotinu v odpadní vodě není specifická a nevystihuje nebezpečnou konzumaci tabáku. Proto se pro kvantifikaci nikotinu v některých studiích využívají např. alkaloidy anabasin a anatabin, které jsou specifické pro sušený tabák, a stanovují se spolu s nikotinem a kotininem jako biomarkery pro konzumaci tabáku v odpadní vodě [12].

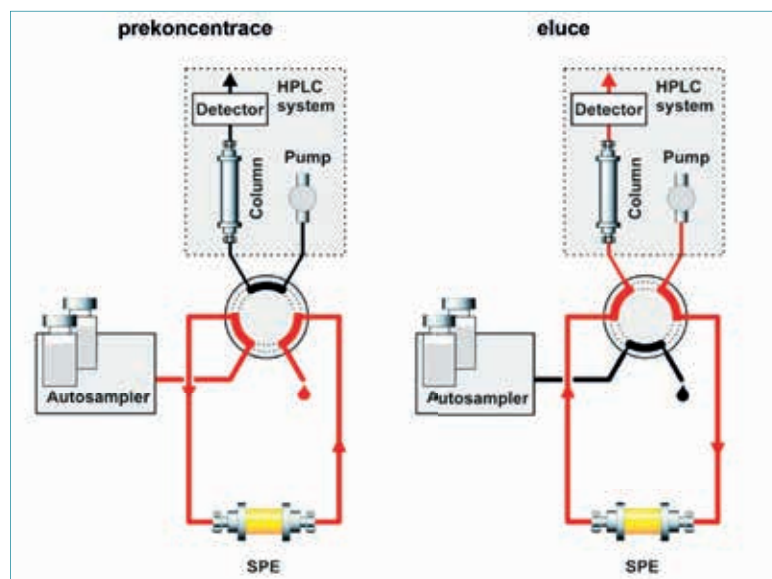
Alkoholické nápoje jsou jednou z nejpobulárnějších látek ve společnosti s obsahem psychoaktivní sloučeniny ethanol. Ethanol je v játrech oxidován především na acetaldehyd (90–95 %). Malá část (< 0,1 %) přechází na metabolity ethylsulfát (EtS) a ethylglukuronid [13]. Ethylglukuronid není vhodný jako biomarker v odpadních vodách, protože je v nich velmi nestabilní [14]. Ethylsulfát je specifický biomarker pro monitorování spotřeby alkoholu. Jedná se o metabolit ethanolu, který indikuje nedávnou konzumaci alkoholu s dobou detekce do 48 hodin u zdravých jedinců a je stabilní v odpadní vodě [14].

Ke stanovení nikotinu a jeho metabolitů se nejvíce používají přístroje LC-MS/MS [9, 11, 12, 15–20], výjimečně LC-QTOF [21] nebo hybridní MS Q-Exactive s vysokým rozlišením [22–25]. Detekce a kvantifikace se provádí s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupolu s ionizací v pozitivním módu ESI+. Odpadní voda jako složitá matrice obsahuje velké množství koelujících sloučenin, které mohou ve velké míře ovlivňovat ionizaci sledovaných sloučenin. Proto se před extrakcí přidávají ke vzorku odpadní vody deuterované izomery stanovovaných analytů a kvantifikace se provádí metodou interního standardu [9–12, 15–28]. Ke zvýšení citlivosti stanovení a čištění se používá prekoncentrace vzorku extrakcí na pevné fázi (SPE) v zapojení on-line [25–27] nebo off-line [9, 11, 15–24, 28]. Používají se kolony Oasis HLB [11, 14, 19–21, 26–28], Oasis MCX [15], StrataX [12]. Pro on-line SPE se používá zejména kolonka Hypersil Gold [23–25]. Stanovení nikotinu a jeho metabolitů se provádí většinou s kolonami s reverzní fází C18 [9–12, 15–28] a středně polární mobilní fází, která obsahuje organickou fázi (nejčastěji acetonitril nebo methanol) a vodnou fázi (voda s přísadkou mravenčanu nebo octanu amonného v proměnlivém poměru podle nastaveného programu gradientu).

Tabulka 1. Přehled analytů, jejich základní charakteristiky a rozdělení do metod stanovení
 Table 1. Overview of analytes, their characteristics and methods of detection

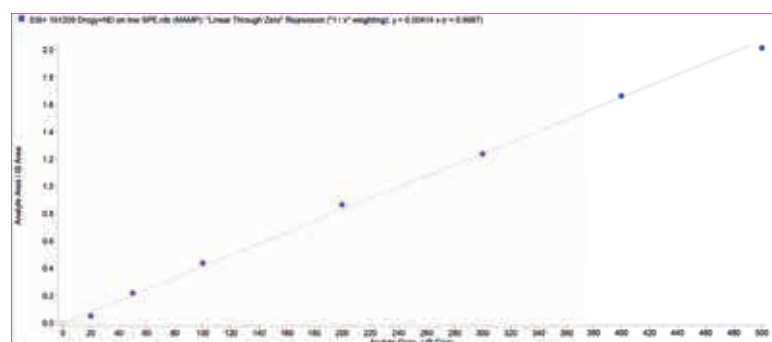
Látka	CAS Number	Zkratka	Charakteristika	Metoda
6-acetylmorfin	63690-08-4	6ACM	metabolit heroínu	ESI+
amfetamin	2706-50-5	AMP	stimulancium	ESI+
benzoylcegonin	519-09-5	BE	metabolit kokainu	ESI+
buprenorfin	53152-21-9	BUP	opiooid, substituční léčba	ESI+
diethylamid kyseliny lysergové	50-37-3	LSD	halucinogen	ESI+
diethylamid kyseliny 2-oxo-3-hydroxy-lysergové	111295-09-1	OH-LSD	metabolit LSD	ESI+
efedrin	24221-86-1	EPH	prekurzor pro výrobu pervitinu	ESI+
ethylcathinon	51553-17-4	Eth-cat	syntetický kathinon	ESI+
2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin	66729-78-0	EDDP	metabolit metadonu	ESI+
ethylsulfát	546-74-7	EtS	metabolit alkoholu	ESI-
extáze	64057-70-1	MDMA	stimulancium	ESI+
fentanyl	437-38-7	FEN	opiooidní analgetikum	ESI+
heroin	561-27-3	HER	opiooid	ESI+
kokaethylen	529-38-4	COE	metabolit kokainu	ESI+
kokain	50-36-2	CO	stimulancium	ESI+
kotinin	486-56-6	COT	metabolit nikotinu	ESI+
mefedron	1189726-22-4	MMC	syntetický kathinon	ESI+
metadon	1095-90-5	MET	opiooid, substituční léčba	ESI+
metamfetamin	300-42-5	MAMP	pervitin, stimulancium	ESI+
4-methylethcathinon	1266688-86-1	4-MEC	syntetický kathinon	ESI+
metylon	186028-80-8	bk-MDMA	syntetický kathinon	ESI+
morfin	6009-81-0	MOR	opiooid	ESI+
nikotin	54-11-5	NIC	alkaloid	ESI+
nor-diazepam	1088-11-5	Nor-DZP	metabolit diazepam, anxiolytikum	ESI+
nor-fentanyl	1609-66-1	Nor-FEN	metabolit fentanylu	ESI+
nor-mefedron	6941-17-9	Nor-MMC	metabolit mefedronu	ESI+
11-nor-9-karboxy-delta-9-THC	56354-06-4	nor-THC	metabolit THC	ESI-
pentedron	879669-95-1	PENT	syntetický kathinon	ESI+
tramadol	36282-47-0	TRAM	opiooidní analgetikum	ESI+
trans-3-hydroxykotinin	34834-67-8	T3H-COT	metabolit nikotinu	ESI+
α-pyrrolidinovalerofenon	5485-65-4	Alfa-PVP	syntetický kathinon	ESI+

Pozn.: ESI+: ionizace elektrosprejem v pozitivním módu; ESI-: ionizace elektrosprejem v negativním módu



Obr. 1. Zapojení se šesticetným ventilem, eluce proti směru SPE

Fig. 1. Connection of six-way valve, elution against the direction of SPE



Obr. 2. Ukázka kalibrační křivky pro metamfetamin (MAMP)

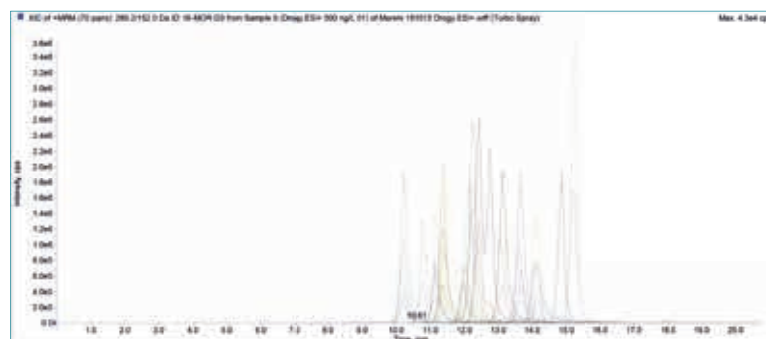
Fig. 2. Example of calibration curve (methamphetamine)



Obr. 3. Ukázka kalibrační křivky pro kotinin (COT)

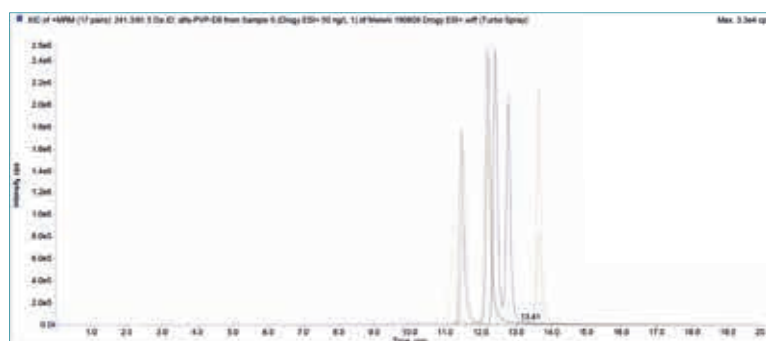
Fig. 3. Example of calibration curve (cotinine)

Ke stanovení ethylsulfátu v odpadní vodě se používá metoda kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupolem a elektrosprejem jako iontovým zdrojem v negativním módu (ESI-) [13, 29–35]. EtS je polární sloučenina a na tradičních kolonách C18, C8 s reverzní fází je málo zadržován. Proto se rozšířilo jeho stanovení pomocí iontové párové chromatografie. Používají se iontové párové činidla: 5 mM dibutylamonium acetát [24], 7 mM dihexylamonium acetát [12, 25]. Používané mobilní fáze jsou voda a methanol, iontově párové činidlo se přidává do jedné nebo obou fází. Úspěšně byla ke stanovení EtS použita kolona Synergi Polar-RP (polar endcapped phenylpropyl

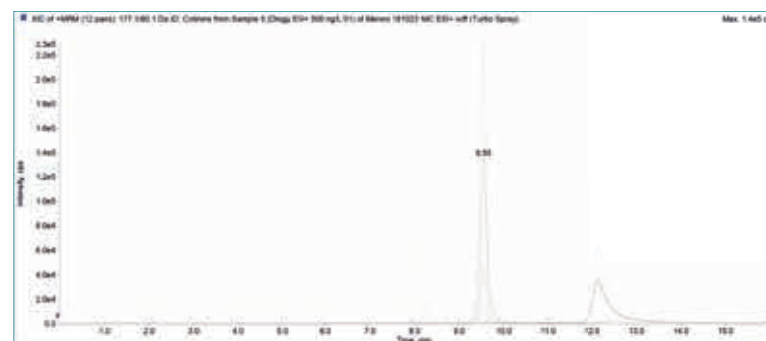


Obr. 4. Ukázka chromatogramu extrahovaných iontů v režimu ESI+ (amfetamin, benzoylcegonin, buprenorphin, EDDP, efedrin, extáze, fentanyl, heroin, kokaethylen, kokain, LSD, metadon, metamfetamin, morfin, nor-diazepam, nor-fentanyl, tramadol)

Fig. 4. Example of extracted ion chromatograms in ESI+ (amphetamine, benzoylcegonine, buprenorphine, EDDP, ephedrine, MDMA, fentanyl, heroin, cocaethylene, cocaine, LSD, methadone, methamphetamine, morphine, nor-diazepam, nor-fentanyl, tramadol)



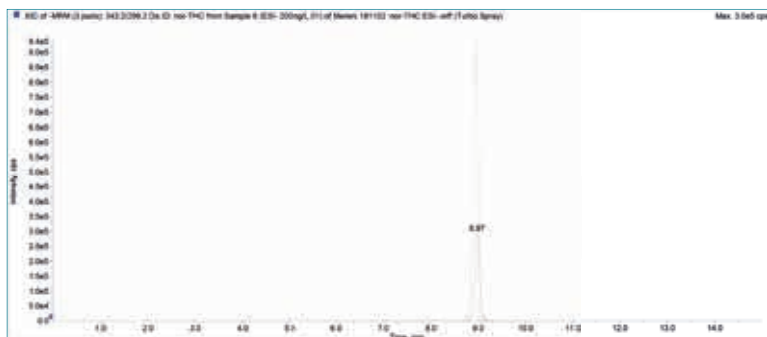
Obr. 5. Ukázka chromatogramu extrahovaných iontů v režimu ESI+ (ethylcathinon, mefedron, 4-methylethcathinon, metylon, nor-mefedron, pentedron, tramadol, trans-3-hydroxykotinin, α-pyrrolidinovalerofenon)

Fig. 5. Example of extracted ion chromatograms in ESI+ (ethylcathinone, mephedrone, 4-methylethcathinone, metylone, nor-mephedrone, pentedrone, tramadol, *trans*-3-hydroxykotinin, α-pyrrolidinovalerofenone)

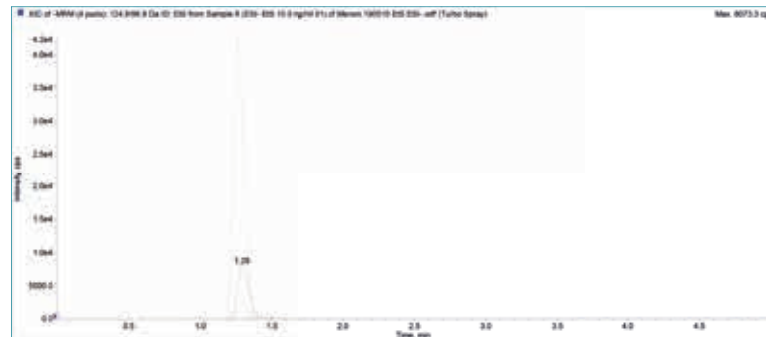
Obr. 6. Ukázka chromatogramu extrahovaných iontů v režimu ESI+ (nikotin, kotinin a trans-3-hydroxykotinin)

Fig. 6. Example of extracted ion chromatograms in ESI+ (nicotine, cotinine and *trans*-3-hydroxycotinine)

reverzní fáze) [31, 32]. K eluci se používá voda s 0,1 % kyselinou mravenčí a acetonitril. Ke zlepšení ionizace se za kolonu přidává acetonitril. V poslední době se vyrábějí inertní kolony s navázaným trifunkčním alkylovým ligandem C18, který podporuje retenci polárních sloučenin a eliminuje potřebu přídavku iontových párů [27, 33, 34]. Jsou to např. kolony: Atlantis T3 nebo Chrompack Inertsil ODS-3 (Varian). Používají se s mobilními fázemi voda s 0,1 % kyselinou mravenčí a acetonitrilem a s post column přídavkem acetonitrilu ke zvýšení ionizace.



Obr. 7. Ukázka chromatogramu extrahovaných iontů v režimu ESI- (nor-THC)
Fig. 7. Example of extracted ion chromatograms in ESI- (nor-THC)



Obr. 8. Ukázka chromatogramu extrahovaných iontů v režimu ESI- (ethylsulfát)
Fig. 8. Example of extracted ion chromatograms in ESI- (ethylsulfate)

Stanovení ethylsulfátu se dá provádět i s HILIC kolonami, např. SeQuant ZIC-HILIC (Merck) a mobilními fázemi 5 mM octan amonný (pH 6,8) a acetonitril [33].

METODIKA

Postupně bylo v závislosti na chemických vlastnostech a možnostech stanovení jednotlivých látek zavedeno stanovení tří desítek látek metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí za podmínek ionizace elektrospřejem v pozitivním a negativním módu. Přehled stanovovaných analytů včetně jejich základní charakteristiky a rozdělení do postupů stanovení je uveden v *tabulce 1*.

Použitá technika: kapalinový chromatograf Agilent 1200 RR s binárním čerpadlem, hmotnostní detektor Applied Biosystem 4000 Q Trap s trojitým kvadrupólem, autosampler Aspec GX-271 (Gilson). Stanovení všech látek bylo prováděno s chromatografickou kolonou Synergi Hydro-RP80A (150 × 2,0 mm, 4 μm).

Multireziduální stanovení této skupiny analytů se nedalo provést vzhledem k jejich odlišným chemickým vlastnostem a koncentračním hladinám jejich výskytu. Z tohoto důvodu bylo stanovení rozděleno do čtyř separátních postupů.

Analýzy byly prováděny v odpadní vodě odebírané v nátoku na čistírnu komunálních odpadních vod. Tato voda je velmi komplexní matrice a jako nezbytné se jeví použití vnitřních standardů. Matrice silně ovlivňuje ionizaci. Bylo pozorováno potlačení ionizace vlivem látek přítomných ve vzorku. Proto bylo pracováno s deuterovanými standardy všech stanovovaných látek.

Pro analýzy se zpracovávají 24hodinové kompozitní vzorky odebírané na nátoku na čistírnu komunálních odpadních vod, které se po odběru uchovávají v chladu a temnu. Pokud nelze vzorek analyzovat do 72 hodin od odběru, vzorek se zmrazí a do vlastní analýzy se skladuje při teplotě -20 ± 4 °C.

Před vlastním stanovením se vzorky odstředí a ze vzorku se odstraní pevné částice filtrací přes jednorázové membránové filtry o porositě 0,45 μm. Po přidavku směsného roztoku vnitřních standardů je vzorek připraven k LC-MS/MS analýze. Před chromatografickou analýzou se vzorky zakonzcentrují z objemu 1–5 ml on-line SPE (drogy, nikotin a jeho metabolity). K on-line prekoncentraci vzorků byl použit autosampler Aspec GX-271 (Gilson) a kolonka Hypersil Gold (20 × 2,1 mm, 12 μm), na kterou bylo 1–5 ml vzorku vloženo průtokem 0,5 ml/min. Potom byla kolonka ještě promyta 1 ml UHQ vody, aby se dokončil transfer vzorku a odstranily některé interference. Eluce analytů na chromatografickou kolonu byla prováděna mobilní fází jejím průtokem koncentrační kolonkou v protisměru v zapojení podle *obr. 1*. Pouze analýza ethylsulfátu se vzhledem k jeho vysokým koncentracím (desítky μg/l) provádí bez prekoncentrace s nástřikem 5 μl vzorku na kolonu.

Všechny používané chemikálie jsou čistoty p. a. nebo vyšší. Pro kalibraci jsou používány certifikované referenční chemikálie, např. fy Merc, Lipomed, Chromservis. Jako vnitřní standardy jsou používány deuterované látky, také certifikované. Podmínky kapalinové chromatografie pro jednotlivé postupy shrnuje *tabulka 2*.

Tabulka 2. Podmínky kapalinové chromatografie
Table 2. Liquide chromatography settings

	ESI+		ESI-	
	Drogy	Nikotin a metabolity	nor-THC	EtS
SPE on-line prekoncentrace	Autosampler GX-271 Aspec		-	
	Hypersil Gold 20 × 2,1 mm, 12 μm		-	
	5 ml vzorku	1 ml vzorku	5 ml vzorku	
Předkolona	Security guard cartridge AQC18 4 × 20 mm			
Analytická kolona	Synergi Hydro – RP80A 150 × 2,00 mm, 4 μm			
Mobilní fáze A	5 mM vodný roztok mravenčanu amonného		0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí	10 mM vodný roztok octanu amonného, pH 7,6
Mobilní fáze B	5 mM roztok mravenčanu amonného v methanolu		0,1 % roztok kyseliny mravenčí v methanolu	ACN : MeOH (1 : 1)
Průtok mobilní fáze	300 μl/min	300 μl/min	300 μl/min	400 μl/min
Nástřik	-	-	-	5 μl

Tabulka 3. Meze stanovitelnosti (LOQ) v matrici odpadní voda
Table 3. Limits of quantification for wastewater

Analyt	Zkratka	LOQ [ng/l]
6-acetylmorfin	6ACM	5,5
amfetamin	AMP	1,1
benzoylecgonin	BE	3,5
buprenorfin	BUP	2,9
diethylamid kyseliny lysergové	LSD	0,9
efedrin	EPH	2,4
ethylcathinon	Eth-cat	3,5
2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3- diphenylpyrrolidin	EDDP	0,7
ethylsulfát	EtS	2,3*
extáze	MDMA	3
fentanyl	FEN	2,8
heroin	HER	2,3
kokaethylen	COE	0,9
kokain	CO	2,5
kotinin	COT	50
mefedron	MMC	2,5
metadon	MET	0,7
metamfetamin	MAMP	0,9
4-methylethcathinon	4-MEC	2,7
metylon	bk-MDMA	2,8
morfin	MOR	4,8
nikotin	NIC	300
nor-diazepam	Nor-DZP	4,3
nor-fentanyl	Nor-FEN	2,8
11-nor-9-karboxy-delta-9-THC	nor-THC	1,3
tramadol	TRAM	3,5
trans-3-hydroxykotinin	T3H-COT	40
α-pyrrolidinovalerofenon	Alfa-PVP	5,5

*µg/l

Identifikace a kvantifikace se ve všech případech provádí za pomoci vyhodnocovacího systému Analyst® Software. Jednotlivé látky se identifikují porovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů a shodnosti poměru intenzit dvou sledovaných přechodů dané látky ve vzorku a v kalibračním roztoku. Kvantifikace se provádí na základě hodnot vypočtených pomocí kalibračních křivek metodou kalibrace na vnitřní standard (deuterovaný standard). Ve stanovovaném rozsahu byly všechny kalibrační křivky lineární (korelační koeficient 0,99 a lepší).

Pro ukázkou jsou na obr. 2–8 uvedeny kalibrační křivky a chromatogramy extrahovaných iontů standardů. Je zobrazen prekurzorový, produktový ion a vnitřní standard.

Meze stanovitelnosti (LOQ) dosažené popsány postupy v matrici odpadní voda jsou uvedeny v tabulce 3.

Podrobněji jsou použité analytické metody pro stanovení nikotinu a jeho metabolitů a ethylsulfátu popsány ve sborníku z konference Hydroanalytika 2019 [36].

Pro skupinu syntetických kationů byly hledány možnosti snížení mezí stanovitelnosti, protože nebyl zaznamenán pozitivní nález těchto látek (s výjimkou dvou hodnot mefedronu těsně na úrovni LOQ, období hodnocení 2018). Zkoušená metodika vycházela z dřívější metodiky off-line SPE vyvinuté v projektu Program IGA 2013 – Projekt „Nové drogy – analýza trhu epidemiologie užívání a identifikace možnosti pro snižování škod“ [37]. Ani při zpracování 500 ml vzorku nebylo dosaženo lepších mezí stanovitelnosti než při on-line SPE metodě [38].

ZÁVĚR

Pro řešení projektu „Čistá voda – zdravé město: Komunální odpadní voda jako diagnostické médium hlavního města Prahy“, ve kterém jsou monitorovány vedle nezákonných drog a jejich metabolitů (včetně syntetických kationů) také některá léčiva a další legální drogy, jako jsou ethanol a nikotin, resp. jejich metabolity, byly vypracovány a zvalidovány postupy pro stanovení těchto látek. V závislosti na chemických vlastnostech a možnostech stanovení jednotlivých látek byly o tyto látky rozšířeny již dříve používané metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí za podmínek ionizace elektrosprejem v pozitivním módu a v negativním módu. Metody byly akreditovány. Celkem jsou uvedenými metodami stanovovány tři desítky látek. Metody rozvinuté ve VÚV TGM, v. v. i., splňují požadavky na citlivost pro analýzu většiny zneužívaných drog a jejich metabolitů i dalších látek sledovaných v rámci Projektu.

Literatura

- [1] DAUGHTON, C.D. Illicit Drugs in Municipal Sewage: Proposed New Noninvasive Tool to Heighten Public Awareness of Societal Use of Illicit/Abused Drugs and Their Potential for Ecological Consequences, in *Pharmaceutical and Personal Care Products in The Environment: Scientific and Regulatory Issues*, American Chemical Society: Washington, D.C., 2001, p. 348–364.
- [2] ZUCCATO, E. et al Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Health Global Access Sci. Source*, 2005, 4, p. 14–20.
- [3] VAN NUIJS, A., MOUGEL, J.F., TARCOMNICU, I., et al. Sewage epidemiology: a real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environment International*, 2011, 27, p. 612–621.
- [4] CASTIGLIONI, S., THOMAS, K.V., KASPRZYK-HORDERN, B., VANDAM, L., and GRIFFITHS, P. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Science of the Total Environment*, 2014, 487, p. 613–620.
- [5] BEEN, F., BIJLSMA, L., BENAGLIA, L., et al. Assessing geographical differences in illicit drug consumption: A comparison of results from epidemiological and wastewater data in Germany and Switzerland. *Drug and Alcohol Dependence*, 2016, 161, p. 189–199.
- [6] DU, P. Methamphetamine and ketamine use in major Chinese cities, a nationwide reconnaissance through sewage-based epidemiology. *Water Research*, 2015, Vol. 84, p. 76–84.
- [7] OČENÁŠKOVÁ, V. Využití epidemiologie odpadních vod pro sledování spotřeby nelegálních drog a dalších látek v českém a mezinárodním kontextu. *VTEI*, 2016, roč. 58, č. 6, s. 27–30.
- [8] OČENÁŠKOVÁ, V. a kol. *Metodika aplikace epidemiologie odpadních vod pro stanovení odnosů nezákonných látek (drog) v České republice*. Certifikovalo České ekologické manažerské centrum, 28. pluku 524/25, 101 00 Praha 10. Certifikováno 29. 12. 2015.
- [9] LOPES, A., SILVA, N., BRONZE, M.R., FERREIRA, J., and MORAIS, J. Analysis of cocaine and nicotine metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Cross abuse index patterns on a major community. *Science of the Total Environment*, 2014, 487, p. 673–680.
- [10] ORT, CH., ALEXANDER, L.N., VAN NUIJS, A.L.N., BERSET, J.D., LUBERTUS BIJLSM, L., CASTIGLIONI, S., COVACI, A., et al. Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis. *Addiction*, 2019, p. 1338–1352.

- [11] CASTIGLIONI, S., SENTA, I., BORSOTTI, A., DAVOLI, E., and ZUCCATO, E. A novel approach for monitoring tobacco use in local communities by wastewater analysis. *Tob. Control*, 2015, 24, p. 38–42.
- [12] RICO, M., ANDRÉS-COSTA, M.J., and PICÓ, Y. Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 323.
- [13] MASTROIANNI, N., LOPEZ DE ALDA, M., and BARCELO, D. Analysis of ethyl sulfate in raw wastewater for estimation of alcohol consumption and its correlation with drugs of abuse in the city of Barcelona. *Journal of Chromatography*, 2014, 1360, p. 93–99.
- [14] REID, M.J., LANGFORD, K.H., MØRLAND, J., and THOMAS, K.V. Analysis and Interpretation of Specific Ethanol Metabolites, Ethyl Sulfate, and Ethyl Glucuronide in Sewage Effluent for the Quantitative Measurement of Regional Alcohol Consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2011, Vol. 35, No. 9, p. 1593–1599.
- [15] KINYUA, J., COVACI, A., MAHO, W., et al. Sewage-based epidemiology in monitoring the use of new psychoactive substances: Validation and application of an analytical method using LC-MS/MS. *Drug Test. Analysis*, 2015, 7, p. 812–818.
- [16] VAN NUIJS, A.L.N., GHEORGE, A., JORENS, P.G., MAUDENS, K., NEELS, H., and COVACI, A. Optimization, validation, and the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of new drugs of abuse in wastewater. *Drug Test. Analysis*, 2014, 6, p. 861–867.
- [17] CASTIGLIONI, S. Assessing illicit drugs in wastewater: Advances in wastewater-based drug epidemiology publication of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. EMCDDA, 2016.
- [18] JONES, J. SPE-LC-MS/MS Method for the Determination of Nicotine, Cotinine, and Trans-3-hydroxycotinine in Urine, appl. Note 20709. Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK.
- [19] HUERTA-FONTELA, M., GARCELAN, M.T., and VENTURA, F. Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. *Anal. Chem.*, 2007, 79, p. 3821–9.
- [20] BUENO, M.J., UDES, S., and HERNANDO, M.D. Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Wat. Res.*, 2011, 45, p. 2331–41.
- [21] BAZ-LOMBA, J.A., SALVATORE, S., GRACIA-LOR, E., et al. Comparison of pharmaceutical, illicit drug, alcohol, nicotine and caffeine levels in wastewater with sale, seizure and consumption data for 8 European cities. *BMC Public Health*, 2016, 16, p. 1035.
- [22] HERNANDEZ, F., CASTIGLIONI, S., COVACI, A., et al. Mass spectrometric strategies for the investigation of biomarkers of illicit drug use in wastewater. *Mass Spectrometry Reviews*, 2016 by Wiley Periodicals. DOI 10.1002/mas.
- [23] FEDOROVA, G., RANDAK, T., LINDBERG, R.H., and GRABIC, R. Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013, 27, p. 1751–1762.
- [24] MACKULAK, T., GRABIC, R., GÁL, M., and BIROŠOVÁ, L. Evaluation of different smoking habits during music festivals through wastewater analysis. *Environ. Toxicol. and Pharmacology*, 2015, 40, p. 1015–1020.
- [25] MACKULAK, T., BIROŠOVÁ, L., GRABIC, R., and ŠKUBÁK, J. National monitoring of nicotine use in Czech and Slovak Republic based on wastewater analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2015, DOI: 10.1007/s11356-015-4647-7.
- [26] SENTA, I., GRACIA-LOR, E., BORSOTTI, A., and ZUCCATO, E. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water research*, 2015, 7, 4, p. 23–33.
- [27] TSCHARKE, B.J., WHITE, J.M., and GERBER, J.P. Estimate of tobacco use by wastewater analysis of anabasine and anatabine. *Drug Test Anal.*, 2016, Jul 8(7), p. 702–707.
- [28] WANG, D.G., DONG, Q.Q., DU, J., et al. Using Monte Carlo simulation to assess variability and uncertainty of tobacco consumption in a city by sewage epidemiology. *BMJ Open* 2016, 6:e010583. doi:10.1136/bmjopen-2015-010583.
- [29] RYU, Y., BARCELÓ, D., BARRONE, L.P., et al. Comparative measurement and quantitative risk assessment of alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: An international study in 20 cities. *Science of the Total Environment*, 565, 2016, p. 977–983.
- [30] BOOGAERTS, T., COVACI, A., KINYUA, J., NEELS, H., and VAN NUIJS, L.N. Spatial and temporal trends in alcohol consumption in Belgian cities: A wastewater-based approach. *Drug and Alcohol Dependence*, 2016, 160, p. 170–176.
- [31] DRESEN, S., WEINMANN, W., and WURST, F.M. Forensic Confirmatory Analysis of Ethyl Sulfate – A New Marker for Alcohol Consumption – by Liquid-Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, 2004. Published by Elsevier Inc. 1044-0305/04, DOI: 10.1016/j.jasms.2004.08.004.
- [32] ALBERMANN, M.E., MUSSHOF, F., and MADEA, B. A High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for the Determination of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Urine Validated According to Forensic Guidelines. *J. Chromatogr. Sci.*, 2012, Jan, 50(1), p. 51–56.
- [33] AL-ASMARI, A.I., ANDERSON, R.A., and APPELBLAD, P. Direct Determination of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Postmortem Urine Specimens Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Tox.*, 2010, 34, p. 261–272.
- [34] POLITI, L., MORINI, L., GROPPA, A., et al. Direct Determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, 19, p. 1321–1331.
- [35] LI, S., LAYNE, J., COUNTRYMAN, S., et al. A Sensitive, Specific, Accurate, and Fast LC-MS-MS Method for Measurement of 42 Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Human Urine. *LCGC North America*, Jul 01, 2011, Vol. 29, Issue 7.
- [36] POSPÍCHALOVÁ, D., MAREŠOVÁ, D., ŠAFRÁNKOVÁ, T. a OČENÁŠKOVÁ, V. Metody stanovení nikotinu a jeho metabolitů a ethylsulfátu v odpadní vodě. In: SÝKORA, V. a KULAJOVÁ, H. *Sborník 8. konference Hydroanalytika 2019*. Praha, 2019, s. 61–67. ISBN 978-80-904986-4-8.
- [37] KVÍČALOVÁ, M. a POSPÍCHALOVÁ, D. *Nové psychoaktivní látky v České republice: výskyt, rizika a související opatření*. Klinika adiktologie 1. LF UK v Praze a VFN v Praze, 2015.
- [38] BOHADLOVÁ, E., OČENÁŠKOVÁ, V., ŠAFRÁNKOVÁ, T. a JANDA, V. Optimalizace metody stanovení vybraných syntetických drog v komunálních odpadních vodách. In: SÝKORA, V. a KULAJOVÁ, H. *Sborník 8. konference Hydroanalytika 2019*. Praha, 2019, s. 45–47. ISBN 978-80-904986-4-8.

Autoři

Ing. Danica Pospíchalová

✉ danica.pospichalova@vuv.cz

RNDr. Diana Marešová, Ph.D.

✉ diana.maresova@vuv.cz

Ing. Věra Očenášková

✉ vera.ocenaskova@vuv.cz

Bc. Tereza Šafránková

✉ tereza.safrankova@vuv.cz

Ing. Eva Bohadlová

✉ eva.bohadlova@vuv.cz

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i.

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DETERMINATION OF SELECTED ILLICIT DRUGS IN WASTEWATER USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

POSPICHALOVA, D.; MARESOVA, D.; OCENASKOVA, V.; SAFRANKOVA, T.; BOHADLOVA, E.

TGM Water Research Institute, p.r.i.

Keywords: wastewater — illicit drugs — nicotine — nicotine metabolites — alcohol — ethylsulfate

The wastewater-based epidemiology approach to the analysis of illicit drugs was conceptualized in 2001 and for the first time was applied in 2005 for cocaine estimation in Italy. Further, other illicit drugs as heroine, cannabis and amphetamine have been estimated. Illicit drugs have been measured in TGM Water Research Institute, p.r.i., since 2012. This paper describes analytical possibilities of determination of illicit drugs in wastewater and method evaluated in TGM Water Research Institute, p.r.i., focusing on nicotine and its metabolites and ethylsulfate, the analytes, what were implemented during the project within the Concept IV.