

Analiza otpadne vode u svrhu motrenja uporabe droga

Belavić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:474435>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marko Belavić
0058217092**

**ANALIZA OTPADNE VODE U SVRHU MOTRENJA
UPORABE DROGA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija u zaštiti okoliša

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Analiza otpadne vode u svrhu motrenja uporabe droga

Marko Belavić, 0058217092

Sažetak:

Nezakonita upotreba droga je dugi niz godina veliki problem koji zahvaća gotovo cijeli svijet. Analizom otpadne vode moguće je dobiti vrijedne informacije o upotrebi droga u svijetu, što uvelike pomaže pri suzbijanju ilegalnog korištenja droga i njenog tržišta.

U tu svrhu koristi se relativno nova znanstvena disciplina, „epidemiologija temeljena na otpadnim vodama“ (WBE, engl. *Wastewater Based Epidemiology*), koja daje kvantitativnu i kvalitativnu analizu upotrebe različitih vrsta droga u točno određenim područjima i u točno željenom vremenskom periodu kao i praćenje promjenjivih trendova s obzirom na vrste korištenih opijata i još puno vrijednih informacija za motrenje i suzbijanje tržišta droge.

Povezivanjem podataka dobivenih analizom otpadnih voda s podacima tradicionalnih metoda za praćenje konzumacije droga te podacima dostupnim iz policijskih i zdravstvenih izvora, moguće je dobiti vjerodostojniju sliku globalnog problema s drogom.

Ključne riječi: otpadna voda, WBE analiza, upotreba droge, metaboliti droga u urinu

Rad sadrži: 27 stranica, 4 slike, 3 tablice, 41 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Datum obrane: 7. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of food technology engineering
Laboratory for the Biological Waste Water Treatment

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Wastewater analysis for the purpose of monitoring the drugs use
Marko Belavić, 0058217092

Abstract:

Illegal use of drugs has been a major problem affecting almost the entire world for many years. By analyzing wastewater, it is possible to obtain valuable information about the use of drugs in the world, which greatly helps in suppressing the illegal use of drugs and its market.

For this purpose, a relatively new scientific discipline is used, "Wastewater Based Epidemiology" (WBE), which provides a quantitative and qualitative analysis of the use of different types of drugs in precisely defined areas and in a precisely desired period of time, as well as the monitoring of changing trends regarding the types of opiates used and a lot of other valuable information for monitoring and suppressing the drug market.

By linking data obtained from wastewater analysis with data from traditional methods for monitoring drug consumption and data available from police and health sources, it is possible to obtain a more credible state of the global drug problem.

Keywords: wastewater, WBE analysis, drug use, urinary metabolites

Thesis contains: 27 pages, 4 figures, 3 tables, 41 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Tibela Landeka Dragičević, PhD, Full Professor

Thesis defended: September 7, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. SUZBIJANJE ZLOUPORABE DROGA	2
2.2. EPIDEMIOLOGIJA TEMELJENA NA OTPADNIM VODAMA.....	5
2.2.1. POVIJEST PRIMJENE WBE	5
2.2.2. PREDNOSTI PRIMJENE WBE PRED TRADICIONALNIM METODAMA NADZIRANJA UPOTREBE NARKOTIKA	6
2.2.3. NEDOSTACI PRIMJENE WBE PRED TRADICIONALNIM METODAMA NADZIRANJA UPOTREBE NARKOTIKA.....	6
2.2.4. PRINCIP RADA WBE.....	7
2.3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O PRIMJENI WBE TEHNOLOGIJE	12
2.3.1. POTROŠNJA DROGE U R. HRVATSKOJ I OSTALIM ČLANICAMA EU	14
2.4. OGRANIČENJA I PROBLEMI ANALIZE OTPADNIH VODA U SVRHU MOTRENJA ZLOUPORABE/KONZUMIRANJA DROGA – IZAZOVI ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA.....	18
3. ZAKLJUČCI.....	22
4. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (EMCDDA, engl. *The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) i Ured Ujedinjenih naroda za droge i kriminal (UNODC, engl. *The United Nations Office On Drugs and Crime*) izvijestili su da problemi povezani s uporabom droga postaju sve složeniji, posebice s obzirom na iznimno dinamičnu prirodu tržišta novih psihoaktivnih tvari, stimulansa, zlouporabu lijekova i problematičnu uporabu kanabisa (EMCDDA i Europol, 2019; EMCDDA, 2018; UNODC, 2017; EMCDDA, 2016; UNODC, 2015).

Nezakonita upotreba droga već je dugi niz godina veliki problem koji zahvaća gotovo cijeli svijet, a koji dovodi do razvoja niza zdravstvenih i društvenih problema s kojima se susreću brojni pojedinci ali i cijele zajednice.

Zbog ekoloških i forenzičkih pitanja u uzorcima kanalizacije i dalje je potrebna provjera prisutnosti tradicionalnih ilegalnih droga (amfetamina, metamfetamina, ecstasija i dr.) (Sulej-Suchomska, 2020; Yadav i sur., 2017). U tu svrhu koristi se relativno nova znanstvena disciplina, „epidemiologija temeljena na otpadnim vodama“ (WBE, engl. *Wastewater Based Epidemiology*), u kojoj interdisciplinarni rad kemičara, biologa, toksikologa i statističara, kao i dobra spoznaja o metabolizmu droga i njihovom izlučivanju putem mokraće omogućuju puno precizniji i objektivniji pristup motrenju uporabe droga (Van Haal, 2019). Ova znanstvena disciplina pruža kvantitativnu i kvalitativnu analizu upotrebe različitih vrsta droga, omogućuje praćenje njihove konzumacije u točno određenim područjima i u točno željenom vremenskom periodu, praćenje promjenjivih trendova s obzirom na vrste korištenih opijata i još puno vrijednih informacija za motrenje i suzbijanje tržišta droge (Choi i sur., 2018).

Cilj ovog rada je istaknuti spoznaje o analizi otpadne vode u svrhu praćenja upotrebe droga, obrazložiti koje su prednosti a koji nedostaci ovakve vrste analize te na koji način bi se ista mogla unaprijediti u budućnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SUZBIJANJE ZLOUPORABE DROGA

U Zakonu o suzbijanju zlouporabe droga u Članku 1.a (NN 39/19) istaknuto je: “Ovim Zakonom u hrvatsko zakonodavstvo preuzima se Direktiva (EU) 2017/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. studenoga 2017. u izmjeni Okvirne odluke Vijeća 2004/757/PUP kako bi se nove psihoaktivne tvari obuhvatile definicijom “droge” te o stavljanju izvan snage Odluke Vijeća 2005/387/PUP (SL L 305, 21.11.2017.)”.

Značenje pojedinih pojmova opisano je u Članku 2. Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (NN 39/19), tako je istaknuto pod 1. “*Droga* je tvar koja je obuhvaćena jedinstvenom konvencijom Ujedinjenih naroda o opojnim drogama iz 1961., kako je izmjenjena Protokolom iz 1972., ili Konvencijom Ujedinjenih naroda o psihotropnim tvarima iz 1971. i svaka tvar prirodnog ili umjetnog podrijetla, uključivši psihotropne tvari uvrštene u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga”.

Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (EMCDDA, engl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) usvojio je multi-indikatorski pristup praćenju droga a analiza otpadnih voda je vrijedan aspekt epidemiološkog praćenja droga i daje pravovremene informacije o širokom spektru tvari (EMCDDA i Europol, 2019; EMCDDA, 2018; UNODC, 2017; EMCDDA, 2016; UNODC, 2015).

Analiza otpadnih voda predstavlja metodologiju za procjenu potrošnje/konzumacije droga u stvarnom vremenu, provođenjem uzorkovanja otpadnih voda iz kojih se mjere razine ilegalnih droga i njihovih metabolita izlučenih u urinu, provođenjem analitičkog određivanja koncentracija u uzorcima reprezentativnim za definiranu populaciju te u stvarnom vremenu daje podatke o zemljopisnim i vremenskim trendovima konzumacije ilegalnih droga. Na temelju analize reprezentativnog uzorka otpadne vode mogu se pratiti promjene u trendovima potrošnje droga unutar populacije priključene na taj uređaj.

Vremenski period potreban da se spomenute supstance pojave u mokraći nakon upotrebe narkotika relativno je kratak, a najviše ovisi o načinu unosa droge u organizam. Apsorpcija i izlučivanje bit će brži ukoliko se droga unosi intravenoznim putem ili pušenjem. S druge strane, ukoliko se unosi oralnim putem, do trenutka njenog izlučivanja u urinu može proći i nekoliko sati (Dolan i sur., 2004).

Nakon što se ciljani metabolit prvi put pojavio u urinu, njegova detekcija bit će moguća još određeni vremenski period nakon čega prestaje, osim ako nije došlo do ponovnog

konzumiranja droge.

U Hrvatskoj enciklopediji (2021) pod pojmom narkotici istaknuto je: «Narkotici (prema grč. *ναρκωτικός*: koji otupljuje) su sredstva za omamljivanje, uspavljivanje i umanjivanje boli. Prema novijem shvaćanju, narkotici se povezuju samo s opojnim drogama, supstancijama prirodnog ili sintetskoga podrijetla poput narkotičkih analgetika: opijum, morfin, kodein, heroin, metadon, te opioida – nemorfinski i endogeni analgetici poput endorfina, encefalina i dimorfina. Narkotici djeluju na središnji živčani sustav, a prilikom njihovog konzumiranja javlja se osjećaj ugone i omamljivanja kao i nastanak različitih emocionalnih stanja. Primjenjivati se mogu oralnim putem, intravenozno, pušenjem ili ušmrkavanjem. Njihovom višekratnom primjenom javlja se psihička i fizička ovisnost».

Pri otrovanju narkotičkim analgeticima primjenjuju se antagonisti morfina: nalokson, levolorfan, nalorfin (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Narkotici se prema djelovanju svrstavaju u tri skupine (Hrvatska enciklopedija, 2021):

- (i) prva skupina – sredstva opasna po zdravlje ljudi koja se ne primjenjuju u medicini: heroin, meskalin, psilocibin, kanabis, LSD, crack, ecstasy i dr.
- (ii) druga skupina – sredstva koja su opasna po zdravlje ljudi, a primjenjuju se u medicini: kokain, metadon, morfin, kodein, amfetamin, metamfetamin, metakvalon, fen ciklidin i dr.
- (iii) treća skupina – sredstva koja mogu ugroziti zdravlje ljudi, a primjenjuju se u medicini: diazepam, lorazepam, meprobamat, medazepam, bromozepam, midazolam, prazepam, oksazepam, anabolički steroidi i dr..

Nakon unosa narkotika u organizam dolazi do niza metaboličkih reakcija nakon čega se u prvotnom (roditeljskom) ili u točno određenom metaboličkom obliku izlučuju iz organizma (Van Nuijs i sur., 2011).

Vrijeme otkrivanja metabolita u urinu, osim o preciznosti korištene analitičke metode, ovisi o karakteristikama konzumiranih droga i o osobinama konzumenta. Karakteristike droga podrazumijevaju vrstu metabolita koji nastaju njihovom razgradnjom, kemijske reakcije u kojima sudjeluju, količine doza droga koje se unose u organizam i vremenske intervale između unosa tih doza, stalnu ili povremenu upotrebu i vrijeme posljednje primjene. Što se tiče konzumenta, bitan utjecaj ima njegova tjelesna masa, pH urina, eventualna oštećenja bubrega ili jetara te osobine samog metabolizma.

Tako primjerice, povećanje količine unesene droge i učestalosti primjene rezultirat će produljenjem vremena u kojem je moguće detektirati prisutnost i količinu te droge u urinu.

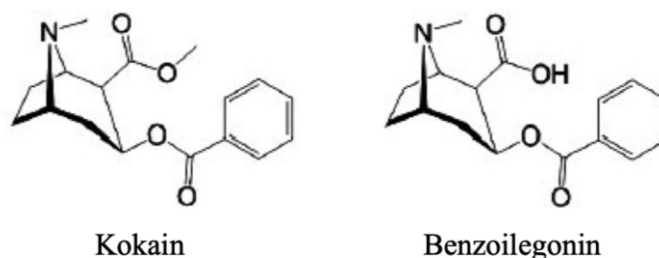
Primjerice, 11-nor-9-karboksi-delta-9-tetrahidrokanabinol (THC-COOH), koji se može u urinu detektirati u vremenskom razdoblju od 2 do 4 dana nakon pušenja jedne cigarete marihuane, dok češćim pušenjem može biti otkriven i do mjesec dana nakon zadnjeg pušenja, a u iznimnim slučajevima i do tri mjeseca (Vandevenne i sur., 2000; Moeller i sur., 2017).

Primjeri nekih vrsta droga i moguće vrijeme njihovog otkrivanja analizom urina prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Vremenski periodi u kojima je moguća detekcija nekih vrsta droga, analizom urina (prema Moeller i sur., 2008)

Droga	Vrijeme moguće detekciju u urinu
Amfetamin	48 h
Metamfetamin	48 h
Metaboliti kokaina	2-4 d
Marihuana	
Jedna upotreba	3 d
Umjerena upotreba (4 puta tjedno)	5-7 d
Upotreba na dnevnoj bazi	10-15 d
Dugogodišnji teški pušač	>30 d
Kodein	48 h
Heroin (morfij)	48 h
Metadon	3 d
Morfij	48-72 h

Strukturna formula kokaina te strukturna formula jednog od njegovih metabolita, benzoilegonina, koji nastaje nakon konzumiranja kokaina a koji se urinom izlučuje iz ljudskog organizma, prikazana je slikom 1.



Slika 1. Strukturna formula kokaina i njegovog metaboličkog produkta – benzoilegonina (prema Bravo i sur., 2012)

2.2. EPIDEMIOLOGIJA TEMELJENA NA OTPADNIM VODAMA

Epidemiologija temeljena na otpadnim vodama (WBE, engl. *Wastewater Based Epidemiology*) relativno je mlada znanstvena disciplina koja bilježi brz razvoj i širenje područja primjene. Temelji se na činjenici da sve tvari koje čovjek unese u organizam prolaze razne metaboličke reakcije i konačno izlaze iz organizma u svom prvotnom obliku ili u nekom drugom, metaboličkom obliku specifičnom za konzumiranu tvar. Nakon toga, putem urina te tvari odlaze u kanalizacijski sustav te dolaze do sustava za obradu otpadnih voda. Ondje se sustavno uzimaju uzorci otpadne vode te analiziraju kemijskim metodama na prisutnost i količinu ciljanih spojeva (Van Hal, 2019).

2.2.1. Povijest primjene WBE

WBE tehnologija prvotno je služila za nadziranje i praćenje onečišćenja okoliša tekućim otpadom iz kućanstva (Mercan i sur., 2019). Daughton (2001) je prvi opisao ideju o uzorku neobrađene otpadne vode s nekog područja kao visoko razrijeđenom uzorku urina populacije koja ondje živi (Kankaanpaa i sur., 2016). Također, konstatirao je kako bi se analizom tog uzorka mogle dobiti informacije o potrošnji određenih tvari u toj populaciji. Ova ideja je prvi puta ostvarena 2005. godine kada je Zuccato analizom otpadnih voda uspješno identificirao i kvantificirao potrošnju kokaina u jednoj zajednici.

U početku su se ovakve analize provodile s ciljem otkrivanja nezakonite upotrebe droga, dok se kasnije spektar istraživanja proširio i na konzumaciju alkohola, duhana, psihoaktivnih tvari ali i na dobivanje podataka o izloženosti ljudi pesticidima, tvarima s hormonskim djelovanjem, UV filterima, mikotoksinima i drugim spojevima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje (Sims i Kasprzyk-Hordern, 2020).

Ključan čimbenik u priznavanju i razvoju WBE tehnologije bilo je zanimanje i podrška EMCDDA-a (Kankaanpaa i sur., 2016). EMCDDA je 2007. godine predložila ovu disciplinu kao nadopunu i nadogradnju dotad uobičajenim epidemiološkim disciplinama. U godinama koje su slijedile osnovano je nekoliko organizacija koje su provodile istraživanja i težile razvoju i standardizaciji pojedinih koraka same tehnologije, od uzorkovanja i čuvanja uzoraka do njihove analize i potrebnih proračuna.

Tako je 2018. godine pomoću WBE tehnologije uspješno provedeno istraživanje o nezakonitoj upotrebi droga u čak 73 grada iz 20 država širom svijeta, a rezultati istraživanja su se mogli precizno uspoređivati. Razvojem tehnologije raste i broj vrsta narkotika koje je moguće

identificirati i kvantificirati, no nasuprot tome raste i broj novih droga na tržištu zbog čega se ova disciplina stalno susreće s novim izazovima (Mercan i sur., 2019).

2.2.2. Prednosti primjene WBE pred tradicionalnim metodama nadziranja upotrebe droga

Tradicionalne metode nadziranja i praćenja upotrebe droga obuhvaćaju uglavnom provođenje anketa i intervjua među građanstvom, i kao takve mogu biti vrlo neprecizne i netočne. Također, kod njih se ne može isključiti mogućnost pristranosti i subjektivnosti provoditelja same metode kao niti neiskrenost ispitanika ili pak njihovo neznanje o stvarnoj prirodi droga koje konzumiraju. Uz to, provođenje ovakvih metoda može biti i vrlo skupo, vremenski neisplativo ali i neprikladno za samo tržište droga koje se ponekad vremenski vrlo brzo mijenja.

S druge strane, WBE tehnologija direktnim analitičkim mjerenjima daje precizne i objektivne rezultate u vrlo kratkom vremenskom roku. Zbog brzine izvođenja korisna je i za praćenje mijenjajućih trendova potrošnje droga. Njenim provođenjem moguće je dobiti informacije o korištenju opijata na različitim razinama, tj. u gradovima, određenim regijama ili pak cijelim državama, i to tijekom kraćeg ili duljeg vremenskog perioda. Također je korisna za brzu identifikaciju novodizajniranih droga koje se nalaze na tržištu (Sulej-Suchomska, 2020).

2.2.3. Nedostaci primjene WBE pred tradicionalnim metodama nadziranja upotrebe droga

Glavni problem s kojim se susreću analitičari tijekom korištenja WBE tehnologije je dostupnost standardnih referentnih materijala koji se koriste u analizi a čije su količine uglavnom jako ograničene. Nadalje, koncentracija brojnih analita koje je potrebno detektirati često je vrlo niska, a moguća je i pojava pojedinih komponenti koje imaju slična fizikalno-kemijska svojstva kao željeni analit pa na taj način otežavaju analizu. Još jedan od problema je taj što su veličine sustava za obradu otpadnih voda različite pa je za svaki sustav potrebno najprije provesti standardizaciju mjerenja.

Čimbenik od iznimne važnosti je odabir prikladnog biomarkera o kojem uvelike ovisi ispravna detekcija željenog spoja, njegova identifikacija i kvantifikacija (Sulej-Suchomska, 2020).

Valja istaknuti kako WBE metoda, za razliku od tradicionalnih metoda, ne daje nikakvu informaciju o spolu, dobi ili socio-ekonomskom statusu konzumenata droga (Baz-Lomba i sur, 2016). Isto tako, ovom metodom ne može se saznati ništa o broju konzumenata i njihovoj

rasprostranjenosti kao niti o učestalosti upotrebe i čistoći droge (EMCDDA, 2022a).

2.2.4. Princip rada WBE

Djelovanje WBE tehnologije temelji se na činjenici da ljudski organizam nakon unosa neke tvari u organizam, tu tvar apsorbira, metabolizira i izlučuje van organizma. Tako, unesena tvar u organizam, putem urina u prvotnom obliku ili obliku metabolita dopijeva u kanalizaciju i na sustav za obradu otpadnih voda.

U WBE analizi prvi korak je prikupljanje uzoraka otpadne vode. Uzorak mora biti reprezentativan, te je pravilno provođenje uzorkovanja od velike važnosti. Uzorci se moraju uzimati na mjestu dotoka otpadne vode u sustav za obradu pri čemu je obvezatno korištenje mjerača protoka otpadne vode (Van Hal, 2019).

Uzorkovanje je moguće provoditi pomoću različitih metoda, a tri osnovne metode su:

- (i) kompozitno uzorkovanje,
- (ii) pasivno uzorkovanje, i
- (iii) trenutno uzorkovanje

Kompozitno uzorkovanje temelji se na prikupljanju više uzoraka koji se kasnije objedinjuju u jedan, integrirani uzorak. Uzorci se prikupljaju u točno određenim vremenskim intervalima tijekom definiranog vremenskog razdoblja (najčešće tijekom 24 sata). Ovakvo uzorkovanje može i ne mora biti automatizirano. U slučaju da je uređaj za uzorkovanje automatiziran, postoji mogućnost da u njega bude ugrađen sustav hlađenja, kao i vlastiti mjerači protoka i senzori za prikupljanje dodatnih podataka (pr. podaci o količini otopljenog kisika, električnoj vodljivosti itd.). Međutim, upotreba ovakvih automatiziranih uređaja ima i određena ograničenja. Tijekom njihovog rada potrebno je osigurati stalan protok otpadne vode kako bi mjerenje uopće bilo moguće (ECCC, 2021). Osim toga, uređaji su skupi te zahtijevaju redoviti nadzor i održavanje. Također, pri utvrđivanju određenih trendova u korištenju droga, potrebno je procese uzorkovanja provoditi više puta godišnje (Verhagen i sur., 2020).

Pasivno uzorkovanje temelji se na korištenju određenog materijala (apsorbensa) koji je uronjen u kontinuirani protok otpadne vode i koji na sebe apsorbira ciljane molekule. Ova metoda pogodna je za praćenje sastava otpadnih voda tijekom određenog vremenskog razdoblja. Za razliku od kompozitnih uređaja, uređaji koji se koriste u radu ove metode mogu se primijeniti i na mjestima gdje je protok povremen. Međutim, visoki protoci mogu loše utjecati na njihovu učinkovitost. Učinkovitost ove metode također može biti narušena ukoliko dođe do zasićenja apsorbensa (ECCC, 2021). Ukoliko se koriste uređaji za pasivno uzorkovanje, potrebno je

dobro poznavati svojstva ciljanih tvari kako bi se mogla predvidjeti njihova apsorpcija na korišteni materijal. Idealan uređaj za ovakvu vrstu uzorkovanja sadrži i membranu (pr. od polietilena) koja odvaja materijal na koji se čestice apsorbiraju od otpadne vode (Verhagen i sur., 2020). Pasivno je uzorkovanje u usporedbi s kompozitnim puno jednostavniji i ekonomičniji način prikupljanja uzoraka i dat će preciznije rezultate u slučaju brzih izmjena koncentracije analiziranih spojeva (Hahn i sur., 2021).

Trenutno uzorkovanje podrazumijeva prikupljanje uzorka u jednom trenutku. Ova metoda izvršava se ručno, ne zahtijeva nikakvu automatiziranu opremu. Uzorci prikupljeni na ovakav način omogućuju podatke o koncentracijama ciljanih spojeva u otpadnim vodama koji su svojstveni samo za trenutak u kojem je uzorak uzet. Iako se ova metoda smatra najlošijom, u nekim slučajevima može biti jedina ostvariva (primjerice kada se zbog nedostatka električne energije u nekom mjestu automatsko uzorkovanje ne može primijeniti). Isto tako, ova tehnika je potpuno odgovarajuća u pojedinim slučajevima kao što je na primjer istraživanje u kojem je potrebno ispitati razlike u sastavu otpadnih voda tijekom određenog vremenskog razdoblja (ECCC, 2021).

Nakon pravilno provedenog uzorkovanja slijedi analiza uzorka. Ukoliko je uzorak potrebno transportirati na drugu lokaciju radi analize, uzorci se smrzavaju i u posebnim komorama prevoze na željenu lokaciju. Smrzavanje se vrši kako bi se sačuvali urinarni metaboliti, odnosno kako bi se spriječio njihov raspad (Baz-Lomba i sur., 2016).

Cilj analize uzoraka je identifikacija i kvantifikacija traženih spojeva. Kako bi se to moglo ostvariti, prvi problem kojeg je potrebno riješiti je mala koncentracija promatranih analita (ng/L). Stoga je potrebno najprije provesti predobradu uzorka provođenjem neke od kemijskih metoda, primjerice ekstrakcije čvrste faze. Nakon provedene predobrade moguće je provesti konačnu analizu.

Identifikacija i kvantifikacija provode se nekom od analitičkih tehnika, pr. tekućinskom kromatografijom u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Mercan i sur., 2019). Kako bi se mjerenje izvelo što preciznije, česta praksa analitičara tijekom ovakve analize je korištenje metode unutarnjeg standarda. Ta metoda se temelji na dodatku internog standarda u uzorak, slijepu probu i u sve standardne uzorke poznatih koncentracija analita. Taj dodatak se vrši odmah na početku postupka, odnosno prije ekstrakcije (LGC, 2019). Pri tome koncentracija internog standarda mora biti poznata i konstantna. Nakon spektrometrijske analize standardnih otopina konstruira se kalibracijski pravac pri čemu se u odnos stavljaju omjer signala analita i unutarnjeg standarda s jedne, te koncentracija analita s druge strane. Pomoću konstruiranog

pravca i vrijednosti omjera signala analit/unutarnji standard iz istraživnog uzorka, može se odrediti koncentracija analita u tom uzorku.

Iznimno je važno da su interni standardi stabilni i da ni na koji način međusobno ne djeluju s ostalim sastavnicama uzorka. Unutarnji standard je tvar koja mora biti strukturno slična analitu, pa se u tu svrhu koriste strukturni homolozi analita ili izotopno označeni stabilni derivati (Bogić, 2018). Takvi izotopno označeni unutarnji standardi (ILIS, engl. *Isotopically Labelled Internal Standard*) uglavnom se koriste u WBE analizama, a najčešće se dobivaju zamjenom atoma ^1H s ^2H , ^{12}C s ^{13}C i N^{14} s N^{15} . Oni se od analita razlikuju samo po broju neutrona u jezgri, prema molekulskoj masi, dok su im kemijska svojstva ista. Upravo zbog razlike u molekulskoj masi dolazi do različitog vremena zadržavanja analita i ILIS-a u kromatografskoj koloni, na temelju čega je i moguće razlikovati njihove pikove (LGC, 2019). Primjeri ILIS-a koji se koriste tijekom analize određenih narkotika u otpadnim vodama su: AMP-d6 za amfetamin, METH-d5 za metamfetamin, MDMA-d5 za 3,4-metilendioksidetamfetamin (MDMA) i BE-d3 za benzoilegonin (BE) (Pitarch-Motellón i sur., 2021).

Tijekom analize uzorka posebnu pozornost valja posvetiti ispravnom odabiru biomarkera, odnosno analita čija se identifikacija i kvantifikacija žele provesti. Ti analiti su matični ili metabolizirani oblici konzumirane droge. Dakle, određeni spoj prikladan je kao biomarker samo ako zadovoljava slijedeće uvjete:

- mora se izlučivati urinom
- mora biti stabilan u kanalizacijskom sustavu tijekom cijelog procesa
- mora biti specifičan samo za točno određeni narkotik koji se ispituje
- ne smije imati mogućnost formiranja egzogenim čimbenicima (pr. djelovanjem mikroorganizama u kanalizacijskom sustavu)
- njegova koncentracija mora biti dovoljno velika, iznad granice kvantifikacije određene analitičke metode koja se koristi u analizi

Primjeri nekih analita koji se najčešće koriste kao biomarkeri u otkrivanju upotrebe droga su: THC-COOH za kanabis, BE za kokain, 6-acetilmorfin (6-MAM) za morfij i heroin te MDMA, amfetamin i metamfetamin za stimulanse amfetaminskog tipa (Mercan i sur., 2019).

Osim uobičajenih droga koje su u upotrebi već dugi niz godina, poseban problem stvaraju nove psihoaktivne tvari koje se mogu naći na tržištu. Nakon što se otkrije njihova upotreba potrebno je provesti istraživanja koja će, što je prije moguće, dati informacije o njihovim kemijskim

svojstvima kako bi se mogli otkriti prikladni biomarkeri za njihovu analizu. Još jedan problem vezan uz nove droge na tržištu je taj što njih konzumira manji broj ljudi u usporedbi s konzumacijom tradicionalnih droga. Posljedično tome, koncentracija njihovih metabolita u otpadnim vodama je izuzetno mala što dodatno otežava analizu (Lorenzo i Pico, 2019).

Slijedeći korak WBE analize je pomoću dobivenih podataka o koncentracijama analita izračunati razinu upotrebe pojedinih droga. Kako bi to bilo ostvarivo, potrebno je uzeti u obzir vrijednost protoka otpadne vode u sustavu za obradu, broj stanovnika koji koriste određeni kanalizacijski sustav kao i razinu izlučivanja pojedinih komponenti iz tijela, odnosno odvijanje metaboličkih procesa u organizmu (Van Hal, 2019).

Izračun se provodi prema jednadžbi [1], (Mercan i sur., 2019):

$$DC = \frac{[CdxFrx1000xCf]}{P} \quad [1]$$

pri čemu,

DC predstavlja razinu upotrebe droge (mg/dan/1000 stanovnika)

Cd predstavlja koncentraciju analita (mg/L)

Fr označava protok otpadne vode u relevantnom sustavu za obradu (L/dan)

Cf predstavlja korekcijski faktor

P označava populaciju ljudi koja koristi definirani sustav kanalizacije

Shematski prikaz koraka WBE analize, podaci koje je potrebno poznavati kako bi se mogle izračunati konačne vrijednosti, odnosno prosječna količina upotrebe pojedine droge iskazana po danu na 1000 stanovnika, prikazani su slikom 2.



Slika 2. Glavni koraci u WBE analizi (prema Castiglioni i sur., 2014)

Od iznimne je važnosti poznavanje i uzimanje u obzir svih čimbenika koji mogu utjecati na konačne rezultate analize. Stoga je potrebno obratiti pozornost i na činjenicu da svi kemijski spojevi koji se ispuste u kanalizacijsku mrežu, na svom putu od mjesta izlučivanja do mjesta uzorkovanja, postaju izloženi nizu kemijskih procesa tijekom kojih može doći do njihove transformacije. Posljedično tome, kasnija kvalitativna i kvantitativna analiza mogu dati neprecizne rezultate (Reid i sur., 2014).

Proces transformacije može imati dva različita utjecaja na koncentraciju analiziranog biomarkera. U prvom slučaju, kemijskim reakcijama dolazi do transformacije biomarkera što dovodi do konačnog smanjenja njegove koncentracije u uzorku. U drugom slučaju može doći do transformacije nekog drugog spoja, koji se također nalazi u otpadnoj vodi, u promatrani biomarker. Do toga može doći ukoliko su u otpadnoj vodi prisutni enzimi koji su isti ili slični onima u ljudskom organizmu i koji mogu nemetabolizirani (matični) oblik droge pretvoriti u njegov metabolički produkt (u ovom slučaju promatrani biomarker). Takav slučaj će na kraju rezultirati povećanom koncentracijom analizirajućeg biomarkera (Reid i sur., 2014).

Danas su razvijeni i razni modeli koji predviđaju stabilnost kemijskih komponenti u otpadnim vodama. Primjer jednog takvog modela je STPWIN™ (engl. *Sewage Treatment Plant win*) kojeg su osmislili Mackay i suradnici na Sveučilištu u Torontu (Reid i sur., 2014).

Rezultati dobiveni pomoću jednadžbe [1] lako su usporedivi s rezultatima WBE analize s raznih lokacija i omogućuju lako praćenje promjena upotrebe droga na promatranom području.

2.3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O PRIMJENI WBE TEHNOLOGIJE

Istraživanje Baz-Lomba i sur. (2016) provedeno je s ciljem dobivanja podataka o upotrebi narkotika, alkohola, djelatnih tvari iz lijekova, kofeina i nikotina analizom otpadne vode i usporedbom tih podataka s podacima o prodaji, zaplijeni i konzumiranju istih tvari u 8 europskih gradova. Istraživanje je provedeno 2015. godine u Oslu (Norveška), Castellonu (Španjolska), Bristolu (UK), Utrechtu (Nizozemska), Milanu (Italija), Zurichu (Švicarska), Copenhagenu (Danska) i Bruxellesu (Belgija). Uzorci su sakupljeni u postrojenjima za obradu otpadnih voda 7 uzastopnih dana između 7 h i 8.30 h, osim u Zurichu gdje su sakupljeni u 00.00 h. Uz sakupljanje uzoraka, svaki dan je zabilježen prosječni protok otpadne vode (L/dan) u svakom postrojenju. Odmah nakon uzorkovanja uzorci su smrznuti na temperaturu od -20 °C kako bi se spriječio raspad metabolita u urinu te su poslani na laboratorijsku analizu u Oslo i Milano.

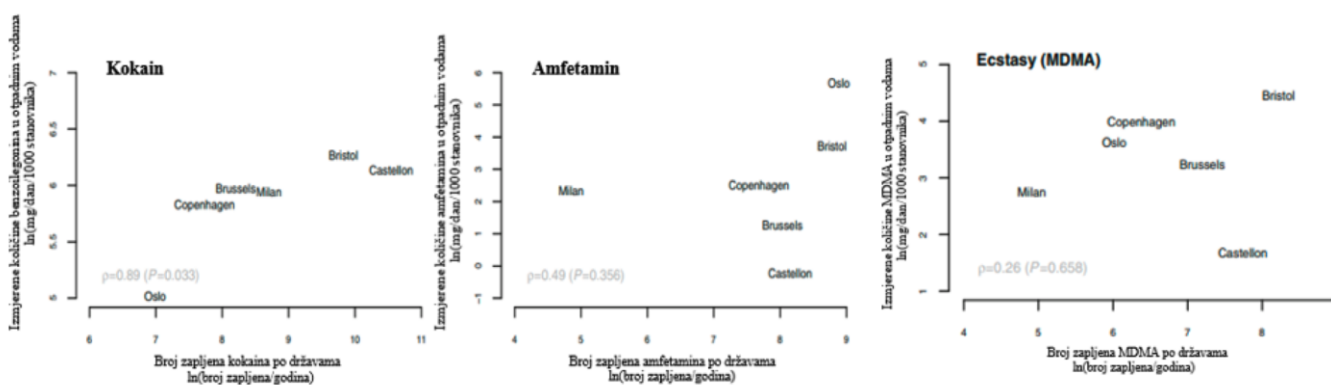
U laboratorijskoj analizi najprije je u uzorke otpadne vode dodana mješavina otopina ILIS-a nakon čega je provedena ekstrakcija čvrste faze. Dobiveni eluens potom je ubrizgan u LC-QTOF (engl. *Liquid chromatography-Quadrupole Time-Of-Flight mass spectrometry*) sustav i pojedine komponente su se kromatografski razdvojile te je izvršena njihova identifikacija i kvantifikacija. LC-QTOF sustav je sustav u kojem je tekućinska kromatografija spregnuta s QTOF detektorom.

Nakon dobivenih podataka o koncentracijama svih spojeva, vrijednosti koncentracija prvotno su pomnožene s prosječnom dnevnom brzinom protoka otpadne vode nakon čega je dobivena vrijednost podijeljena s populacijom određenog područja kako bi se mogla konačno dobiti vrijednost o količini konzumirane tvari na 1000 stanovnika po danu.

Rezultati analize pokazali su da je benzoilegonin (metabolit kokaina) bio prisutan u svim uzorcima otpadnih voda i u svim gradovima je njegova količina bila slična, uz iznimku Osla gdje je bila znatno manja. Amfetamin je u značajnijim koncentracijama detektiran u Oslu i Bristolu za razliku od ostalih gradova, gdje su dobivene koncentracije bile dosta niže.

Metamfetamin je pronađen u uzorcima iz Osla, Bruxellesa, Milana, Zuricha, Copenhagena te u nekim uzorcima iz Castellona. Prisutnost aktivne komponente ectasyja, MDMA, otkrivena u otpadnim vodama sa svih lokacija, ali ne u svim uzorcima (Baz-Lomba i sur., 2016).

Na Slici 3 dan je prikaz izmjerenih količina benzoilegonina, amfetamina i MDMA odnosno ectasyja u otpadnim vodama u promatranim gradovima, kao i nacionalni podaci o broju zapljena istih u državama u kojima se nalaze navedeni gradovi. Na ovaj način moguće je lako usporediti količinu upotrebe dotičnih narkotika u različitim gradovima te usporediti zaplijenjenu i konzumiranu količinu narkotika u tim gradovima.



Slika 3. Broj zapljena kokaina, amfetamina i ectasyja, te količine benzoilegonina, amfetamina i MDMA određene u otpadnim vodama u Oslu, Copenhagenu, Bristolu, Castellonu, Milanu i Bruxellesu (*prema* Baz-Lomba i sur., 2016)

Rezultati provedene WBE analize (Slika 3) uspoređeni su s nacionalnim podacima o zapljeni droge u motrenim državama iz 2013. godine (Tablica 2). Usporedbom je utvrđeno vrlo dobro podudaranje izmjerenih količina benzoilegonina i zabilježenog broja zapljena kokaina kojeg su prijavile različite države. S druge strane, korelacija između izmjerenih količina amfetamina i MDMA i podataka o broju zapljena istih bila je neznačajna (Baz-Lomba i sur., 2016).

U Tablici 2 se također nalazi usporedba podataka iz provedene analize otpadnih voda sa srednjom količinom zapljene droge u razdoblju od 2010. do 2013. koju je objavio UNODC, ali među tim podacima nije utvrđena značajna korelacija.

Tablica 2. Usporedba podataka o zapljenama droge i podataka dobivenih WBE analizom za kokain, amfetamine i MDMA (prema Baz-Lomba i sur., 2016)

Grad	EMCDDA; izvještaj o drogama iz 2015. o broju zapljena u 2013. (broj/godina)			UNDOC-ova statistika Količina zapljena (2010-2013) (kg/godina)			Analiza otpadnih voda iz 2015. izmjerene količine (mg/dan/1000 stan.)		
	Kokain	Amfetamini	MDMA	Kokain	Amfetamini	MDMA*	benzoilegonin	Amfetamini	MDMA
Oslo	1086	7229	411	94	354	6468	1515	294.7	37.7
Castellon	38033	3471	2301	20689	297	312780	463.9	0.8	5.4
Bruxelles	3653	3085	1338	10127	197	40341	390.9	3.5	25.4
Bristol	18569	6515	3716	3216	1223	494300	528.7	41.6	86.3
Utrecht	-	-	-	10784	807	1750867	299.5	52.9	121.5
Milano	6031	128	136	5113	41	26311	380.9	10.4	15.5
Zurich	-	-	-	307	40	23354	672.6	32.0	64.8
Copenhagen	2286	2167	590	205	275	35430	337.2	11.7	53.1

*Broj tableta po godini

Razlozi lošeg podudaranja rezultata (Tablica 2) su raznoliki, a jedan od glavnih je zasigurno značajna promjena tržišta droga tijekom vremena (razlika u vremenu aktualnosti jednih i drugih podataka je 2 godine). Također, podaci o zapljenama i potrošnji predstavljaju godišnji prosjek unutar cijele države, dok su WBE analizom dobiveni rezultati karakteristični za pojedine gradove. Nadalje, u nekim državama su nedostajali određeni podaci o zaplijenjenim količinama droga. Preciznija usporedba mogla bi se provesti kada bi se podaci o zapljenama i podaci analiza prikupljali od iste populacije u isto vrijeme.

Nakon provedenog istraživanja, Baz-Lomba i sur. (2016) ističu kako bi se WBE analiza mogla pokazati izvrsnim izvorom podataka za proučavanje učinkovitosti policijskih operacija, obrazovnih programa i javnozdravstvenih kampanja usmjerenih na smanjenje uporabe određenih droga. Također, zbog brzo mijenjajućeg tržišta droga, kvalitetno međusobno nadopunjavanje različitih metoda praćenja droga rezultiralo bi preciznijom i osjetljivijom analizom transporta i upotrebe droga u Europi.

2.3.1. Potrošnja droge u R. Hrvatskoj i ostalim članicama EU

EMCDDA sustavno, već dulji niz godina, provodi analizu otpadnih voda u brojnim europskim državama i objavljuje rezultate o procjeni potrošnje glavnih tipova droga u ispitivanim gradovima za danu godinu (EMCDDA, 2022b; EMCDDA i Europol, 2019; EMCDDA, 2018; EMCDDA, 2016).

Prema Europskom izvješću o drogama (EMCDDA) iz 2022. godine 83,4 milijuna odraslih osoba (29% odraslih osoba u dobi od 15 do 64 godine) u Europskoj uniji ikad je konzumiralo nezakonitu drogu, od toga 50,5 milijuna muškaraca i 33 milijuna žena. U 2021. godini više od 22 milijuna odraslih Europljana izjavilo je da je konzumiralo kanabis što ga čini najčešće konzumiranom tvari. Druga najčešće konzumirana kategorija su stimulativne tvari. Procjenjuje se da je u 2021. godini 3,5 milijuna odraslih osoba konzumiralo kokain, 2,6 milijuna MDMA i 2 milijuna amfetamine. Otprilike milijun Europljana je 2021. godine konzumiralo heroin ili neki drugi nezakoniti opioid.

Zemlje EU opskrbljuju se drogama lokalne proizvodnje i robom proizvedenom iz drugih regija svijeta. Europsko izvješće o drogama, EMCDDA 2022, istaknulo je da postoji osnovana sumnja o brzom povećanju digitalizacije tržišta droga na osnovu informacija o sve češćoj uporabi aplikacija društvenih mreža, kao i šifriranih usluga za olakšanu kupovinu droga (EMCDDA, 2022b; HZJZ, 2022a).

Analize otpadnih voda u R. Hrvatskoj provode se od 2009. godine, provodi ih Institut Ruđer Bošković koji je dio SCORE europske mreže (engl. *Sewage analysis CORE group — Europe SCORE*) koja je nastala s ciljem izrade standardiziranih pristupa analizi otpadnih voda te koordinacije međunarodnih istraživanja kroz izradu zajedničkog protokola djelovanja.

Praćenje otpadnih voda u 24-satnim kompozitnim uzorcima tijekom 2020. i 2021. godine provodilo se tijekom jednog tjedna između ožujka i svibnja, dok su se u ranijim godinama uzroci prikupljali samo tijekom ožujka (HZJZ, 2022b).

Analizirani su urinarni biomarkeri glavne supstance za amfetamin, metamfetamin i MDMA. Također, analizirani su glavni metaboliti kokaina i kanabisa, (benzoilegonin (BE) i THC-COOH (11-nor-9-karboksi-delta9-tetrahidrokanabinol). Specifičan metabolit heroina pokazao se nestabilnim u otpadnim vodama. U istraživanju u 2020. godini obuhvaćena su 82 grada iz 18 država EU, dok je u 2021. godini sudjelovalo 75 gradova iz 23 države EU, te Norveška i Turska (HZJZ, 2022b).

Rezultati istraživanja pokazali su da su svi biomarkeri pronađeni u gotovo svakom gradu u kojem je istraživanje i provedeno. U većini gradova je dokazana veća potrošnja BE i MDMA tijekom vikenda nego tijekom radnog dijela tjedna, dok je ravnomjernija potrošnja tijekom cijelog tjedna dokazana za amfetamin, kanabis i metamfetamin.

Također, promatrajući različite gradove unutar iste države, uglavnom je zabilježen podatak o većoj potrošnji BE, metamfetamina i MDMA u većim nego u manjim gradovima. Generalno najčešće konzumirana droga bio je kanabis, a najviše THC-COOH pronađeno je u otpadnim

vodama u Hrvatskoj, Španjolskoj, Nizozemskoj i Sloveniji.

Potrošnja amfetamina bila je najveća u sjevernoj i istočnoj Europi, a kokaina u zapadnoj i južnoj Europi. Upotreba metamfetamina bila je u svim gradovima pretežno niska, a prisutnost MDMA bila je najveća u gradovima sjeverne Europe (HZJZ, 2022b).

Za R. Hrvatsku podaci o količini metabolita urina detektiranih u ovom istraživanju prikazani su u Tablici 3. Prikazani su i podaci o količini istih metabolita u pojedinim godinama od 2011. do 2021. godine. Prikazane vrijednosti su prosječne vrijednosti izražene kao dnevna potrošnja u miligramima na 1000 stanovnika (HZJZ, 2022b).

Tablica 3. Dnevna prisutnost metabolita urina (mg/1000 stanovnika) u Gradu Zagrebu (podaci preuzeti iz HZJZ, 2022b)

VRSTA NARKOTIKA (mg/1000 stanovnika)	Godina					
	2011.	2015.	2018.	2019.	2020.	2021.
Kokain	49.95	100.47	-	395.6	510.24	548.62
Kanabis	30.59	-	120.03	186.13	228.93	132.9
Amfetamin	14.6	76.73	-	145.67	1013.84	151.41
MDMA	3.26	27.28	-	36.5	41.38	28.26

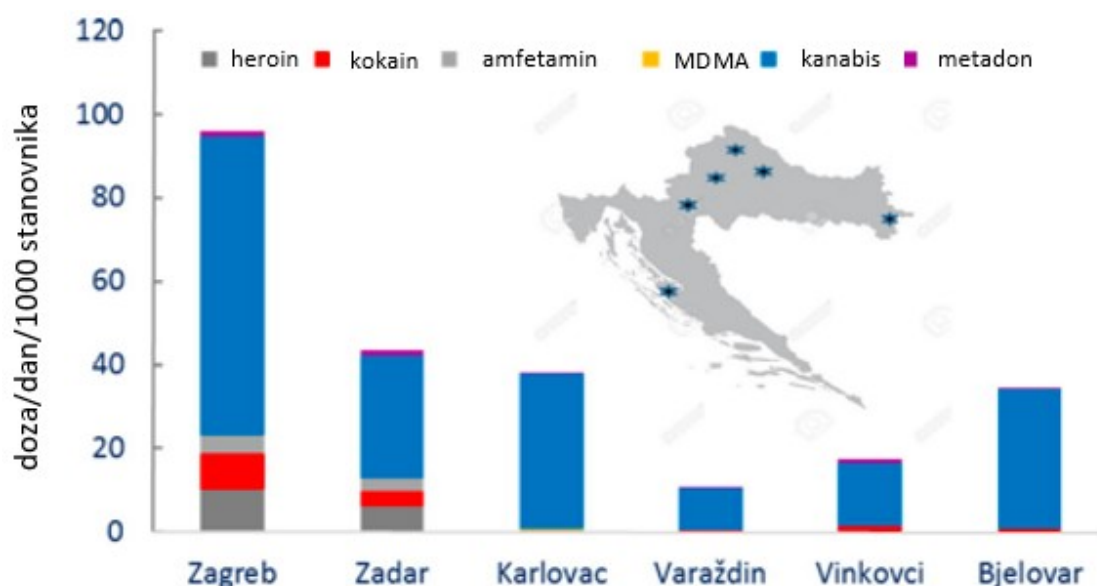
Godine 2021. Zagreb se kao grad našao na 11. mjestu u Europi po dnevnoj upotrebi kokaina (548.62 mg/1000 stanovnika). Promatrajući tjedno izlučivanje, najveća zabilježena količina bila je subotom. Od 2011. godine potrošnja kokaina je u stalnom porastu. Što se potrošnje kanabisa tiče, u 2021. godini Zagreb je zauzeo 4. mjesto prema dnevnoj potrošnji sa 132.9 mg/1000 stanovnika. Unazad 10 godina konzumacija kanabisa bila je u stalnom porastu sve do 2020. godine nakon čega je uslijedio pad. Dnevna potrošnja amfetamina 2021. godine bila je 151.41 mg/1000 stanovnika, što je pozicioniralo Zagreb na 12. mjesto u Europi. Ta količina je manja u odnosu na 2020. godinu, a približno je ista onoj iz 2019. godine. Količina metamfetamina u otpadnim vodama Zagreba nije mjerena 2021. godine. Konačno, dnevna potrošnja MDMA iznosila je 28.26 mg/1000 stanovnika, prema čemu je 2021. godine grad Zagreb dospio na 14. mjesto u Europi. Usporedno s prethodnim godinama, najveća količina ove supstance detektirana je 2020. godine nakon čega se bilježi pad na približnu vrijednost iz 2018. godine (HZJZ, 2022b).

Sveukupno gledajući, tijekom zadnjih 10 godina zabilježen je znatan porast upotrebe svih analiziranih vrsta droga u gradu Zagrebu, što predstavlja veliki problem (HZJZ, 2022b).

Tijekom 2020. godine analize otpadnih voda pokazuju češću konzumaciju kanabisa u zapadnim i južnim državama Europe, posebno u Hrvatskoj, Francuskoj, Španjolskoj, Nizozemskoj i Portugalu.

Zagreb je 1. grad u Europi po dnevnoj potrošnji amfetamina – dnevno 1013,84 miligrama amfetamina, 2. grad u Europi po dnevnoj konzumaciji kanabisa – dnevno 228,93 miligrama kanabisa na 1000 stanovnika, 1. grad u Europi po konzumaciji kanabisa radnim danima - radnim danom konzumira se 257,6 miligrama kanabisa na 1000 stanovnika, 9. grad u Europi po dnevnoj konzumaciji ecstasyja – 41,38 miligrama ecstasyja na 1000 stanovnika, dnevno se konzumira 510,24 miligrama kokaina na 1000 stanovnika – tri puta više nego prije pet godina. Količine kokaina i ecstasyja povećane su u danima vikenda, dok je zlouporaba amfetamina ravnomjerno „raspoređena“ u svim danima tjedna (HZJZ, 2022b).

Razmatrajući primjenu WBE tehnologije u svrhu motrenja upotrebe droga u R. Hrvatskoj, vrijedno je istaknuti istraživanje u kojem je po prvi puta motrena potrošnja nezakonitih droga u različitim hrvatskim gradovima: Bjelovaru, Vinkovcima, Varaždinu, Karlovcu, Zadru i Zagrebu (Slika 4), koje su proveli Krizman i sur. (2016).



Slika 4. Potrošnja heroina, kokaina, amfetamina, MDMA, kanabisa i metadona u Zagrebu, Zadru, Karlovcu, Varaždinu, Vinkovcima i Bjelovaru (prema Krizman i sur., 2016)

Istraživanje Krizman i sur. (2016) je provedeno 2013. godine, a proučavana je ovisnost potrošnje droge o geografskom položaju i veličini grada, kao i o utjecaju ljetne turističke sezone. Tijekom istraživanja praćene su ilegalne droge: kokain, heroin, amfetamin, MDMA, metamfetamin i kanabis, te terapijski opiodi kodein i metadon. Rezultati istraživanja pokazali su kako je konzumacija ilegalnih droga općenito bila veća u većim urbanim središtima (Zagrebu i Zadru), odnosno najveća u najmnogoljudnijem od proučavanih gradova, gradu Zagrebu. U Zagrebu je uočeno povećanje korištenja svih analiziranih tvari tijekom vikenda, dok to nije bio slučaj u preostalim, malim, kontinentalnim gradovima kao ni u obalnom gradu Zadru. S druge strane, u Zadru je uočeno povećanje potrošnje promatranih supstanci tijekom ljetnih mjeseci (srpanj-kolovoz), što je moguće objasniti sezonskim dolaskom većeg broja ljudi (turista) u grad. Istraživanje je pokazalo i jednu zanimljivost, a radilo se o značajnom ljetnom smanjenju potrošnje kanabisa i u Zagrebu i u Zadru.

2.4. OGRANIČENJA I PROBLEMI ANALIZE OTPADNIH VODA U SVRHU MOTRENJA ZLOUPORABE/KONZUMIRANJA DROGA – IZAZOVI ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

Preciznije praćenje konzumacije, trendova i prodaje droge bilo bi moguće kada bi u većem broju gradova na svijetu postojala postrojenja za WBE analize i kada bi se o tome vodio veći broj studija. Naime, studije koje se provode u Europi i Australiji relativno su brojne i opsežne, dok ih je u Aziji, Americi i Africi vrlo malo (Lorenzo i Pico, 2019).

Posebnu pozornost tijekom ove analize potrebno je posvetiti informacijama o stanovništvu koje koristi određeni kanalizacijski sustav. Ukoliko se u nekom mjestu odvijaju sezonski festivali, koncerti ili bilo kakvi drugi događaji koji rezultiraju dolaskom većeg broja ljudi, promijenit će se i broj ljudi koji koriste kanalizacijsku mrežu toga mjesta i rezultati analize više neće biti reprezentativni za stanovnike danog grada. Isto tako potrebno je tijekom analize uzeti u obzir broj restorana, industrijskih postrojenja, rekreacijskih centara, bolničkih objekata, odnosno svih područja-mjesta u kojima se može očekivati dolazak ljudi koji ne žive u tom području (Mercan i sur., 2019).

Nadalje, razmatrajući broj pacijenata u bolničkim ustanovama, odnosno ukupni broj ljudi koji primjenjuju određene lijekove, vrlo je važno imati uvid u podatke o vrsti i količini korištenih lijekova. Neki od izlučenih metabolita lijekova isti su kao i metaboliti nastali nakon upotrebe određene droge. Primjer za to je morfij, najzastupljeniji metabolit heroina, najzastupljenijeg

opijata na europskom tržištu. Morfij osim što je pokazatelj upotrebe kokaina, pokazatelj je i upotrebe kodeina i nekih drugih opioidnih analgetika, a može se i sam koristiti u medicinske svrhe (EMCDDA i Europol, 2019). Iz tog je razloga bitno oduzeti količinu morfija koji dolazi iz medicinske upotrebe od ukupne količine dobivene analizom, što je vrlo teško ili čak nemoguće učiniti. Zbog tog se problema provode studije s ciljem traženja metabolita heroina koji bi dao preciznije rezultate. Primjer takvog alternativnog metabolita je 6-MAM, međutim niti taj metabolit nije najbolje rješenje jer nije dovoljno stabilan u sustavu otpadnih voda, a karakterizira ga i ograničena stopa izlučivanja što rezultira niskom koncentracijom koja može biti i ispod granice detekcije pri analizi (Mercan i sur., 2019).

Osim heroina, i kod drugih vrsta droga postoje određene specifičnosti koje stvaraju probleme prilikom WBE analize. Tako primjerice, kod analize kanabisa nekoliko problema stvara specifična kemijska struktura THC-COOH. Riječ je o metabolitu THC-a (Δ^9 -tetrahidrokanabinol) kojeg karakterizira vrlo visoka stabilnost u otpadnim vodama (preko 72 sata) u odnosu na ostale metabolite. Međutim, zbog svoje strukture vrlo je osjetljiv na promjene pH okoline u kojoj se nalazi. Ukoliko se nalazi u kiselom pH mediju, bit će prisutan u nenabijenom, hidrofobnom obliku u kojemu je kao takav sklon reagirati s ostalim hidrofobnim česticama s kojima se nađe u kontaktu. Ukoliko se pak nalazi u neutralnom ili bazičnom pH mediju, bit će negativno nabijen i više hidrofilan. Stoga je, kako bi se dobili što precizniji rezultati, potrebno provoditi korekciju pH vrijednosti i to tijekom koraka uzorkovanja (Causanilles i sur., 2017). Problem je i tendencija THC-COOH da se adsorbira na biofilm koji se nalazi na stjenkama cijevi kanalizacije (McCall i sur., 2016). Zatim, velik utjecaj na konačnu koncentraciju THC-COOH imaju i reakcije transformacija kojima je izložen tijekom prolaska kroz kanalizacijski sustav, a prema kojima pokazuje visoku sklonost (Mercan i sur., 2019). Još jedan od problema je nizak postotak izlučivanja THC-COOH, zbog čega EMCDDA i Europol (2019) ističu kako praćenje upotrebe kanabisa analizom otpadne vode zapravo ne može dati nimalo uvjerljive rezultate. Također ističu kako je THC-COOH jedini biomarker kanabisa za kojeg je do sada utvrđena prikladnost za ovakvu vrstu analize, zbog čega postoji velika potreba za pronalaskom alternativnog biomarkera.

Promatrajući upotrebu amfetamina može se uočiti sličnost kao i kod upotrebe kokaina, odnosno morfija. Naime, iako se amfetamin koristi kao matični biomarker, njegova prisutnost može također biti rezultat upotrebe nekih terapijskih lijekova čiji je on metabolit. Isto tako, amfetamin je metabolit metamfetamina pa može doći do greške u procjeni količine upotrebe ovih droga (Mercan i sur., 2019).

Još jedna vrsta problema koja znatno utječe na WBE analizu je i broj ilegalnih laboratorija za proizvodnju droga, odnosno količina tvari koja iz njih dospijeva u kanalizacijske sustave a koje kasnije mogu biti prepoznate kao analizirani biomarkeri (Yadav i sur., 2017). Na taj način smanjuje se preciznost procjene korištenja određene vrste droge na nekom području. Ipak, ukoliko se na određenom području ispuštaju veće količine droga u kanalizacijski sustav na prethodno navedeni način, to će biti prepoznato i moći će se pravovremeno reagirati na preciznost procjene. Primjer takvog jednog slučaja zabilježen je u nizozemskim gradovima Amsterdamu, Eindhovenu i Utrechtu, kada je SCORE organizacija otkrila neuobičajeno velike količine amfetamina i MDMA u otpadnim vodama. Zaključak daljnjih analiza bio je da se radi o nezakonitom ispuštanju neiskorištenih ostataka ovih droga u kanalizacijske sustave što je upućivalo na proizvodnju droga u toj regiji. Često se rezultati ovakvih analiza mogu povezati s policijskim intervencijama u nezakonite laboratorije u nekoj regiji (EMCDDA i Europol, 2019). U slučajevima poput prethodno opisanog slučaja iz Nizozemske, zadatak WBE analitičara je uspjeti razlikovati količinu droge koja je dospjela u sustav za obradu otpadnih voda iz ljudskog organizma i one koja je dospjela odlaganjem neiskorištenih droga u nezakonitim laboratorijima. U tu se svrhu danas koristi metoda enantiomernog profiliranja. Ta se kemijska metoda temelji na činjenici da mnoge droge (pr. kokain, amfetamin) u svojoj kemijskoj strukturi sadrže jedan ili više asimetričnih C-atoma. Ukoliko sadrže samo jedan asimetrični C-atom, tijekom kemijske sinteze ovakvih spojeva nastajat će jednake količine oba člana enantiomernog para. Ukoliko takva, nastala racemična smjesa bude podvrgnuta metaboličkim reakcijama, enantiomerni omjer će se promijeniti što dokazuje da je analizirana droga bila konzumirana od strane potrošača, odnosno da njezin izvor nije u nezakonitom ispuštanju u kanalizaciju (Emke i sur., 2014).

Još jedan problem koji nastaje pri uočenom povećanju koncentracije metabolita nekih droga, uz pretpostavku da nije došlo do ispuštanja količina neiskorištene droge iz nezakonitih laboratorija, je nemogućnost utvrđivanja točnog razloga te pojave. Naime, WBE analiza će detektirati to povećanje, ali neće dati odgovor na pitanje je li došlo do povećanja broja ljudi koji konzumiraju tu drogu ili pak do povećanja količine unosa droge kod istog broja korisnika. Također, nije isključen niti slučaj da se povećala čistoća droge na tržištu (EMCDDA i Europol, 2019). Naravno, isto vrijedi i u slučaju zabilježenog ukupnog smanjenja koncentracija određenih vrsta droga.

Ograničenje ove tehnologije koje navode Mercan i sur. (2019) je ovisnost konačnih rezultata o načinu unosa droge. Različiti načini unosa (pr. intravenozni unos i unos kroz usta) iste droge

rezultirat će različitim stopama izlučivanja metabolita iz organizma jer će doći do određenih razlika tijekom procesa biotransformacije. Pri izračunu, korekcijski faktori temelje se na prosjeku najčešćeg načina unosa, ali taj podatak često varira među različitim državama. Iz tog je razloga korekcijske faktore potrebno prilagoditi prema navikama konzumenata u svakoj državi kako bi se dobili rezultati što bliži stvarnim vrijednostima. Još jedan od problema koji utječu na točnost rezultata rada ove tehnologije su klimatski uvjeti kojima je izložen kanalizacijski sustav i sustav za obradu otpadnih voda. Temperatura, odnosno sezonske promjene u temperaturi u tim sustavima utječu na vrijeme poluraspada biomarkera koji kroz njih prolaze, odnosno na brzinu njihove razgradnje (Hart i Halden, 2020). Također, važno je tijekom rada WBE analize uzeti u obzir i vrijednost dnevne temperature i količine padalina u tom danu. Ukoliko je dan uzorkovanja kišovit, brzina protoka može se povećati, a ekstremno vrući vremenski uvjeti mogu povećati jačinu isparavanja u kanalizacijskim sustavima (Mercan i sur., 2019).

U gradovima koji koriste mješoviti sustav kanalizacije (sustav u kojem se u istim cijevima sakupljaju otpadne vode i oborinske vode - nastale topljenjem snijega ili padanjem kiše) zbog ograničenih kapaciteta kanalizacijskog sustava i sustava za obradu otpadnih voda, tijekom topljenja veće količine snijega ili pada obilnijih kiša može doći do ispuštanja kanalizacije u površinske vode. U takvom slučaju doći će do ispuštanja, odnosno gubitka određenog volumena otpadnih voda, a s njima i dijela metabolita korištenih droga (EMCDDA, 2022a).

Ograničenja i problemi s kojima se susreće WBE analiza utječu na preciznost konačnih rezultata. Buduća bi istraživanja, ukoliko je to moguće, trebala biti temeljena na analiziranju i rješavanju tih problema kako bi se dobila kvalitetnija i vjerodostojnija slika o konzumaciji droga u svijetu.

3. ZAKLJUČCI

- 1) Droge, nakon unošenja u organizam, prolaze kroz niz metaboličkih reakcija, nakon čega se u nepromijenjenim ili točno određenim metaboličkim oblicima putem urina izlučuju u kanalizacijski sustav.
- 2) Pravilnim prikupljanjem i analiziranjem uzoraka otpadne vode moguće je provoditi praćenje upotrebe droga, čime se bavi disciplina zvana „epidemiologija temeljena na otpadnim vodama“.
- 3) Analizom otpadne vode primjenom WBE analize moguće je dobiti objektivnije i preciznije rezultate o upotrebi droga u odnosu na tradicionalne metode praćenja. Analize je moguće provoditi tijekom duljeg ili kraćeg vremenskog perioda i na različitim lokacijama, što daje dobar uvid u trendove potrošnje određenih vrsta droga. Također, zbog brzine izvođenja WBE metoda korisna je za identifikaciju novodizajniranih droga na tržištu.
- 4) Nedostaci WBE metode vezani su uz nedobivanje informacija o broju, dobi i spolu konzumentata droga. S obzirom na stalnu pojavu novih vrsta droga na tržištu ova disciplina zahtijeva stalan rad i napredak. U budućnosti istraživanja moraju težiti rješavanju svih aktualnih problema i ograničenja ove discipline – WBE metode.
- 5) Za borbu protiv nezakonitog korištenja droga u svijetu potrebno je imati što vjerodostojniju sliku o njenoj upotrebi i tržištu. Veliki značaj u tome imaju podaci dobiveni analizom otpadnih voda, no još precizniju sliku daje sinergija i usporedba tih podataka s podacima o policijskim intervencijama i zapljenama, nacionalnim podacima dobivenim provođenjem službenih upitnika kao i podacima zdravstvenih ustanova.

4. POPIS LITERATURE

Baz-Lomba JA, Salvatore S, Gracia-Lor E, Bade R, Castiglioni S, Castrignanò E i sur. (2016) 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* **16**, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3686-5>

Bogić A (2018) Verifikacija referentnih intervala S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u plazmi na tandemskom spektrometru masa (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Bravo F, Contzen MC, Mollo J, Buc Calderon P, Benites J (2012) Validation of a method to detect cocaine and benzoylecgonine in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry and application in body packers and stuffers cases in the north of Chile. *J. Chil. Chem. Soc.* **57**, 1253-1255. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072012000300012>

Castiglioni S, Thomas KV, Kasprzyk-Hordern B, Vandam L, Griffiths P (2014) Testing wastewater to detect illicit drugs: state of the art, potential and research needs. *Sci. Total Environ.* **487**, 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.034>

Causanilles A, Baz-Lomba JA, Burgard DA, Emke E, González-Mariño I, Krizman-Matasic I i sur. (2017) Improving wastewater-based epidemiology to estimate cannabis use: focus on the initial aspects of the analytical procedure. *Anal. Chim. Acta* **988**, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.011>

Choi PM, Tschärke BJ, Donner E, O'Brien JW, Grant SC, Kaserzon SL i sur. (2018) Wastewater-based epidemiology biomarkers: past, present and future. *Trends Analyt Chem.* **105**, 453-469. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>

Daughton CG (2001) Illicit drugs in municipal sewage: proposed new non-intrusive tool to heighten public awareness of societal use of illicit/abused drugs and their potential for ecological consequences. U: Daughton CG, Jones-Lepp T (ured.) *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., str. 348–364

Dolan K, Rouen D, Kimber JO (2004) An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug Alcohol Rev.* **23**, 213-217. <https://doi.org/10.1080/09595230410001704208>

ECCC (2021) Wastewater sampling for epidemiological surveillance. ECCC- Environment and Climate Change Canada, https://nccid.ca/wp-content/uploads/sites/2/2021/12/Wastewater-Sampling-for-Epidemiological-Surveillance_October-2021_2.pdf. Pristupljeno 29. srpnja 2022.

EMCDDA (2016) European Drug Report. Trends and Developments. EMCDDA-European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001HRN.pdf>. Pristupljeno 19. srpnja 2022.

EMCDDA (2018) European Drug Report 2018: Trends and Developments. EMCDDA-European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001HRN_PDF.pdf. Pristupljeno 19. srpnja 2022.

EMCDDA (2022a) Frequently asked questions (FAQ): wastewater-based epidemiology and drugs. EMCDDA-The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/content/wastewater-faq_en#. Pristupljeno 28. srpnja 2022.

EMCDDA (2022b) Europsko izvješće o drogama-Trendovi i razvoj. EMCDDA-The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/20222419_TDAT22001HRN_PDF.pdf. Pristupljeno 13. srpnja 2022.

EMCDDA i Europol (2019) EU Drug Markets Report 2019. EMCDDA-European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12078/20192630_TD0319332ENN_PDF.pdf. Pristupljeno 19. srpnja 2022.

Emke E, Evans S, Kasprzyk-Hordern B, de Voigt P (2014) Enantiomer profiling of high loads of amphetamine and MDMA in communal sewage: a Dutch perspective. *Sci. Total Environ.* **487**, 666-672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.043>

Hahn RZ, Augusto do Nascimento C, Linden R (2021) Evaluation of illicit drug consumption by wastewater analysis using polar organic chemical integrative sampler as a monitoring tool. *Front. Chem.* **65**, 596875. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.596875>

Hart OE, Halden RU (2020) Modeling wastewater temperature and attenuation of sewage-borne biomarkers globally. *Water Res.* **172**, 115473. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115473>

Hrvatska enciklopedija (2021) Narkotici. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=42976>. Pristupljeno 2. srpnja 2022.

HZJZ (2022a) Objavljeno Europsko izvješće o drogama 2022. HZJZ-Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/objavljeno-europsko-izvjesce-o-drogama-2022/>. Pristupljeno 13. srpnja 2021.

HZJZ (2022b) Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (EMCDDA) objavio je analizu otpadnih voda za procjenu potrošnje glavnih tipova droga za 2021. godinu. HZJZ-Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/sluzba-za-suzbijanje-zlouporebe-droga/europski-centar-za-pracenje-droga-i-ovisnosti-o-drogama-emcdda-objavio-je-analizu-otpadnih-voda-za-procjenju-potrosnje-glavnih-tipova-droga-za-2021-godinu/>. Pristupljeno 13. srpnja 2021.

Kankaanpää A, Ariniemi K, Heinonen M, Kuoppasalmi K, Gunnar T (2016) Current trends in Finnish drug abuse: Wastewater based epidemiology combined with other national indicators. *Sci. Total Environ.* **568**, 864-874. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.060>

Krizman I, Senta I, Ahel M, Terzic S (2016) Wastewater-based assessment of regional and temporal consumption patterns of illicit drugs and therapeutic opioids in Croatia. *Sci. Total Environ.* **566**, 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.075>

LGC (2019) Use of stable isotope internal standards for trace organic analysis. LGC-Laboratory of the Government Chemist, https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/lgcstandards-assets/MediaGallery/Dre/DRE001_Isotope-White-Paper_271117.pdf. Pristupljeno 1. kolovoza 2022.

- Lorenzo M, Picó Y (2019) Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* **9**, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.05.007>
- McCall AK, Bade R, Kinyua J, Lai FY, Thai PK, Covaci A i sur. (2016) Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. *Water Res.* **88**, 933-947. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.040>
- Mercan S, Kuloglu M, Asicioglu F (2019) Monitoring of illicit drug consumption via wastewater: development, challenges, and future aspects. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* **9**, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.05.002>
- Moeller KE, Kissack JC, Atayee RS, Lee KC (2017) Clinical interpretation of urine drug tests: what clinicians need to know about urine drug screens. *Mayo Clin. Proc.* **92**, 774-796. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.007>
- Moeller KE, Lee KC, Kissack JC (2008) Urine drug screening: practical guide for clinicians. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 66-76. <https://doi.org/10.4065/83.1.66>
- Pitarch-Motellón J, Bijlsma L, Sancho Llopis JV, Roig-Navarro AF (2021) Isotope pattern deconvolution as a successful alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology. *Anal. Bioanal. Chem.* **413**, 3433-3442. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03287-7>
- Reid MJ, Baz-Lomba JA, Ryu Y, Thomas KV (2014) Using biomarkers in wastewater to monitor community drug use: A conceptual approach for dealing with new psychoactive substances. *Sci. Total Environ.* **487**, 651-658. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.057>
- Sims N, Kasprzyk-Hordern B (2020) Future perspectives of wastewater-based epidemiology: monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ. Int.* **139**, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>
- Sulej-Suchomska AM, Klupczynska A, Dereziński P, Matysiak J, Przybyłowski P, Kokot ZJ (2020) Urban wastewater analysis as an effective tool for monitoring illegal drugs, including new psychoactive substances, in the Eastern European region. *Sci. Rep.* **10**, 4885. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61628-5>

UNODC (2017) Annual Report. Covering activities during 2017. UNDOC-United Nations Office On Drugs and Crime, https://www.unodc.org/documents/AnnualReport/Annual-Report_2017.pdf. Pristupljeno 20. srpnja 2022.

UNODC (2015) World Drug Report 2015. UNDOC-United Nations Office On Drugs and Crime, https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf. Pristupljeno 20. srpnja 2022.

Vandevenne M, Vandebussche H, Verstraete A (2000) Detection time of drugs of abuse in urine. *Acta Clin. Belg.* **55**, 323-333. <https://doi.org/10.1080/17843286.2000.11754319>

Van Hal G (2019) Sewage as an information source on (illicit) substance use: a sociological and public health view. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* **9**, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.03.005>

Van Nuijs AL, Castiglioni S, Tarcomnicu I, Postigo C, de Alda ML, Neels H, i sur. (2011) Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review. *Sci. Total Environ.* **409**, 3564-3577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.030>

Verhagen R, Kaserzon SL, Tschärke BJ, Shukla P, Clokey J, Vrana B i sur. (2020) Time-integrative passive sampling of very hydrophilic chemicals in wastewater influent. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **7**, 848-853. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00685>

Yadav MK, Short MD, Aryal R, Gerber C, Van Den Akker B, Saint CP (2017) Occurrence of illicit drugs in water and wastewater and their removal during wastewater treatment. *Water Res.* **124**, 713-727. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.068>

Zakon (2019) Zakon o izmjenama i dopunama zakona o suzbijanju zlouporabe droga. Narodne novine 39, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_04_39_799.html Pristupljeno 26. kolovoza 2022.

Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S i sur. (2005) Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Health* **4**, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4->

Izjava o izvornosti

Ja, Marko Belavić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Marko Belavić