

UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNAN UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU IM.KAROLA
MARCINKOWSKIEGO WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY KATEDRA IZAKŁAD CHEMII I
ANALITYCZNEJ

OSZACOWANIE LICZBY OSÓB ZAŻYWAJĄCYCH SUBSTANCJE ODURZAJĄCE W OPARCIU O BADANIA ŚRODOWISKOWE ZANIECZYSZCZENIA WÓD W POZNANIU

Jolanta Kłos Piotr Nowicki

2011-05-20

Badania wykonane na zlecenie Biura do Spraw Przeciwdziałania Narkomanii w Warszawie wg
projektu w latach 2009/2011

SPIS TREŚCI

1.	BADANIA PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH.....	2
1.1	WSTĘP.....	2
1.2	EPIDEMIOLOGIA ŚCIEKÓW.....	2
1.3	ANALIZA ZWIĄZKÓW ODURZAJĄCYCH W ŚCIEKACH.....	3
1.4	SZACOWANIE ILOŚCI DAWEK I OSÓB SPOŻYWAJĄCYCH SUBSTANCJE ODURZAJĄCE.....	4
1.5	POWTARZALNOŚĆ OTRZYMANYCH WYNIKÓW.....	5
1.6	MOŻLIWOŚCI I PERSPEKTYWY BADAŃ.....	7
2.	METODYKA I BADANIE ŚCIEKÓW W POZNANIU	
2.1	POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK.....	8
2.2	ANALIZA ILOŚCIOWA.....	9
2.3	SZACOWANIE ILOŚCI KONSUMPCJI SUBSTANCJI ODURZAJĄCYCH.....	12
2.4	WYNIKI OZNACZEŃ I OSZACOWAŃ.....	14
2.5	WNIOSKI.....	33
3.	WALIDACJA METODY ANALITYCZNEJ.....	35
4.	PIŚMIENNICTWO.....	60

1. BADANIA PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

1.1. WSTĘP

Oszacowanie ilości spożywanej substancji odurzających oraz osób, których to spożycie dotyczy, dokonuje się obecnie w oparciu o badania ankietowe, wywiady kwestionariuszowe, statystyki policyjne etc. Nie są to niestety metody obiektywne. Podjęte przez nas badania stanowią alternatywną metodę, bardziej obiektywną, oszacowania konsumpcji środków odurzających przez badaną społeczność. To nowe podejście do badanego zjawiska jest szczególnie przydatne do szacowania konsumpcji w rzeczywistym czasie oraz do wykrywania trendów, czy profili zażywanych środków przez daną populację, co z kolei umożliwia podjęcie odpowiednich środków przeciwdziałania i ocenę ich skuteczności. Połączenie obu stosowanych metod, czyli metod ankietowych i nowej metody opartej na badaniach środowiskowych wydają się być doskonałymi środkami do badania profili zażywanych substancji odurzających oraz do monitorowania badania zjawiska w sposób ciągły [1].

1.2 EPIDEMIOLOGIA ŚCIEKÓW

Możliwość wykorzystania nieinwazyjnej metody monitorowania spożywania środków odurzających przez daną populację na podstawie badania próbek ścieków miejskich zaproponował Doughton w 2000 roku [2]. Metoda ta została następnie zastosowana przez grupę włoskich badaczy (Castiglioni, Zuccato et al.), którzy na podstawie oznaczeń bezyloekgoniny, metabolitu kokainy, w próbkach ścieków miejskich pobranych z włoskich miast: w Cagliari, Latina, Cuneo i Varese oszacowali poziom spożycia kokainy przez lokalne społeczności [6]. Procedura ta została rozszerzona na inne substancje odurzające, jak opiaty, grupę amfetamin czy grupę związków otrzymywanych z konopi indyjskich.

Wcześniejsze badania prowadzone na podstawie analizy próbek środowiskowych ścieków dotyczyły badania zawartości leków stosowanych w lecznictwie oraz leków weterynaryjnych, które wydalone przez ludzi i zwierzęta dostają się do wód powierzchniowych i ścieków [3-5]. Na podstawie wyników oznaczeń badanych substancji w próbkach środowiskowych (ścieków i wód powierzchniowych) stwierdzono, że w przybliżony sposób odzwierciedlają one ilości spożywanych leków obliczonych na podstawie dostępnych danych dotyczących liczby przepisywanych leków dla badanej populacji. Zasugerowało to badaczom użyteczność takich badań i możliwość potraktowania zarówno ścieków jak i wód powierzchniowych jako swego rodzaju depozytora szeregu substancji, które wydalone przez organizm ludzki i zwierzęcy dostają się do tych środowisk. Biorąc pod uwagę czynniki związane z farmakokinetyką, metabolizmem i współczynnikiem wydalania badanych substancji i ich metabolitów

można obliczyć tzw. ładunki środowiskowe (ilość substancji dostających się do środowiska w czasie), które w sposób bezpośredni wskazują na spożycie badanych substancji przez społeczność lokalną.

Pomimo, iż teoretycznie jest możliwe oznaczanie badanych substancji zarówno w próbkach ścieków jak i w wodach powierzchniowych, to jednak próbki te powinny być analizowane odmiennie. W przypadku próbek ścieków powinny być one pobierane jako tzw. wpływy, czyli zaraz po dostaniu się do oczyszczalni, ale zanim zostaną poddane biodegradacji czy utylizacji. Natomiast stężenie badanych związków w próbkach wód powierzchniowych może być zdeterminowane przez ilość utrzymujących się w tzw. odpływach oczyszczalni substancji podlegających biodegradacji i utylizacji w stopniu, który jest bardzo trudny do przewidzenia. Ponadto w przypadku rzek problemem jest określenie rozcieńczenia badanej próbki jak i wielkości populacji oddziałującej na badane środowisko. Może to prowadzić do otrzymania mało wiarygodnych wyników. W przeciwieństwie do tego, próbka pobrana z oczyszczalni ścieków jako tzw. wpływy, czyli próbka niezmieniona, jest bardziej reprezentatywna i można w sposób dość dokładny ustalić ilość osób obsługiwanych przez daną oczyszczalnię. Prowadzi to do bardziej wiarygodnych szacunków. Teoretycznie, oszacowanie konsumpcji badanych środków na tej podstawie powinno mieścić się w przedziale zgodnym z oficjalnymi danymi. W praktyce, najczęściej ze względu na metody zbierania próbek oraz konieczność zastosowania do obliczeń pewnych niezbędnych założeń i przybliżeń, metoda ta daje wyniki niedoszacowane. Chociażby z powodu tego, iż nie wszystkie badane substancje wydalone trafiają do systemu oczyszczania ścieków, część z nich może być stracona czy zdegradowana zanim osiągnie miejsce, w którym są pobierane próbki do badań.

1.3 ANALIZA ZWIĄZKÓW ODURZAJĄCYCH W ŚCIEKACH

Punktem początkowym w tych badaniach jest wybranie grupy analizowanych substancji. Spośród wielu związków wybrano te o największym znaczeniu: grupę amfetamin, kokainę i kanabinoidy (naturalne). Następnie określono odpowiednio związki, które wydalone dostają się do ścieków i które są wskaźnikami (związkami celowymi – targets) analitycznymi do monitorowania konkretnych substancji w próbkach ścieków. Te substancje określane są jako DTRs (Drug Target Residues). Wybrano je na podstawie danych dotyczących metabolizmu badanych związków i ich obecności w moczu i są to najczęściej główne metabolity, jak w przypadku kanabinoidów i kokainy, albo związek macierzysty, który głównie jest wydalany w formie niezmienionej, jak w przypadku grupy amfetamin.

Dla kokainy analizowana jest zawartość zarówno samej kokainy i jej głównego metabolitu - bezyloekgoniny (BEG). Tylko niewielki procent kokainy jest wydalany w postaci niezmienionej i obliczenia dotyczące szacowania ilości konsumentów są wykonywane głównie na podstawie badania metabolitu BEG. Jednak oznaczana jest zarówno kokaina jak i jej metabolit w celu rozróżnienia

konsumpcji od choćby usuwania nielegalnych substancji przez użytkowników i osoby zajmujące się rozprowadzaniem tych substancji.

Grupa amfetamin to grupa, w której monitoruje się stężenie substancji macierzystych, czyli amfetaminy, metamfetaminy, MDMA (ecstasy), ponieważ są one wydalone głównie w postaci niezmienionej.

Dla grupy kanabinoidów naturalnych oznacza się stężenie 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (THC-COOH), głównego metabolitu Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (THC) głównego aktywnego składnika konopi. THC-COOH może być wydalany w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym, ale połączenie to jest hydrolizowane przy udziale bakterii, które są obecne w ściekach oraz w systemie oczyszczania ścieków.

Pewna część badanych substancji może ulec degradacji zanim dotrze do miejsca próbkowania, czyli zanim osiągnie oczyszczalnię ścieków, dlatego też wyniki te mogą być niedoszacowane.

Następnym etapem jest ustalenie odpowiedniej metody analitycznej oznaczania wymienionych związków, tzw. DTRs. Próbkę ścieków miejskich były obciążane deuterowanymi wzorcami wewnętrznymi przed poddaniem ekstrakcji w fazie stałej (SPE). Analiza wymaga zastosowania wysoce selektywnych i zwalidowanych metod, jak chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią masową.

1.4 SZACOWANIE ILOŚCI DAWEK I OSÓB SPOŻYWAJĄCYCH SUBSTANCJE ODURZAJĄCE

Stężenia DTRs w próbkach ścieków odzwierciedlają ilości wydanych z moczem badanych związków i mogą być podstawą do oszacowania konsumpcji badanych substancji macierzystych – substancji odurzających. Na przykład około połowa dawki kokainy jest wydalana z moczem w postaci metabolitu BEG, a tylko niewielka część w formie niezmienionej. Dlatego do szacowania ilości kokainy konsumowanej przez lokalną populację zastosowano oznaczoną bezyloekgoninę BEG. Jednakże oznaczano również stężenie kokainy w celu sprawdzenia czy stosunek BEG/kokaina jest stały w celu potwierdzenia, iż obecność badanych substancji jest rezultatem konsumpcji kokainy. Gdyby miejsce poboru próbki było z jakiś powodów (zamierzonych czy przypadkowych) zanieczyszczone dużą ilością kokainy badany stosunek odbiegał by w sposób znaczący. Ładunki BEG w miejscu poboru wyrażone w g/dzień są obliczane na podstawie oznaczonego stężenia w próbce (ng/l) oraz przepływu ścieków (m^3 /dzień), a następnie mnożone przez współczynnik 2,33 w celu szacowania ładunku macierzystej kokainy. Współczynnik ten otrzymano przez podzielenie masy molowej BEG przez masę molową

kokainy (0,954) i pomnożeniu przez średni procent dawki kokainy, która według dostępnych badań jest wydalana w postaci BEG (45%). Obliczone ładunki kokainy są następnie łączone z ilością osób, która jest obsługiwana przez daną oczyszczalnię ścieków. Oszacowana konsumpcja (w gramach na dzień na 1000 osób) jest odnoszona do ogólnej populacji. Otrzymane wyniki można również przedstawić jako ilość dawek konsumowanych przez 1000 osób dziennie, przyjmując 100 mg za średnią dawkę kokainy wg zaleceń EMCDDA.

Podobna procedura jest stosowana do innych substancji odurzających. W przypadku grupy amfetamin zakłada się, że 30% amfetaminy, 43% metamfetaminy i 65% MDMA (ecstasy) jest wydalana z moczem w postaci niezmienionej. Szacunki dotyczące konsumpcji kanabinoidów bazują na oznaczeniach ładunków THC-COOH w ściekach przyjmują założenie, że na każdy miligram THC palonego 6 mikrogramów jest wydane z moczem jako THC-COOH, a stosunek THC/THC-COOH wynosi 0,91.

Ilość dawek konsumowanych przez badaną populację jest szacowana przez podzielenie całkowitej konsumpcji w miligramach przez wielkość typowej konsumowanej dawki: 100 mg dla kokainy, 30mg dla amfetaminy i metamfetaminy, 100 mg dla ecstasy and 125 mg for THC [1,6].

1.5 POWTARZALNOŚĆ OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Procedura opisana powyżej zawiera pewne ograniczenia dokładności otrzymanych wyników szacowania konsumpcji wynikające z przyjętych założeń. Chociażby wartości przyjęte dla metabolizmu badanych substancji, ilości substancji wydalanych w postaci zmienionej i niezmienionej z moczem. Wartości te przyjęte są z dostępnej literatury, jako wartości średnie eksperymentalnie zmierzone na niewielkiej liczbie zdrowych ochotników, stąd otrzymane dane mogą być niereprezentatywne dla całej populacji. Istnieje możliwość podniesienia dokładności i precyzji obliczeń dzięki wprowadzeniu nowych, bardziej aktualnych danych dotyczących metabolizmu badanych substancji, co wymaga nowych badań. Ponadto należy zawsze pamiętać, iż przeprowadzane szacunki dotyczące zwłaszcza ilości osób zażywających badane środki na danym terenie są przeprowadzone przyjmując średnie dawki środków odurzających przyjmowane w celu wystąpienia konkretnych efektów psychosomatycznych i nie jest możliwe wykonanie takich szacunków z uwzględnieniem zróżnicowania tych danych przy zwiększonych dawkach dla osób już uzależnionych. Inny potencjalnym źródłem błędów są dane dotyczące oczyszczalni ścieków i wielkości populacji obsługiwanej przez daną oczyszczalnię w czasie analizy próbek. O ile można dość dokładnie podać ilość osób obsługiwanych przez oczyszczalnię, zwłaszcza w ciągu tygodnia, o tyle trudno jest ustalić ilość osób w czasie weekendów. Dlatego też zwiększone wykrywane ilości substancji odurzających w ściekach w próbkach z dniach wolnych od pracy mogą być spowodowane wzrostem

liczby ludności na danym terenie, czego nie jesteśmy w stanie dokładnie ustalić i uwzględnić w końcowych szacunkach. Prowadzi to nas do wniosku, że szacunki konsumpcji badanych środków odurzających przeprowadzane tą metodą są bardzo użyteczne do badania profilu i monitorowania zażywanych środków przez badaną populację, przyzwyczajęń konsumentów i do szybkiej identyfikacji zmiany trendów, profilu zażywanych substancji. Chociaż najbardziej ciekawe i interesujące wszystkich są obliczenia dotyczące ilości osób spożywających, średnie dawki substancji odurzających i ilość dawek konsumowanych na danym terenie przez daną populację, to jednak dane te są szacunkowe i obarczone błędami. Na podstawie natomiast przeprowadzanego stałego monitorowania i badania stężeń substancji odurzających w ściekach miejskich stwierdzono we Włoszech, że konsumpcja kanabinoidów i heroiny w mieście Milan zmniejszyła się w roku 2007 w porównaniu z rokiem 2006 o około 30%, konsumpcja kokainy utrzymuje się na stałym, wysokim poziomie, a konsumpcja amfetaminy i innych środków z tej grupy wzrosła znacząco o 127%. Sugeruje to w sposób wyraźny zmianę przyzwyczajęń konsumentów, choć aby wyciągać takie wnioski badania muszą być prowadzone w sposób ciągły i przez dłuższy okres czasu. Uzyskanie jednak takiej informacji jest bardzo przydatne dla instytucji zajmujących się badaniem zjawiska narkomanii i daje możliwość nakierowania prowadzonych akcji na konkretne substancje uwzględniając profil konsumpcji badanych substancji odurzających.

Ważnym elementem dla prowadzonych badań jest miejski system kanalizacji. Ze względu na to, że stworzenie takiego systemu kanalizacji, który umożliwiającego przyjęcie nawet największych ładunków w czasie deszczowej pogody jest bardzo kosztowne, akceptuje się powszechnie systemy dopuszczające powstawanie okresowych przelewów, czy nadmiernego przepływu przez system kanalizacji. W czasie silnych opadów i ulew pojemności zbiorników zostają przekroczone co skutkuje tym, iż pewne ilości substancji wraz ze ściekami wydostają się z systemu. Oznacza to, iż pewne, trudne do określenia, ilości substancji zostają utracone w czasie intensywnych opadów. Prace badawcze w Niemczech i Szwajcarii wykazały, iż możemy przyjąć, że około 50% rozcieńczonej wody wypływa w takich warunkach z systemu, co można przenieść na utratę oznaczanych substancji w badaniach długoterminowych na około 1%. Dlatego też zaleca się prowadzenie badań w tzw. porach suchych, czy nie obfitujących w opady atmosferyczne. Inną sprawą jest istnienie przecieków w rozległych systemach kanalizacyjnych, które są nieuniknione i jednocześnie niełatwe do wykrycia. W przypadku badania zawartości leków czy innych substancji w ściekach należy również brać pod uwagę możliwość transformacji badanych substancji w ściekach. Przeprowadzone w roku 2007 badania przez Hestley wykazały znaczącą różnicę porównując stosunek kokainy i jej głównego metabolitu w próbce moczu i w próbce ścieków miejskich, co świadczy, iż substancja ta ulega w dość znacznym stopniu transformacji w ściekach. Castiglioni prowadziła w roku 2006 badania obciążając próbki

ścieków badanymi substancjami i porównując stężenia substancji początkowe i po przechowywaniu próbek przez okres 3 dni. Stężenia kokainy, norkokainy zmniejszyły się o 36 i 15% a wzrosły stężenia metabolitów benzyloekgoniny i norbenzyloekgoniny o 14 i 13%.

Do końcowych obliczeń oszacowania konsumpcji badanych środków konieczne są również dane dotyczące przepływów w danej oczyszczalni ścieków. Badania wykazały, że nawet w optymalnych warunkach względna niepewność wartości przepływów wynosi około 20%. Dla obliczeń ładunków poszczególnych substancji, które są kombinacją przepływów i oznaczeń stężeń dla związków chemicznych średnia niepewność może być przyjęta na poziomie 25-50% w zależności od czasowej obecności badanych substancji w ściekach.

1.6 MOŻLIWOŚCI I PERSPEKTYWY BADAŃ

Podsumowując, obliczanie ładunków badanych substancji poprzez oznaczanie tych substancji w ściekach jest bardzo interesującym, innowacyjnym podejściem do problemu monitorowania konsumpcji badanych środków. Wymagają one jednakże, nie tylko znajomości metabolizmu badanych substancji, ale także danych socjologiczno-ekonomicznych i znajomości specyfiki systemu oczyszczania ścieków i kanalizacji.

Opisana metodyka wymaga jeszcze ciągle odpowiedniej walidacji. Chociaż badania takie są przeprowadzane obecnie w coraz większej liczbie krajów, nie tylko europejskich, to jednak metodologia ich wymaga ujednolicenia. Różnice dotyczą wielu aspektów, od sposobu pobierania próbek, miejsca i ilości, poprzez metody ekstrakcji badanych substancji z próbki środowiskowej do ostatecznych obliczeń szacunkowych. Opracowanie znormalizowanej metodyki umożliwiłoby bezpośrednie porównanie otrzymanych wyników pomiędzy różnymi ośrodkami wykonującymi takie badania oraz dyskusję na temat otrzymanych wyników.

2 METODYKA I BADANIE ŚCIEKÓW W POZNANIU

2.1 POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Prace rozpoczęto w czerwcu 2009r. od uzgodnienia z oczyszczalnią ścieków najmniej uciążliwego dla zakładów i najbardziej odpowiedniego ze względu na „wydajność metody” sposobu pobierania prób. Centralna Oczyszczalnia Ścieków Aquanet Sp. z o.o. w Poznaniu obsługiwała w roku 2009 praktycznie całe miasto (Poznań, Czerwonak, Mosina, Suchy Las, Swarzędz, Tarnowo Podgórne, Pobiedziska). Z powodu remontów kilku małych oczyszczalni ścieki miejskie były przepompowywane w okresie do listopada 2009 roku do oczyszczalni w Koziegłowach. Od listopada 2009 roku uruchomiono Lewobrzeżną Oczyszczalnię Ścieków, która obsługuje około 30% ścieków. Całość ścieków dopływających do centralnej i lewobrzeżnej oczyszczalni to około 150 tysięcy m³/dobę. Ustalono zatem, iż wystarczające do badań będzie pobieranie próbek tylko z jednej Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach, co znacznie ułatwiło pracę, a następnie uwzględniono ilość osób obsługiwanych przez centralną oczyszczalnię w różnych okresach badań do końcowych obliczeń.

Próbki pobierane były przez pracowników oczyszczalni dwa razy w tygodniu w ilości 5 L w okresie od czerwca 2009 roku do grudnia 2010 roku. Próbki te pobierano z osadnika w miejscu jeszcze przed fizyczną i chemiczną obróbką ścieków, z wyjątkiem sedimentacji. Wielkości przepływów konieczne do obliczeń zostały udostępnione przez głównego technologa oczyszczalni. Pobrane próbki były w tym samym dniu poddawane analizie w Katedrze Chemii Analitycznej.

Po przewiezieniu do Zakładu ścieki były filtrowane z przepływem wymuszonym próżnią przy pomocy sącza średnio twardego i dwa razy przy pomocy filtra typu Glass-fiber GF/A (Whatman, Kent, UK) oraz przez mikrobiologiczne sączi membranowe z octanu celulozy dla fazy wodnej (Cellulose acetate 20 µm-47 mm, Gema Medical, Spain). Następnie przed poddaniem przesącza ekstrakcji na kolumnkach narc-2 (speed disc column, 10µm, 6 ml, Baker) oraz/lub OASIS MCX (60mg, 3cc, Waters) do całej próbki ścieków dodawano po 8 ng wzorców deuterowanych oznaczanych substancji. Kolumnki Narc-2 zawierają mieszaną zmodyfikowaną fazę odwróconą o silnych właściwościach kationowymiennych do ekstrakcji związków zasadowych, neutralnych oraz kwasowych. Próbki ścieków przed poddaniem ekstrakcji były doprowadzane do pH 7,0±0,4 za pomocą buforu fosforanowego. Kolumnki Narc-2 były kondycjonowane za pomocą : 2 ml metanolu, 2 ml wody dejonizowanej oraz 2 ml buforu fosforanowego o pH 7. Następnie ekstrakcji pod ciśnieniem poddawano przesączone próbki ścieków. Po ekstrakcji kolumnki przemywano 2 ml wody dejonizowanej, 0,5ml 0,1 M kwasu solnego i 0,5 ml metanolu. Suszono kolumnki pod ciśnieniem

przez 20-30 minut. Substancje kwasowe i obojętne wymywano następnie za pomocą mieszaniny chloroform : izopropanol (80:20), a zasadowe mieszaniną chloroform : izopropanol : wodorotlenek amonu (80:20:3).

Próbki ścieków przed ekstrakcją za pomocą kolumnienek Oasis Waters również zawierających mieszaną odwróconą fazę kationowymienną doprowadzano do pH=2,0 za pomocą stężonego (37%) kwasu solnego. Kolumnienki kondycjonowano 6 ml metanolu, 3 ml wody dejonizowanej i 3 ml wody zakwaszonej do pH=2. Pod ciśnieniem przesączano próbkę ścieków i po wysuszeniu kolumnienek pod ciśnieniem przez 5 minut wymywano badane substancje za pomocą 3 ml metanolu i 3 ml 2% roztworu wodorotlenku amonu w metanolu.

Próbki po ekstrakcji za pomocą SPE odparowywano pod strumieniem azotu do suchej pozostałości. W ten sposób 4 próbki – każda przygotowana z 5L ścieków – łączono i oznaczano substancje odurzające za pomocą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Przygotowane próbki w postaci suchej pozostałości rozpuszczano w 200 µl stosowanej fazy ruchomej i nastrzykiwano 20 µl próbki celem oznaczenia.

2.2 ANALIZA ILOŚCIOWA

Analizę ilościową przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczowego z potrójnym kwadrupolowym detektorem masowym – Agilent 6410B Triple Quad LC/MS System. W pierwszym kwadrupolu zachodzi rozdzielanie jonów macierzystych, które ulegają fragmentacji w haksapolu i następnie są rozdzielane w drugim kwadrupolu. Często dwa i więcej jonów macierzystych i powstałych z nich jonów jest monitorowanych w trybie MRM (Multiple Reaction Monitoring). Umożliwia to analizę ilościową na najwyższym poziomie z identyfikacją i oznaczaniem wybranych związków chemicznych, dając nie tylko pewność, iż oznaczane są badane związki (a nie bardzo zbliżone budową), ale również możliwa jest analiza ilościowa związków występujących w ilościach śladowych w próbkach biologicznych. Otrzymane wyniki charakteryzuje duża precyzja (powtarzalność) i dokładność.

Analizę chromatograficzną wykonano z zastosowaniem kolumny Agilent Zorbax XDBC18 (4,6x50mmx1,8µm). Fazą ruchomą były roztwory: A- woda z buforem mrówczanowym (pH~3,2), B – acetonitryl z gradientem 10 do 70% acetonitrylu (6,5 min).

W analizach zastosowano wzorce badanych substancji: amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA, MDEA, kokaina, benzyloekgonina, THC, THC-COOH oraz deuterowane wzorce: amfetamina-D6, metamfetamina-D9, MDA-D5, MDMA-D5, MDEA-D5, kokaina-D3, benzyloekgonina-D3, THC-D3, THC-COOH-D3. Wszystkie wzorce były zakupione z firmy Certilliant (Analytical Reference Standards).

Wzorce te zakupione jako roztwory metanolowe (1mg/1ml) zostały rozcieńczone metanolem do stężenia 10ng/μl i przechowywane w temperaturze -20°C w ciemności.

Analiza spektrometrią mas była przeprowadzana w trybie MRM (Multiple Reaction Monitoring) i analizowano jony fragmentacyjne protonowanych i deprotonowanych jonów pseudomolekularnych każdej badanej substancji i jej deuterowanego odpowiednika (Tab.1). Wyboru każdego z monitorowanych jonów oraz optymalizacji energii w komorze kolizyjnej i innych parametrów przyrządu dokonano przy użyciu roztworów substancji wzorcowych.

Dla każdego z badanych związków analizowano 2 jony: jon macierzysty i jon fragmentacyjny. Czasy retencji były porównywane z czasami retencji substancji wzorcowych w celu pełnej identyfikacji związków. Każda substancja była oznaczana przy użyciu wzorca wewnętrznego, którym były ich deuterowane odpowiedniki.

Związek	Czas retencji (min)	Jon macierzysty m/z	Jon potomny I (Product ion I) m/z	Jon potomny II (Product ion II) m/z
amfetamina-D6	3.4	142.1	125.1	93.1
amfetamina	3.4	136	119.1	91.1
MDA-D5	3.6	185	168.1	110.1
MDA	3.6	180.1	163	105.1
metamfetamina-D9	3.8	159.2	125.1	93.05
metamfetamina	3.8	150.1	119.1	91
MDMA-D5	3.9	199.1	165	107.1
MDMA	3.9	194.1	163.1	105.1
benzyloekgonina-D3	5.1	293.1	168.1	105.1
benzyloekgonina	5.1	290.1	171.1	105.1
kokaina	5.5	304.2	182.1	105.1

kokaina-D3	5.5	307.2	185.1	-
THC-D3	7.5	318.3	262.1	-
THC	7.5	315.3	135.0	-
THC-COOH-D3	4.1	348.3	196.1	-
THC-COOH	4.1	345.3	193.3	-

Tab.1 Warunki oznaczania badanych substancji metodą HPLC-MS-MS

8 punktowa krzywa kalibracyjna była przygotowana poprzez nastrzyknięcie roztworów wzorcowych zawierających różną ilość każdej z badanych substancji należących do grupy amfetamin, czyli: amfetaminy, metamfetaminy, MDA i MDMA (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 ng) oraz obciążano deuterowanym wzorcem wewnętrznym w ilości 30 ng.

W przypadku kokainy i jej głównego metabolitu beznyloekgoniny (BEG) krzywa wzorcowa była przygotowana w podobny sposób, czyli w zakresie stężeń od 4 do 32 ng/l, natomiast dla kanabinoidów stężenia do krzywej wzorcowej były z zakresu 100 do 550 ng/l. Próbkę obciążano wzorcem wewnętrznym w ilości odpowiednio 30 ng i 320ng.

Wyniki testów wg metodyki Funka podane w rozdziale 3 dotyczącym walidacji: test na homogenność, liniowość, outliery, zabezpieczenie dolnej granicy nie zostały przedstawione w tabelach, lecz wszystkie zostały przeprowadzone z pozytywnym rezultatem.

Wpływ matrycy biologicznej na analizowane wyniki zbadano analizując wyniki otrzymane dla próbek ścieków 50 ml obciążonych wzorcami badanych substancji. Zbadany odzysk dla całego procesu przygotowania próbki, sączenia i ekstrakcji wynosił w granicach 0.8 do 0.93.

Określono również limit detekcji i limit oznaczalności na podstawie oznaczeń próbek ścieków obciążonych różnymi ilościami substancji wzorcowych analogicznie jak dla krzywych wzorcowych. Walidację przeprowadzono według procedury Funka, która jest dokładnie opisana w rozdziale 3. Wyniki walidacji zebrano w tabeli 2.

Substancja	a	b	Odch. Stand. resztek	Odch. Stand. procesu	Wsp.Zmien. Procesu (%)	Limit Decyzji DL (ng/l)	Limit Detekcji LOD (ng/l)	Limit Oznacz. LOQ (ng/l)
	y=bx+a					wg procedury Funka (DIN 32645)		
amfetamina	531	1270	2.57	0.20	1.12	0.36	0.71	1.07
						dla zakresu 1-2.4		
metamfetamina	1555 5	126.7	6.96	0.55	3.06	0.81	1.65	2.32
						dla zakresu 3.5 – 7		
MDMA	40.28	1143	6.09	1.11	6.09	0.89	1.77	2.66
						dla zakresu 3-4.8		
BEG	126.7	46.8	31.30	0.55	3.45	0.52	1.03	1.55
						dla zakresu 2-3.2		
THC-COOH	73.04	111.3	83.42	0.75	2.79	0.46	0.54	0.99
						dla zakresu 1.5-3.3		

Tab.2 Walidacja metody wg procedury W. Funka

2.3 SZACOWANIE ILOŚCI KONSUMPCJI SUBSTANCJI ODURZAJĄCYCH

Punktem początkowym w tych badaniach jest wybranie grupy analizowanych substancji. Spośród wielu związków wybrano te o największym znaczeniu: grupę amfetamin, kokainę i kanabinoidy. Następnie określono odpowiednio związki, które wydalone dostają się do ścieków i które są wskaźnikami (związkami celowymi – targets) analitycznymi do monitorowania konkretnych substancji w próbkach ścieków. Te substancje określane są jako DTRs (Drug Target Residues). Wybrano je na podstawie danych dotyczących metabolizmu badanych związków i ich obecności w moczu i są to najczęściej główne metabolity jak w przypadku kanabinoidów i kokainy, albo związek macierzysty, który głównie jest wydalany w formie niezmienionej, jak w przypadku grupy amfetamin.

Jak już wspomniano we wstępie szacowanie konsumpcji związków odurzających przez lokalną populację opiera się na oznaczaniu konkretnych związków, określanych jako tzw. drug target residues, czyli DTRs. Idealny taki związek to substancja macierzysta lub metabolit, który jest głównym związkiem i najlepiej wyłącznym wydalanym do ścieków, który jest jeszcze odpowiednio trwały w badanym środowisku. Związki te wybrano na podstawie badań metabolizmu substancji odurzających i badań trwałości tych związków. Dla kokainy i kanabinoidów wybranymi związkami są główne metabolity, natomiast dla grupy amfetamin związki macierzyste, które są wydalone w postaci niezmienionej z moczem. Wydalane metabolity badanych substancji łączą się w moczu z kwasem glukuronowym, jednak połączenia te są nietrwałe i ulegają hydrolizie w środowisku ścieków, dlatego związki te wyeliminowano jako potencjalne DTRs. Wybrane DTRs dla każdej z badanych substancji odurzających zebrano w tabeli 3.

Substancja	DTR	Związek pomiędzy substancją a DTR	Procent wydany jako DTR	Współ. Molowy Zw.Mac./ DTR	Współcz. korygujący
Kokaina	BE kokaina	główny metabolit zw. macierzysty i metabolit	45	1.05	2.33
Kanabinoidy	THC-COOH	główny metabolit	42	1.29	3.07
Amfetamina	amfetamina	zw. macierzysty i główny metabolit	30	1.0	3.3
Metamfetamina	Metamfetamina	zw. macierzysty i główny metabolit	0.6	0.91	152
Ecstasy	Ecstasy	zw. macierzysty i główny metabolit	65	1	1.5

Tab.3 Związki wybrane do monitorowania zawartości substancji odurzających w ściekach.

Na podstawie oznaczonego stężenia DTR w badanych próbkach ścieków (ng/L) pomnożono przez średni przepływ wody w oczyszczalni otrzymując tzw. dzienny ładunek danej oczyszczalni (g/dzień), a następnie znormalizowano dane do rozmiarów lokalnej populacji obsługiwanej przez daną oczyszczalnię otrzymano współczynnik wydalania **DTR (mg/dzień/1000 osób)**, czyli **DTR extraction rates (współczynnik wydalania DTR)**.

Łączny współczynnik konsumpcji danej substancji (Collective drug consumption rates) – szacowanie ilości badanego związku konsumowanego przez populację obliczono biorąc pod uwagę procent badanego związku wydany jako DTR oraz współczynnik molowy DTR/zw. macierzysty

- **Np.** kokaina (MW 303) w 45% wydany jako BE (MW 289); oznaczono współczynnik wydalania 100mg/dzień/1000 osób co odpowiada

$$100/0,45 \cdot 303/289 = 233 \text{ mg kokainy jest konsumowane przez 1000 osób dziennie}$$

Szacowanie ilości tzw. skonsumowanych dawek badanej substancji

Ilość dawek konsumowanych przez badaną populację jest szacowana przez podzielenie całkowitej konsumpcji w miligramach przez wielkość typową, średniej konsumowanej dawki: 100 mg dla kokainy, 30mg dla amfetaminy i metamfetaminy, 100 mg dla ecstasy and 125 mg for THC [1,6].

Zaproponowane podejście do badanego problemu umożliwia bezpośrednie obliczenia ilości konsumowanych substancji bez wskazania na ilość osób uzależnionych

Zalety przedstawionej metodyki:

- **Obiektywny ilościowy pomiar prowadzący do realistycznego oszacowania rodzaju i ilości konsumowanych środków odurzających przez lokalną społeczność**
- **Wyniki są otrzymywane w krótkim czasie (kilka dni po dokonaniu poboru i oznaczeniu próbki środowiskowej)**
- **Biorąc pod uwagę inne dane (farmakokinetyczne, średnie dawki czy czystość produktów dostępnych na rynku) można precyzyjnie określić poziom i profil konsumowanych środków odurzających**

Dzięki nowemu innowacyjnemu podejściu do szacowania wielkości konsumpcji badanych środków odurzających można otrzymać dokładny obraz profilu spożywanych środków wraz z szacunkami ilościowymi. Takie badania mogą być bardzo przydatne do szybkiego monitorowania zmian w profilu spożywania badanych środków, co umożliwi ukierunkowanie podejmowanych konkretnych środków i działań dla organów zajmujących się przeciwdziałaniem narkomanii.

2.4 WYNIKI OZNACZEŃ I OSZACOWAŃ

Poniżej przedstawiono tabele zawierające wyniki oznaczeń i estymacji oraz wykresy przedstawione na ich podstawie. W tabelach przedstawiono kolejno:

zawartość ng/l – zawartość obliczona z dwóch analiz (miesięczna) (próbki pobierane po 5 litrów dwa razy w tygodniu, analiza raz na dwa tygodnie)

DTR g/miesiąc – DTR (Drug Target Residues) metabolity substancji odurzających; wyrażone w gramach na miesiąc

DTR mg/dzień – DTR przeliczone na mg i podzielone przez dni w miesiącu

DTR/mg/dzień/1000 osób - DTR mg/dzień standaryzowane na 1000 osób

DTR dzień/1000 osób - DTR/mg/dzień/1000 osób pomnożone przez współczynnik korekcyjny wynikający ze stosunku mas molowych substancji odurzających do ich metabolitów uwzględniając metabolizm

ilość osób/1000 – ilość osób zażywających typowe dawki w przeliczeniu na 1000 osób (za typowe dawki przyjęto: amfetamina i met amfetamina 30 mg, MDMA i kokainy 100 mg oraz 125 mg kanabinoidów w formie wypalanej zawierającej 14% THC)

Dla każdego z wymienionych współczynników podano dolną oraz górną granicę.

W pierwszej połowie stycznia 2009 r. analizując BEG wykazano stężenie na granicy oznaczalności 1.52 ng/l (dolna granica oznaczenia jest poniżej granicy oznaczalności). Ponieważ wszystkie inne próbki nie wykazały poziomu sygnału powyżej granicy oznaczalności a nawet limitu decyzji, wynik ten został zaklasyfikowany jako wątpliwy.

1		Czerwiec 2009			Lipiec 2009			Sierpień 2009			Wrzesień 2009		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
AMFETAMIN	Zawartość ng/L	0.2571	0.2278	0.2859	0.3203	0.2916	0.3486	0.3982	0.4262	0.4539	0.3373	0.3087	0.3655
	DTR g/miesiąc	1.0951	0.9704	1.2177	1.4030	1.2419	1.5270	1.5113	1.6175	1.7225	1.24769	1.1418	1.3520
	DTR mg/dzień	36.5031	32.3491	40.5901	46.7669	42.5705	50.9013	50.3779	53.9195	57.4171	41.5899	38.0604	45.0687
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.0664	0.0588	0.0738	0.0851	0.0774	0.0925	0.0916	0.0988	0.1044	0.0756	0.0692	0.0819
	Konsumpcja AMF mg/dzień/1000 osób	0.2191	0.1942	0.2436	0.2807	0.2555	0.3056	0.3024	0.3236	0.3447	0.2496	0.2284	0.2705
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0073	0.0064	0.0081	0.0093	0.0085	0.0101	0.0100	0.0108	0.0115	0.0083	0.0076	0.0090
METAMFET	Zawartość ng/L	1.2153	1.1428	1.2896	1.3460	1.2719	1.4225	1.4615	1.3857	1.5012	1.3830	1.3084	1.4602
	DTR g/miesiąc	5.1764	4.8673	5.4928	5.7329	5.4175	6.0586	5.5460	5.2583	5.6964	5.1149	4.8392	5.4003
	DTR mg/dzień	172.5484	162.2430	183.0965	191.0962	180.5833	201.9523	184.8681	175.2794	189.883	170.4981	161.3058	180.0133
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.3139	0.2951	0.3331	0.3476	0.32851	0.3674	0.3363	0.3188	0.3454	0.3101	0.2934	0.3275
	Konsumpcja MAF mg/dzień/1000 osób	0.7219	0.6788	0.7661	0.7995	0.7555	0.8449	0.7735	0.7334	0.7944	0.7133	0.6749	0.7532
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0241	0.0226	0.0255	0.0266	0.0252	0.0282	0.0257	0.02444	0.0264	0.0237	0.0225	0.0251

M D M A	Zawartość ng/L	1.5644	1.4979	1.6314	1.5356	1.4693	1.6025	1.2918	1.2257	1.3580	1.3783	1.3122	1.4446
	DTR g/miesiąc	6.6629	6.3799	6.9485	6.7257	6.4351	7.0187	4.9020	4.6511	5.1529	5.0976	4.8531	5.3428
	DTR mg/dzień	222.0955	212.6638	231.6175	224.1901	214.5047	233.9582	163.4013	155.0370	171.7631	169.9204	161.7720	178.0920
	DTR mg/ dzień/ 1000 osób	0.4040	0.3868	0.4213	0.4078	0.3902	0.42560	0.29725	0.2820	0.3125	0.3091	0.2942	0.3239
	Konsumpcja MDMA mg/dzień/1000 osób	0.6060	0.5803	0.6320	0.6117	0.5853	0.6384	0.4458	0.4230	0.4686	0.4636	0.4414	0.4859
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0047	0.0044	0.0048	0.0047	0.0045	0.0049	0.0034	0.0032	0.0036	0.0035	0.0034	0.0037

Tabela 4. Wyniki oznaczeń i szacunki dla grupy amfetamin od czerwca do sierpnia 2009

		Październik 2009			Listopad 2009			Grudzień 2009		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
A	<i>Zawartość ng/L</i>	0.3059	0.2770	0.3345	0.3059	0.2770	0.3343	0.4784	0.4492	0.5059
M	<i>DTR g/miesiąc</i>	1.1639	1.0541	1.2720	1.1639	1.0541	1.2720	1.9387	1.8201	2.0502
F	<i>DTR mg/dzień</i>	38.7978	35.1377	42.4026	38.7978	35.1377	42.4026	64.6241	60.6703	68.3409
E	<i>DTR mg/dzień/ 1000 osób</i>	0.0705	0.0639	0.0771	0.0705	0.0639	0.0771	0.1175	0.1103	0.1243
T	<i>Konsumpcja AMF mg/dzień/1000 osób</i>	0.2329	0.2109	0.2545	0.2329	0.2109	0.2545	0.3879	0.3642	0.4102
	<i>Ilość dawek/ dzień/1000 osób</i>	0.0077	0.0070	0.0084	0.0077	0.0070	0.0084	0.0129	0.0121	0.0136
M	<i>Zawartość ng/L</i>	1.3748	1.3003	1.4518	1.2617	1.1887	1.3368	1.4131	1.3381	1.4909
E	<i>DTR g/miesiąc</i>	5.2309	4.9477	5.5240	4.8604	4.5790	5.1493	5.7262	5.4222	6.0415
T	<i>DTR mg/dzień</i>	174.3658	164.9242	184.1338	162.0139	152.6348	171.6447	190.8743	180.7414	201.3830
A	<i>DTR mg/dzień/ 1000 osób</i>	0.3172	0.3000	0.3349	0.2947	0.2776	0.3122	0.3472	0.3288	0.3663
M	<i>Konsumpcja MAF mg/dzień/1000 osób</i>	0.7295	0.6900	0.7704	0.6779	0.6386	0.7182	0.7986	0.7562	0.8426
F	<i>Ilość dawek/ dzień/1000 osób</i>	0.0243	0.0230	0.0257	0.0226	0.0213	0.0239	0.0266	0.0252	0.0281

M D M A	Zawartość ng/L	1.3868	1.3206	1.4532	1.8223	1.7543	1.8915	1.7072	1.6401	1.7411
	DTR g/miesiąc	5.3422	5.0870	5.5981	6.9338	6.6753	7.1971	6.9178	6.6457	7.0553
	DTR mg/dzień	178.0736	169.5695	186.6047	231.1276	222.5106	239.9043	230.5934	221.5266	235.1796
	DTR mg/ dzień/ 1000 osób	0.3239	0.3084	0.3394	0.4204	0.4047	0.4364	0.4194	0.4029	0.4278
	Konsumpcja MDMA mg/dzień/1000 osób	0.4859	0.4627	0.5092	0.6307	0.6071	0.6546	0.6292	0.6044	0.6417
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0037	0.0035	0.0039	0.0048	0.0046	0.0050	0.0048	0.0046	0.0049

Tabela.5 Wyniki oznaczeń i szacunki dla grupy amfetamin od października do grudnia 2009

1		Styczeń 2010			Luty 2010			Marzec 2010			Kwiecień 2010		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
AMFETAMIN	Zawartość ng/L	0.3386	0.3100	0.3668	0.2536	0.2243	0.28245	0.2692	0.2401	0.2979	0.2935	0.2645	0.3219
	DTR g/miesiąc	0.9497	0.8694	1.0287	0.7308	0.6464	0.81382	1.0518	0.9378	1.1639	0.8998	0.8109	0.9872
	DTR mg/dzień	31.6569	28.9832	34.2922	24.3601	21.5472	27.1275	35.0597	31.2625	38.7968	29.9928	27.0327	32.9075
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.0575	0.0527	0.0623	0.0443	0.0391	0.0493	0.0637	0.0569	0.07057	0.0545	0.0492	0.0598
	Konsumpcja AMF mg/dzień/1000 osób	0.1900	0.1739	0.2058	0.1462	0.1293	0.1628	0.2104	0.1876	0.2329	0.1800	0.1623	0.1975
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0063	0.0058	0.0068	0.0049	0.0043	0.0054	0.0070	0.0062	0.0076	0.0062	0.0054	0.0066
METAMFET	Zawartość ng/L	1.4068	1.3318	1.4845	1.3692	1.2948	1.4462	1.0291	0.9574	1.1014	0.9649	0.8934	1.0367
	DTR g/miesiąc	3.9451	3.7349	4.1630	3.94522	3.7308	4.1668	4.0206	3.7409	4.3031	2.9589	2.7396	3.1792
	DTR mg/dzień	131.5049	124.4996	138.7669	131.5073	124.3627	138.8963	134.0216	124.6973	143.4371	98.6305	91.3228	105.9742
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.2392	0.2264	0.2524	0.2392	0.2262	0.2526	0.2438	0.2268	0.2609	0.1794	0.1661	0.1927
	Konsumpcja MAF mg/dzień/1000 osób	0.5502	0.5209	0.5806	0.5502	0.5203	0.5811	0.5607	0.5217	0.6001	0.4126	0.3821	0.4434
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0185	0.0173	0.0193	0.0183	0.0173	0.0193	0.0186	0.01739	0.0200	0.0137	0.0127	0.0148

M D M A	Zawartość ng/L	2.0292	1.9592	2.1009	1.9195	1.8507	1.9898	1.8298	1.7618	1.8991	1.8298	1.7618	1.8991
	DTR g/miesiąc	5.6905	5.4944	5.8915	5.5307	5.3325	5.7332	7.1490	6.8833	7.4197	5.6110	5.4024	5.8234
	DTR mg/dzień	189.6839	183.1476	196.3844	184.3582	177.7510	191.1087	238.3029	229.4457	247.3262	187.0334	180.0821	194.1150
	DTR mg/ dzień/ 1000 osób	0.3450	0.3331	0.3572	0.3353	0.3233	0.3476	0.4335	0.4173	0.4499	0.3402	0.3275	0.3531
	Konsumpcja MDMA mg/dzień/1000 osób	0.5175	0.4997	0.5358	0.5030	0.4850	0.5214	0.6502	0.6260	0.6748	0.5103	0.4913	0.5296
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0039	0.0038	0.0041	0.0038	0.0037	0.0040	0.0050	0.0048	0.0051	0.0039	0.0037	0.0040

Tabela 6. Wyniki oznaczeń i szacunki dla grupy amfetamin od stycznia do kwietnia 2010

1		Maj 2010			Czerwiec 2010			Lipiec 2010			Sierpień 2010		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
AMFETAMIN	Zawartość ng/L	0.5886	0.5615	0.6154	0.6861	0.6594	0.7126	0.2536	0.2243	0.2824	0.2384	0.2089	0.2673
	DTR g/miesiąc	1.9562	1.8661	2.0454	1.7704	1.7015	1.8388	0.70565	0.6241	0.7858	0.7632	0.6691	0.8559
	DTR mg/dzień	65.2060	62.2052	68.1816	59.0143	56.71860	61.2964	23.5218	20.8060	26.1940	25.4428	22.3034	28.5308
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.1186	0.1131	0.1240	0.1073	0.1031	0.1115	0.0427	0.0378	0.0476	0.0462	0.0405	0.0519
	Konsumpcja AMF mg/dzień/1000 osób	0.3914	0.3734	0.4093	0.3542	0.3404	0.3679	0.1412	0.1249	0.1572	0.1527	0.1338	0.1713
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0130	0.0124	0.0136	0.0118	0.0113	0.0122	0.0047	0.0041	0.0052	0.0050	0.0463	0.0071
METAMFET	Zawartość ng/L	0.8132	0.7413	0.8847	0.8305	0.7587	0.9020	0.6885	0.6155	0.7604	0.6643	0.5911	0.7363
	DTR g/miesiąc	2.7028	2.4636	2.9404	2.1432	1.9577	2.3276	1.9154	1.7123	2.1153	2.1271	1.8925	2.3575
	DTR mg/dzień	90.0939	82.1214	98.0143	71.4403	65.2598	77.5883	63.8482	57.0774	70.5128	70.9033	63.0855	78.5848
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.1638	0.1493	0.1783	0.1299	0.1187	0.1411	0.1161	0.1038	0.1282	0.1289	0.1147	0.1429
	Konsumpcja MAF mg/dzień/1000 osób	0.3769	0.3436	0.4100	0.2989	0.2730	0.3246	0.2671	0.2388	0.2950	0.2966	0.2639	0.3288
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0125	0.0114	0.0136	0.0099	0.0091	0.0108	0.0089	0.0079	0.0098	0.0099	0.0087	0.0109

M D M A	Zawartość ng/L	1.8238	1.7558	1.8930	1.7483	1.6809	1.8168	1.1418	1.0752	1.2079	1.1173	1.0506	1.1835
	DTR g/miesiąc	6.0613	5.8355	6.2914	4.5114	4.3374	4.6881	3.1763	2.9912	3.3604	3.5772	3.3638	3.7892
	DTR mg/dzień	202.0457	194.5175	209.7137	150.3803	144.5831	156.2704	105.8786	99.7085	112.0134	119.2428	112.1292	126.3095
	DTR mg/ dzień/ 1000 osób	0.3675	0.3538	0.3815	0.2735	0.2630	0.2842	0.1926	0.1813	0.2037	0.2169	0.2039	0.2297
	Konsumpcja MDMA mg/dzień/1000 osób	0.5513	0.5307	0.5722	0.4103	0.3945	0.4264	0.2889	0.2720	0.3056	0.3253	0.3059	0.3446
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0042	0.0040	0.0044	0.0031	0.0030	0.0032	0.0022	0.0020	0.0023	0.0025	0.0023	0.0026

Tabela 7. Wyniki oznaczeń i szacunki dla grupy amfetamin od maja do sierpnia 2010

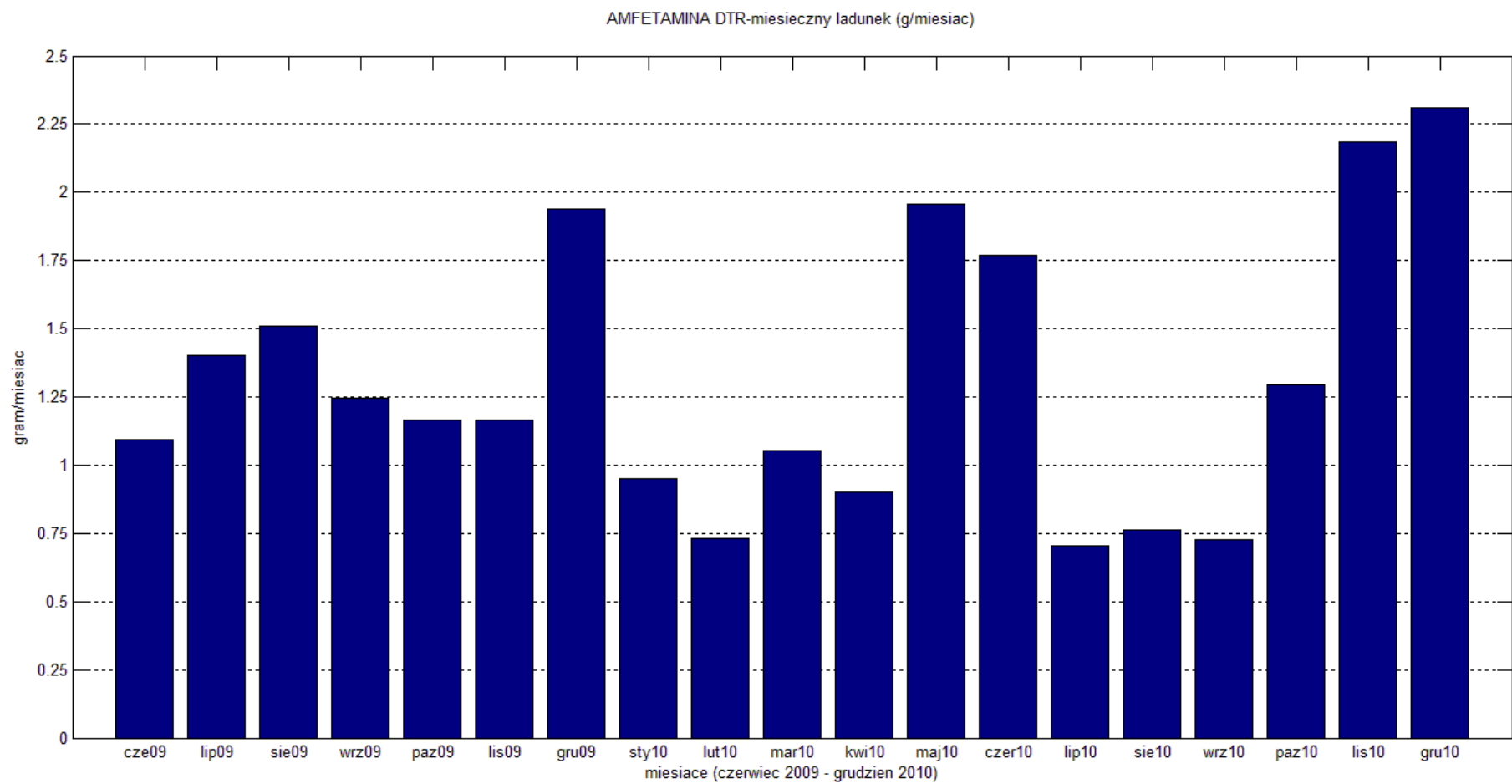
1		Wrzesień 2010			Październik 2010			Listopad 2010			Grudzień 2010		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
AMFETAMIN	Zawartość ng/L	0.2345	0.2050	0.2634	0.4836	0.45589	0.5110	0.6410	0.6141	0.6677	0.7067	0.6801	0.7332
	DTR g/miesiąc	0.7269	0.6356	0.8167	1.2935	1.21940	1.3668	2.1834	2.0919	2.27436	2.3085	2.2215	2.3949
	DTR mg/dzień	24.2322	21.1884	27.2259	43.1177	40.6467	45.5618	72.7828	69.7319	75.8120	76.9513	74.0528	79.8315
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.0440	0.0385	0.0495	0.0784	0.0739	0.0828	0.1324	0.1268	0.1379	0.1399	0.1347	0.1452
	Konsumpcja AMF mg/dzień/1000 osób	0.1454	0.1271	0.1634	0.2588	0.2440	0.2735	0.4369	0.4186	0.4551	0.4619	0.4445	0.4792
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0048	0.0042	0.0054	0.0086	0.0081	0.0091	0.0145	0.0139	0.0152	0.0153	0.0148	0.0159
METAMFET	Zawartość ng/L	0.7624	0.6901	0.8340	1.2417	1.1688	1.3164	0.8728	0.8011	0.9443	0.9084	0.8368	0.9800
	DTR g/miesiąc	2.36380	2.1395	2.5857	3.3212	3.1264	3.5210	2.9730	2.7289	3.2166	2.9674	2.7336	3.2013
	DTR mg/dzień	78.7935	71.3195	86.1905	110.7090	104.2159	117.3673	99.1016	90.9647	107.2216	98.9133	91.1213	106.7104
	DTR mg/dzień/ 1000 osób	0.1433	0.1297	0.1567	0.2013	0.1895	0.2135	0.1802	0.1654	0.1950	0.1799	0.1657	0.1941
	Konsumpcja MAF mg/dzień/1000 osób	0.3296	0.2984	0.3606	0.4632	0.4360	0.4910	0.4146	0.3806	0.4486	0.4138	0.3812	0.4464
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0109	0.0099	0.0120	0.0154	0.0145	0.0163	0.0138	0.0126	0.0149	0.0137	0.0127	0.0148

M D M A	Zawartość ng/L	1.2664	1.1997	1.3331	1.1727	1.1063	1.2388	1.2938	1.2277	1.3599	1.0221	0.9550	1.0886
	DTR g/miesiąc	3.9264	3.7196	4.1330	3.1367	2.9591	3.3136	4.4071	4.1818	4.6323	3.3389	3.1195	3.5561
	DTR mg/dzień	130.8824	123.9871	137.7695	104.5588	98.6370	110.4533	146.9043	139.3947	154.4122	111.2980	103.9840	118.5391
	DTR mg/ dzień/ 1000 osób	0.2380	0.2255	0.2506	0.1902	0.1794	0.2009	0.2672	0.2535	0.2809	0.2024	0.1891	0.2156
	Konsumpcja MDMA mg/dzień/1000 osób	0.3571	0.3383	0.3759	0.2853	0.2691	0.3013	0.4008	0.3803	0.4213	0.3037	0.2837	0.3234
	Ilość dawek/ dzień/1000 osób	0.0027	0.0026	0.0029	0.0021	0.0020	0.0023	0.0030	0.0029	0.0032	0.0023	0.0021	0.0024

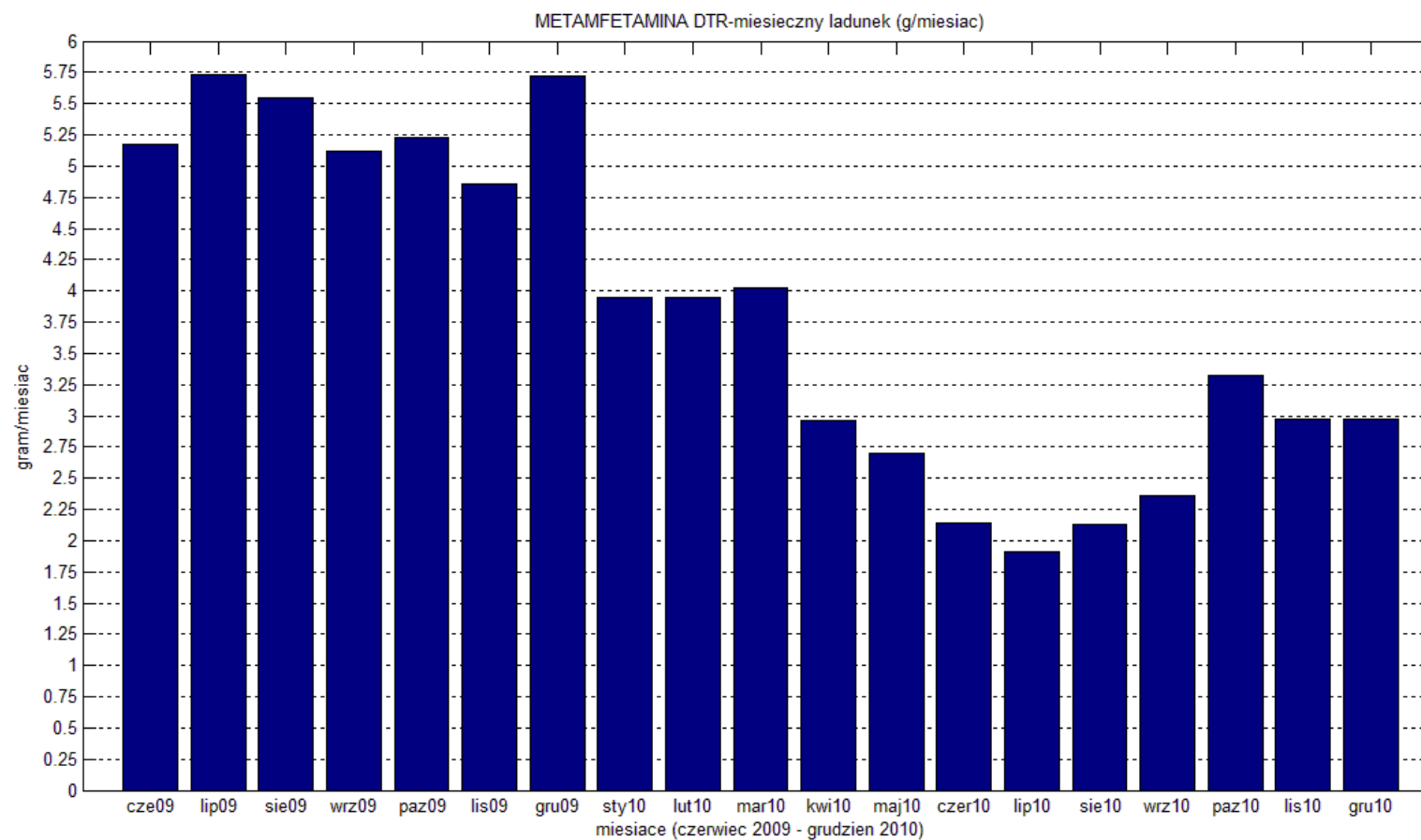
Tabela 8. Wyniki oznaczeń i szacunki dla grupy amfetamin od września do grudnia 2010

		Czerwiec 2009			Lipiec 2009			Sierpień 2009			Wrzesień 2009		
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit
T H C	<i>Zawartość ng/L</i>	19.5867	19.5867	19.6555	19.8460	19.8115	19.8805	20.4504	20.4158	20.4849	18.3219	18.2877	18.3561
	<i>DTR g/miesiąc</i>	83.4215	83.4215	83.7146	86.91878	86.7678	87.0697	77.6000	77.4688	77.7312	67.7606	67.6342	67.8870
	<i>DTR mg/dzień</i>	2780.717	2780.717	2790.486	2897.292	2892.262	2902.325	2586.668	2582.296	2591.042	2258.686	2254.474	2262.900
	<i>DTR mg/dzień/ 1000 osób</i>	5.0585	5.0585	5.0763	5.2706	5.2614	5.2797	4.7055	4.6976	4.7135	4.1089	4.1012	4.1165
	<i>Konsumpcja THC mg/dzień/1000 osób</i>	768.9028	768.9028	771.6043	801.1375	799.7464	802.5292	715.2459	714.0371	716.4553	624.5550	623.3901	625.7201
	<i>Ilość dawek/ dzień/1000 osób</i>	6.1512	6.1512	6.1728	6.4091	6.3979	6.4202	5.7219	5.7122	5.7316	4.9964	4.9871	5.0057
		Październik 2009			Listopad 2009			Grudzień 2009					
		Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit	Wartość Średnia	Dolny Limit	Górny Limit			
	<i>Zawartość ng/L</i>	19.0214	18.9871	19.0557	17.9219	17.8878	17.9561	18.7489	18.7146	18.7831			
	<i>DTR g/miesiąc</i>	73.27204	73.1400	73.4040	68.1916	68.06178	68.3214	75.9719	75.8332	76.1106			
	<i>DTR mg/dzień</i>	2442.401	2438.001	2446.802	2273.053	2268.726	2277.382	2532.399	2527.776	2537.022			
	<i>DTR mg/dzień/ 1000 osób</i>	4.4431	4.4351	4.4511	4.1350	4.1272	4.1429	4.6068	4.5984	4.6152			
	<i>Konsumpcja THC mg/dzień/1000 osób</i>	675.3544	674.1377	676.5714	628.5276	627.3310	629.7246	700.2398	698.9616	701.5184			
	<i>Ilość dawek/ dzień/1000 osób</i>	5.4028	5.3931	5.4125	5.0282	5.0186	5.0377	5.6019	5.5916	5.6121			

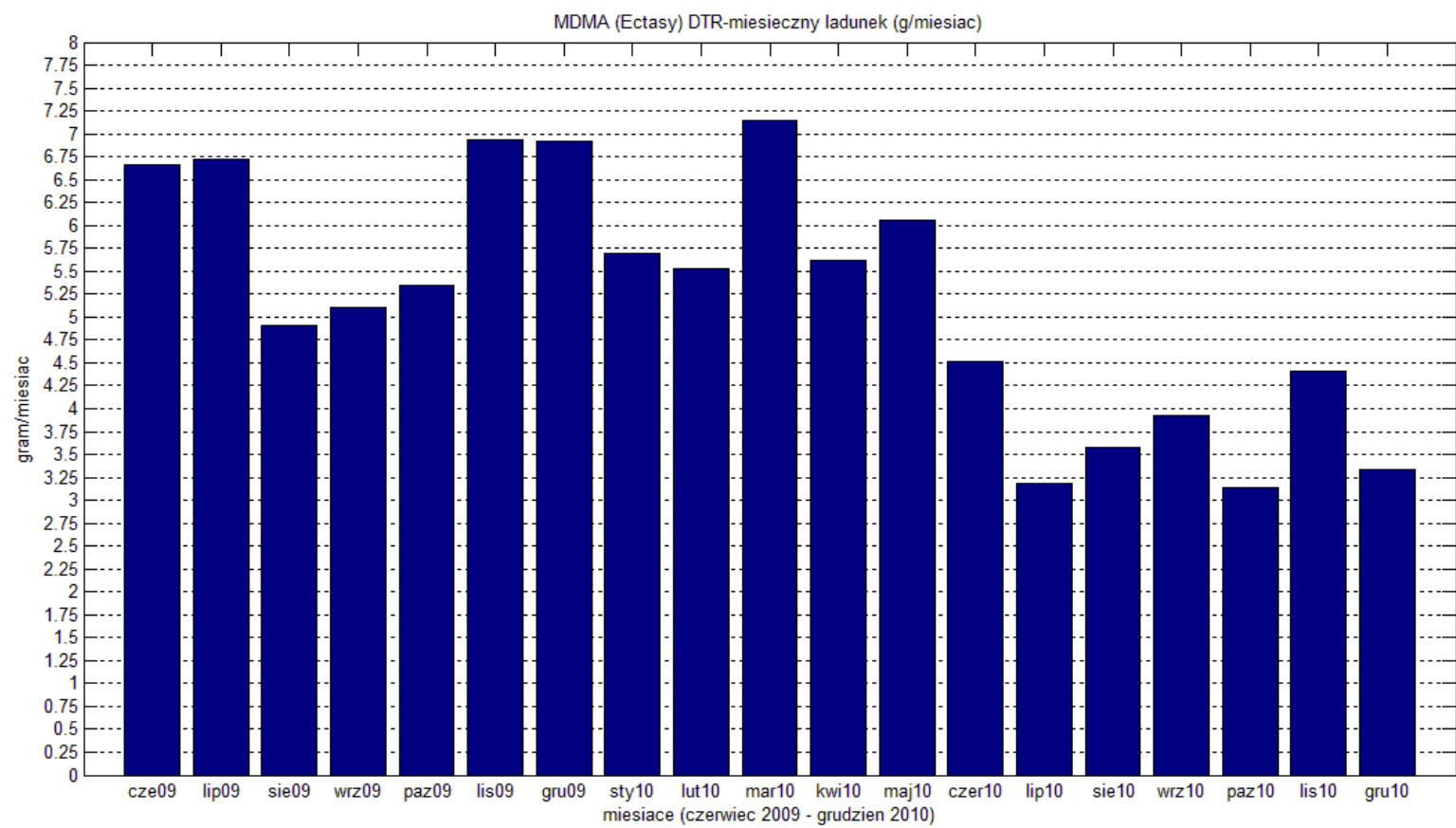
Tabela 9. Wyniki oznaczeń i szacunki dla THC od stycznia do grudnia 2009r.



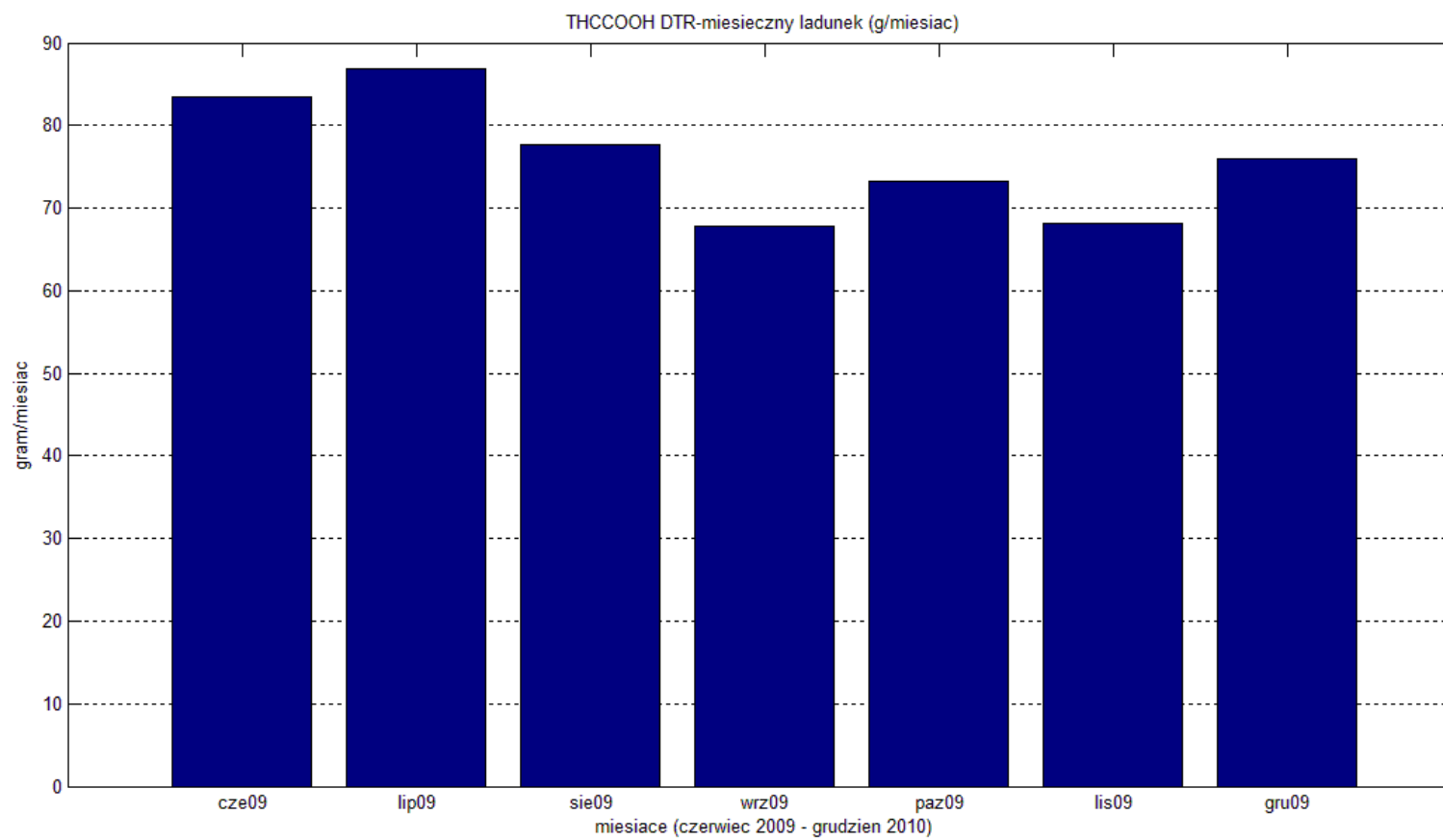
Rycina 1. Amfetamina DTR – miesięczny ładunek g/miesiąc



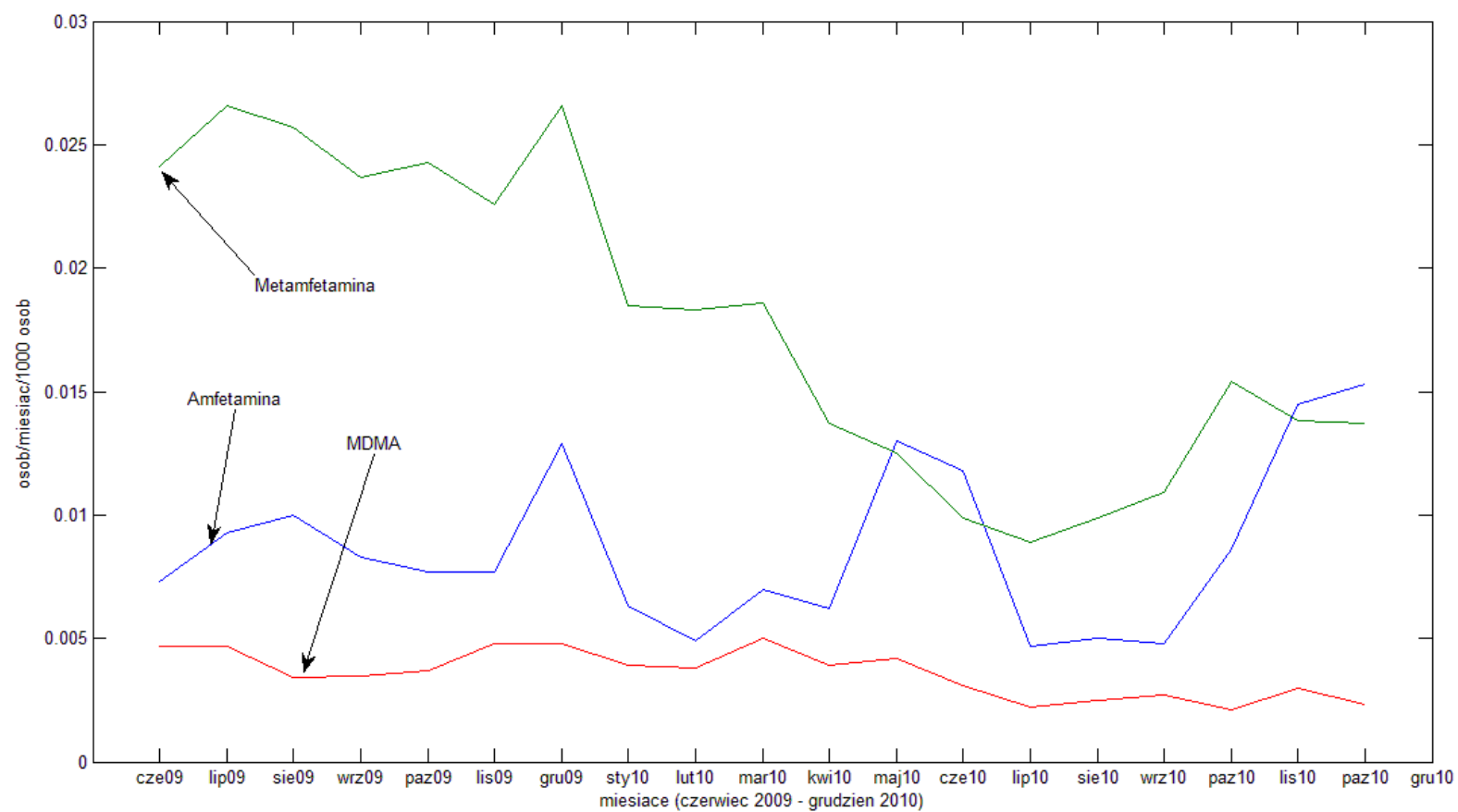
Rycina 2. Metamfetamina DTR – miesięczny ładunek g/miesiąc



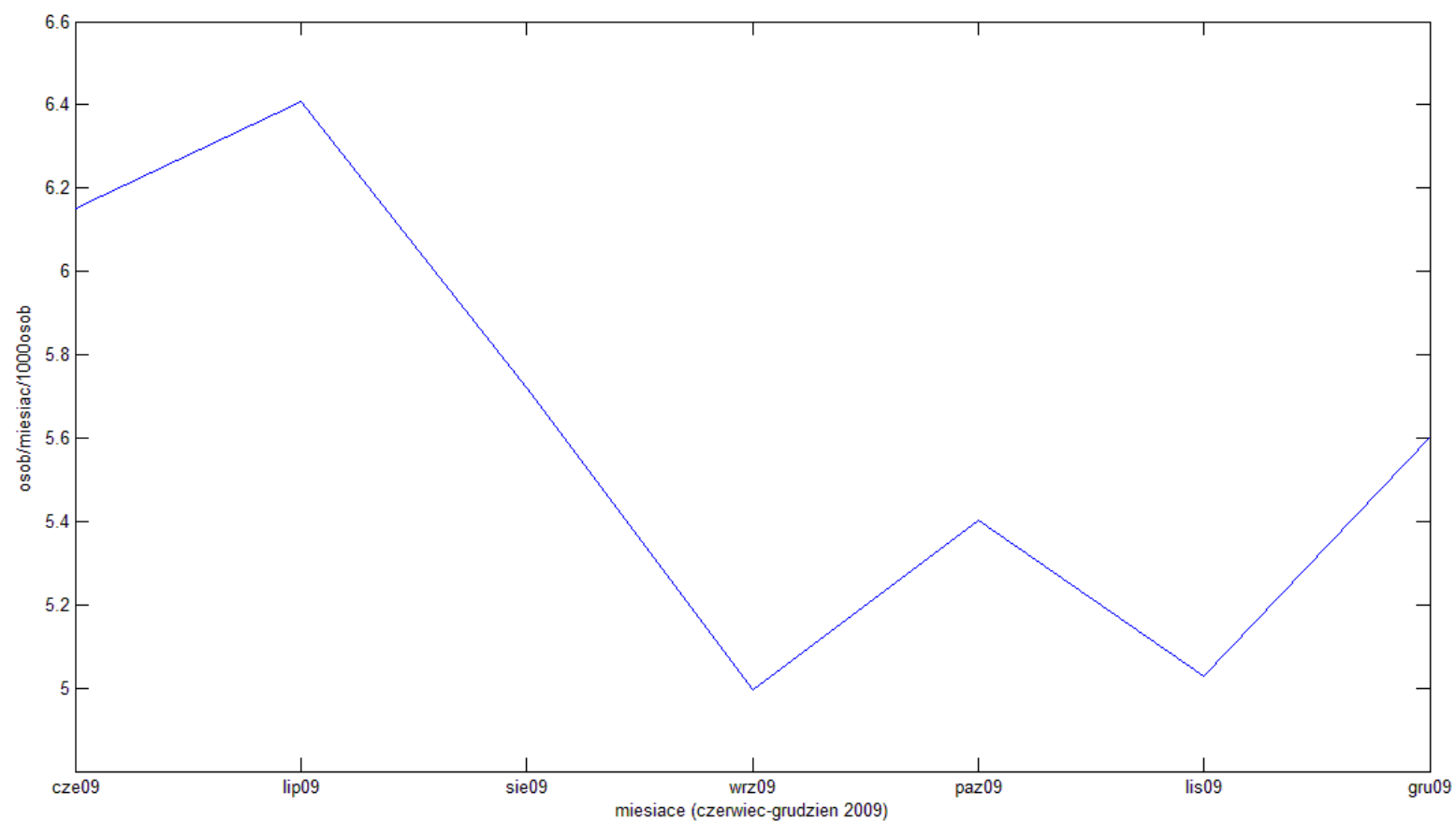
Rycina 3. MDMA DTR – miesięczny ładunek g/miesiąc



Rycina 4. THCCOOH DTR – miesięczny ładunek g/miesiąc



Rycina 5. Liczba osób zażywająca codziennie standardowe dawki amfetamin na 1000 osób w poszczególnych miesiącach



Rycina 6. Liczba osób zażywająca codziennie standardowe dawki kanabinoidów na 1000 osób w poszczególnych miesiącach

2.5 WNIOSKI

Analiza ilościowa substancji odurzających wykonana została w okresie od czerwca 2009 r. do grudnia 2010 r. Wyjątkiem była analiza THC-COOH, która prowadzona była od czerwca do grudnia 2009 r. Krótszy okres analizy THC-COOH spowodowany był problemami technicznymi związanymi z przygotowaniem próbek. Analizie poddane zostały amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, THC oraz kokaina, jak napisano we wstępie, w przypadku THC oraz kokainy analizowano ich metabolity. W przypadku MDA oraz kokainy w żadnej z przeprowadzonych analiz nie wykryto metabolitów tej substancji, tj. sygnały od tych substancji znajdowały się poniżej granicy oznaczalności a nawet poniżej granicy wykrywalności. Wyjątkiem była pierwsza połowa stycznia 2010 r., kiedy pojawił się pik prawdopodobnie od benzyloekgoniny. Wielkość tego piku była na granicy oznaczalności. Ponieważ cała próbka została zużyta podczas analizy co uniemożliwiło powtórzenie badania i nie można mieć pewności co do wiarygodności oznaczenia.

Specjalnego omówienia wymaga dokładność estymacji wykonanych podczas badań. Oznaczenia i przeliczenia na ładunki dobowe i miesięczne nie uwzględniają „strat” ścieków podczas przepływu przez system kanalizacyjny oraz strat związanych z rozpadem metabolitów substancji odurzających w czasie tego transportu. Dlatego podane wyniki należy traktować jako rezultaty znacznie niedoszacowane. Autorzy nie podjęli się zastosowania współczynników korekcyjnych z obawy przed przeszacowaniem wyników i uznając, że niedoszacowanie jest w tym przypadku bardziej korzystne niż przeszacowanie. Jednakże należy nadmienić, iż wg niektórych autorów do oczyszczalni trafia 70 % objętości ścieków pierwotnie wprowadzonych do systemu kanalizacji. Badania porównujące spożycie diklofenaku i karbamazepiny w Berlinie z jego oznaczeniem w ściekach wykazało odzysk sięgający 50%. Dlatego przypuszczalnie otrzymane wyniki można powiększyć od 30 do 50%. Jednakże bez karkołomnej walidacji, która notabene nie wykonana została jeszcze przez nikogo z zajmujących się tematyką oszacowania spożycia substancji odurzających na podstawie oznaczeń w ściekach, autorzy postanowili nie wprowadzać teoretycznych współczynników korekcyjnych i pozostawić rezultaty oznaczeń w ich pierwotnej formie. Walidacja i oszacowanie odzysku oznaczeń metabolitów planowana jest na najbliższe przez autorów jako kolejny etap badań.

Przy interpretacji wyników tego typu oznaczeń pozornie najciekawszym współczynnikiem do interpretacji jest ilość osób zażywających, uwzględniając typową dawkę substancji odurzających na 1000 osób. Interpretując te współczynniki należy mieć na uwadze, że przelicznik ten dotyczy całej populacji obsługiwanej przez oczyszczalnię, a więc małe dzieci i osoby starsze. Zakładając, że do 12 roku życia i powyżej 50 roku życia spożycie jest niewielkie, a od 50 roku życia w górę i od 12 w dół maleje gwałtownie do zera spożycie to jest znacznie większe. Teoretycznie - na przykład, jeżeli

populacja obsługiwana w 2009 r. przez COS wynosiła około 65 tys. osób i w tej populacji znajdowało się na przykład 30 tys. osób w wieku, w którym spożycie jest prawdopodobne to znaczy, że współczynnik spożycia jest dwa razy większy niż podany w tabeli i na wykresie. Zdaniem autorów najważniejszym czynnikiem, który musi być poddany analizie podczas tego typu badań jest tendencja współczynników. Najlepiej do tego typu analizy stosować współczynniki standaryzowane na liczbę osób obsługiwanych. Porównanie tych współczynników i zbadanie tendencji wzrostowej lub spadkowej stanowi znakomity test na efektywność działań w walce z narkomanią. Jak wcześniej wspomniano można mieć wątpliwości związane dokładnością oszacowań natomiast rzetelnie wykonana analiza chemiczna daje nam wyniki o bardzo dużej dokładności i powtarzalności, co daje znakomitą bazę do badania wspomnianych tendencji, którą można wspomóc jeszcze analizą wariancji (ANOVA). Analiza porównująca obliczone wskaźniki z nakładami finansowymi, nakładami pracy, akcjami uświadamiającymi itp. daje nam znakomity wgląd w efektywność tych nakładów i działań.

Teoretyczny przykład: Policja otrzymała liczne i szybkie narkotesty. Jeżeli od momentu ich zastosowania przez parę miesięcy nie nastąpiła tendencja spadkowa któregośkolwiek wskaźnika DTR, to znaczy, że nakład finansowy na narkotesty był niepotrzebny lub należy dokonać zmian związanych z ich zastosowaniem.

Podsumowując, szacunki konsumpcji badanych środków odurzających przeprowadzane metodą oznaczania substancji odurzających w ściekach są bardzo użyteczne do badania profilu i monitorowania zażywanych środków przez badaną populację, przyzwyczajęń konsumentów i do szybkiej identyfikacji zmiany trendów, profilu zażywanych substancji. Wyniki uzyskane w ten sposób są niedoszacowane (ale obiektywne) i nie należy analizować bezpośrednio uzyskanych wartości, ale w połączeniu z danymi dotyczącymi konsumpcji badanych środków uzyskanymi innymi metodami (badania ankietowe) stanowią bardzo dobre źródło do analizy i oceny zjawiska narkomanii na danym terenie.

3. WALIDACJA METODY ANALITYCZNEJ

Metody statystyczne stosowane przy tworzeniu nowych procedur analitycznych [7].

Symbole zawarte w tekście:

a -punkt przecięcia osi liniowej krzywej kalibracyjnej albo drugorzędowej funkcji kalibracyjnej

a_c - punkt przecięcia osi krzywej kalibracyjnej dla podstawowej procedury analitycznej

a_f - punkt przecięcia osi krzywej odzysku

b - współczynnik nachylenia prostej

b_c - współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej podstawowej procedury analitycznej

b_f - współczynnik nachylenia krzywej odzysku

c - współczynnik regresji członu kwadratowego drugorzędowej funkcji kalibracyjnej

$CI(a_f)$ – przedział ufności punktu przecięcia osi a_f

$CI(b_f)$ - przedział ufności współczynnika nachylenia b_f

DS^2 - różnica sum kwadratów odchyłeń (wariancji)

E - czułość

f_i - stopień swobody równania wariancji s_i^2

f_w - stopień swobody równania wariancji s_w^2

N_{A1} - liczba stężeń przed eliminacją wartości odstającej (outlier)

N_{A2} - liczba stężeń po eliminacji wartości odstającej (outlier)

N_c - liczba wzorców kalibracyjnych

N_f - liczba poziomów stężeń dla określenia krzywej odzysku n_i -liczba analiz na danym stężeniu

s_{y_2} - reszkowe odchylenie standardowe drugorzędowej funkcji kalibracyjnej

s_i - odchylenie standardowe dla zmierzonych wartości analizy wzorców o stężeniu x_i

s_y - reszkowe odchylenie standardowe

s_{x0} - Odchylenie standardowe metody

s_N^2 - wariancja zmierzonych wartości w górnej granicy zakresu
 s_1^2 - wariancja zmierzonych wartości w dolnej granicy zakresu
 $s_{y_{A1}}$ - reszkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej przed eliminacją wartości odstających
 $s_{y_{A2}}$ - reszkowe odchylenie standardowe po eliminacji wartości odstających
 s_w - odchylenie standardowe w serii
 s_b - odchylenie standardowe między seriami
 s_b - odchylenie standardowe różnic d_i lub przeciętnego wzorca
 s_{y_f} - reszkowe odchylenie standardowe krzywej odzysku
 $s_{x_{O_c}}$ - odchylenie standardowe metody podstawowej procedury analitycznej
 s_{b_f} - odchylenie standardowe współczynnika nachylenia b_f
 s_{a_f} - odchylenie standardowe punktu przecięcia osi a_f
TV- wartość testowa dla t-testu, testu Grubbs'a i F-testu
 $t_{f,p}$ -
RR- współczynnik odzysku
 x_i - stężenie wzorca
 $\bar{x}$ - średnie stężenie wzorca
 y_i - zmierzona wartość wzorca
 $\bar{y}$ - średnia zmierzona wartość y_i podczas kalibracji
 V_{x_0} - Współczynnik wariancji procedury
 Q_{xy} - suma kwadratów
 Q_{x^3} - suma kwadratów
 Q_{xx} - suma kwadratów
 Q_{x^2y} - suma kwadratów
 Q_{x^4} - suma kwadratów
 $\hat{y}_i$ - zmierzona wartość stężenia wzorca x_i obliczona z użyciem funkcji kalibracyjnej
 V_{x_0} - Współczynnik wariancji procedury
 Q_{xx} - suma $(x_i - \bar{x})^2$
 y_{ij} - zmierzona wartość j dla stężenia x_i
 $\bar{y}_i$ - średnia zmierzonych podczas kalibracji wartości y_1

x_f - uzyskane stężenie

y_f -uzyskana wartość sygnału

x_c - stężenie kalibracyjne

$\bar{x}_c$ -średnia stężeń kalibracyjnych

x_{ij} - wynik j analizy serii i stężenia odrzuconej wartości odstającej pomiaru

$\bar{x}_i$ - średnia wyników analizy

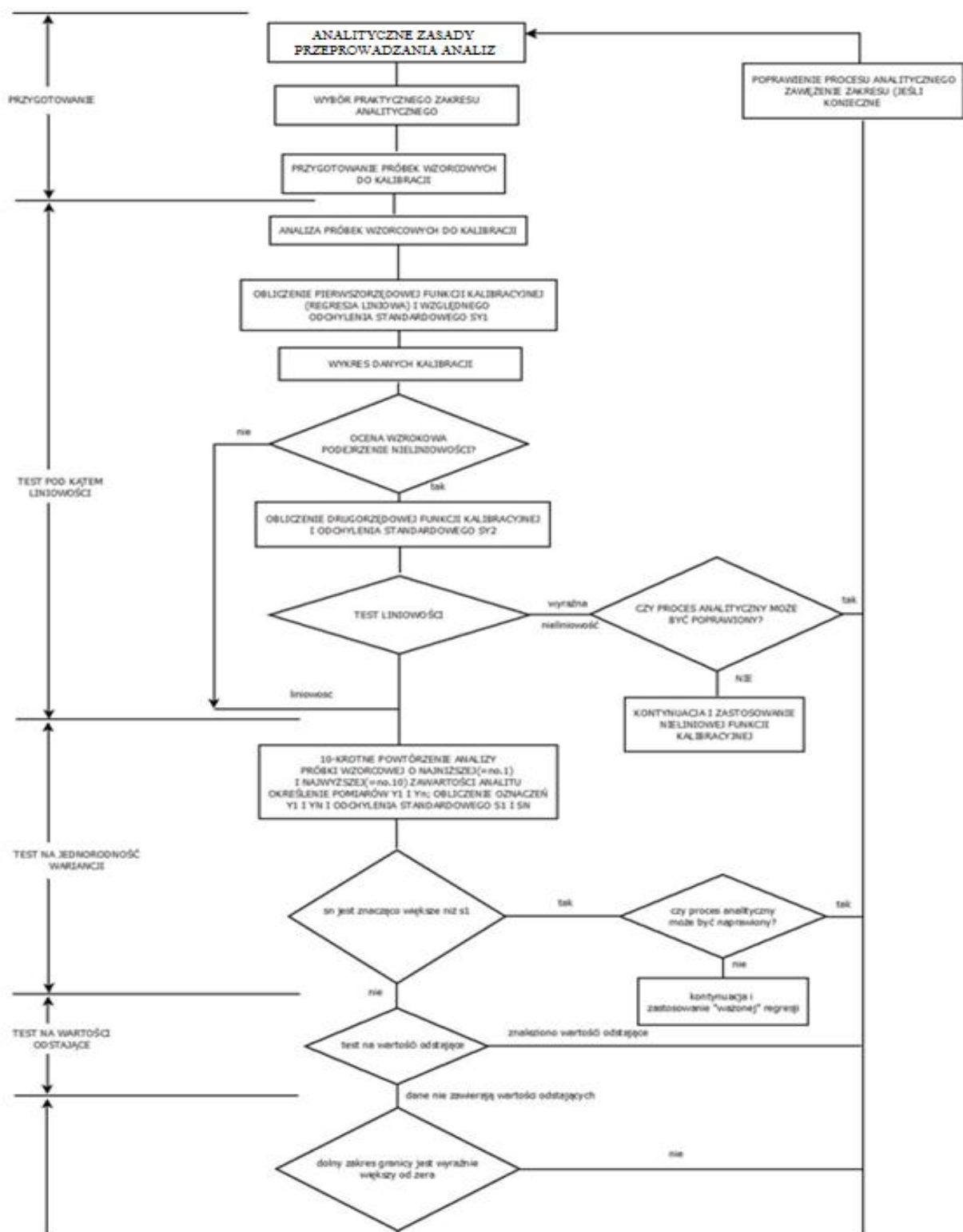
Wytyczne procesu tworzenia nowych metod analitycznych

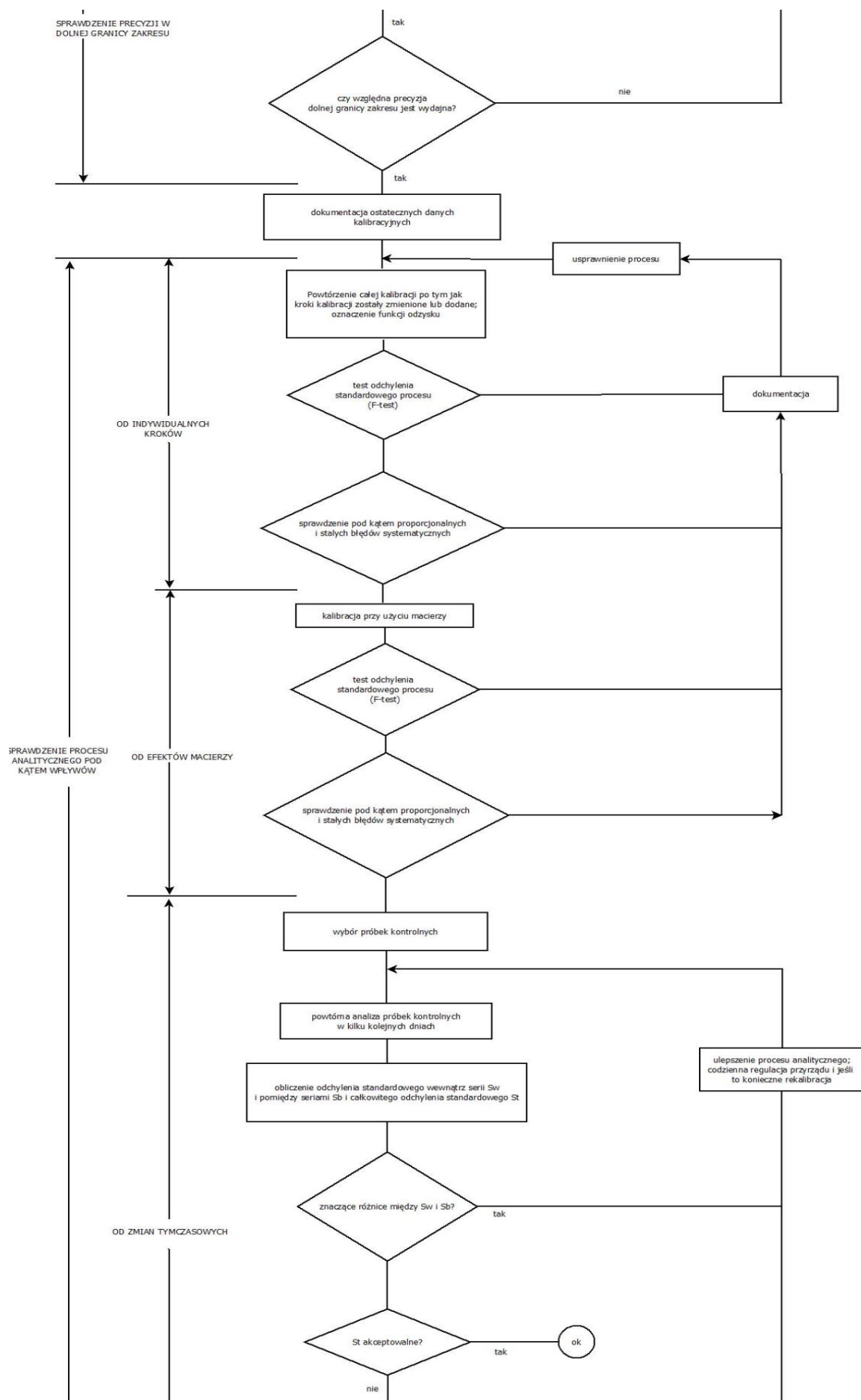
Aby nowa procedura analityczna (zwłaszcza wymagająca kalibracji) mogła być stosowana rutynowo, poszczególne jej etapy muszą zostać zoptymalizowane, procedura zweryfikowana pod kątem zastosowania, a charakterystyka procesu udokumentowana i opublikowana. Dokładny opis jest niezbędny do zapewnienia jakości rutynowych analiz.

Podczas tworzenia nowych procedur analitycznych stosuje się metody statystyczne, które dostarczają danych o jakości procedury osiągniętej w fazie testów. Parametry procedury muszą być wyznaczone z każdą nową kalibracją procesu analitycznego, np. po zmianie reagentów, ingerencji technicznej w sprzęt lub wymianie personelu.

Faza pierwsza tworzenia procedury analitycznej składa się z pięciu etapów:

- doświadczenia kalibracyjnego;
- sprawdzenia liniowości i precyzji;
- końcowego wyznaczenia danych kalibracyjnych;
- sprawdzenia wpływu poszczególnych etapów procesu na dane kalibracyjne;
- sprawdzenia wpływu czasu na proces kalibracyjny.







Zasady przeprowadzania analiz.

Aby zapewnić wysoką jakość rutynowych analiz, muszą być znane parametry dla danej procedury: testowany zakres, współczynnik funkcji kalibracyjnej, odchylenie standardowe wszystkich pomiarów procedury, współczynnik zmienności procesu.

Kalibracja procedury analitycznej

Dane uzyskane w doświadczeniu kalibracyjnym, pozwalają skonwertować wyniki pomiarów fizycznych do wyników analitycznych.

- Każda kalibracja rozpoczyna się od wyboru wstępnego zakresu, który jest wyznaczany przez:
 - ❖ cel analizy (w odniesieniu do warunków praktycznych), przy czym średnia zakresu powinna być zbliżona do najbardziej prawdopodobnego stężenia próbki;
 - ❖ możliwości techniczne (wartości zmierzone w dolnym zakresie limitu muszą znacząco różnić się od wartości próby ślepej, wymagana precyzja analityczna musi być możliwa do osiągnięcia w całym zakresie).

Zastosowanie prostego równania regresji liniowej możliwe jest wówczas, gdy precyzja analityczna jest stała w całym zakresie oraz występuje liniowy związek między zawartością substancji, a zmierzoną wartością.

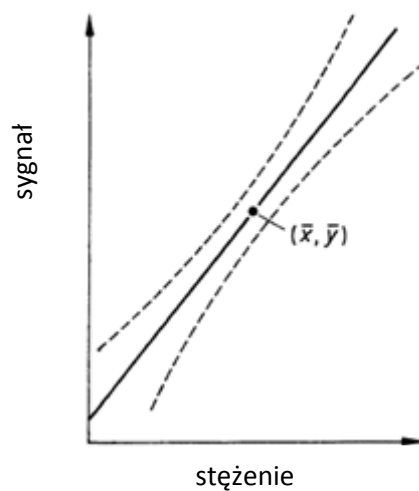
W wypadku niehomogenności wariancji i nieliniowości trzeba zredukować zakres.

➤ Wymagania stawiane próbkom wzorcowym:

- czystość;
- homogenność;
- reprezentatywność;
- stabilność, na próbki nie może wpływać pojemnik i warunki zewnętrzne.

➤ Wstępne pierwszo- i drugorzędowe funkcje kalibracyjne są obliczane ze zmierzonych wartości otrzymywanych z próbek wzorcowych.

❖ Analiza regresji dostarcza funkcji kalibracyjnej parametry regresji liniowej.



Liniowa funkcja kalibracyjna ($y=a+bx$) z przewidzianym interwałem

Współczynnik nachylenia prostej (pomiar czułości)

$$b = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

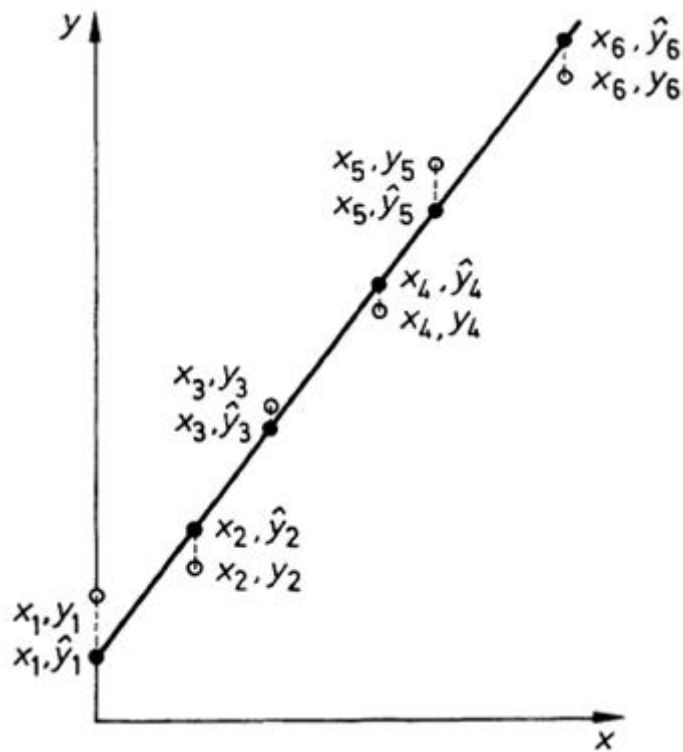
Punkt przecięcia osi:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

gdzie:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \times \sum x_i$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \times \sum y_i \quad (2)$$



Rozmieszczenie zmierzonych wartości wokół krzywej regresji.

Reszkowe odchylenie standardowe (s_y):

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad (3)$$

gdzie: $\hat{y}_i = a + bx_i$

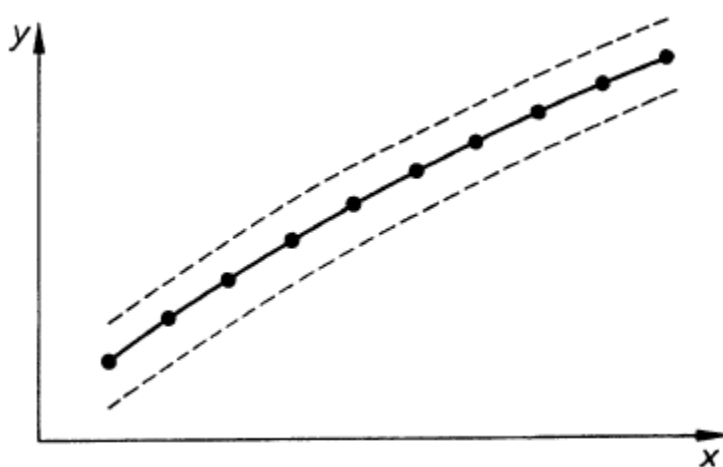
Odchylenie standardowe metody (s_{x_0}):

$$s_{xo} = \frac{s_y}{b} \quad (4)$$

Współczynnik wariancji procedury (V_{xo}):

$$V_{xo} = \frac{s_{xo}}{\bar{x}} \times 100(\%) \quad (5)$$

❖ Parametry funkcji drugiego rzędu.



Drugorzędowa funkcja kalibracyjna ($y = a + bx + cx^2$)

Współczynniki funkcji a, b, c:

$$a = \frac{1}{N} (\sum y_i - b \times \sum x_i - c \times \sum x_i^2) \quad (6)$$

$$b = \frac{Q_{xy} - c \times Q_{x^3}}{Q_{xx}} \quad (7)$$

$$c = \frac{Q_{xy} \times Q_{x^3} - Q_{x^2y} \times Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \times Q_{x^4}} \quad (8)$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / N) \quad (9)$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i \times y_i) - ((\sum x_i) \times (\sum y_i) / N) \quad (10)$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left((\sum x_i) \times (\sum x_i^2) / N \right) \quad (11)$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left((\sum x_i^2)^2 / N \right) \quad (12)$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \times y_i) - \left((\sum y_i) \times (\sum x_i^2) / N \right) \quad (13)$$

Reszkowe odchylenie standardowe:

$$s_y = \sqrt{\frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}} \quad (14)$$

gdzie : $\hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2$

Czułość E

W przeciwieństwie do regresji liniowej, czułość metody zmienia się wraz ze zmienną niezależną, co wyrazić można wzorem, który jest pierwszą pochodną krzywej kalibracyjnej:

$$E(x) = b + 2c \times x \quad (15)$$

Ze względów praktycznych czułość E określa się w połowie zakresu stężeń:

$$E(\bar{x}) = b + 2c \times \bar{x} \quad (16)$$

Odchylenie standardowe procesu:

$$s_{xo} = \frac{s_y}{E(\bar{x})}$$

Względne odchylenie standardowe procesu:

$$V_{xo} = \frac{s_{xo}}{\bar{x}} \times 100(\%) \quad (17)$$

❖ Obliczanie wyników analitycznych z użyciem liniowej funkcji kalibracyjnej:

$$\text{wynik} = \hat{x} \pm CI(\hat{x}) = \frac{\hat{y}-a}{b} \pm s_{xo} \times t(P = 95\%, f = N_c - 2) \times \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \left(\frac{\hat{y}-\bar{y}}{b^2 \times Q_{xx}}\right)} \quad (18)$$

❖ Obliczanie wyników analitycznych z użyciem drugorzędowej funkcji kalibracyjnej:

-wyniki dla ujemnej krzywizny

$$\hat{x} = -\frac{b}{2c} - \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a-\hat{y}}{c}}$$

-wyniki dla dodatniej krzywizny

$$\hat{x} = -\frac{b}{2c} - \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a-\hat{y}}{c}}$$

$$CI(\hat{x}) = \frac{s_y \times t}{(b + 2c\hat{x})} \times \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \frac{1}{Q_{x^4} \times Q_{xx} - (Q_{x^3})^2}} \times$$

$$\times \left\{ (\hat{x} - \bar{x})^2 Q_{x^4} + \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N_c} \right)^2 Q_{xx} - 2 \times (\hat{x} - \bar{x}) \times \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N_c} \right) \times Q_{x^3} \right\} \quad (19)$$

➤ Weryfikacja wstępnej kalibracji.

❖ Weryfikacja liniowości.

Należy stosować pierwszorzędną funkcję kalibracyjną, a tylko w uzasadnionych przypadkach funkcję drugorzędną. Typ funkcji kalibracyjnej najłatwiej określić poprzez wykreślenie danych kalibracyjnych (jeżeli wizualnie stwierdzimy nieliniowość nie ma potrzeby statystycznego uzasadniania). Do statystycznej weryfikacji liniowości zalecany jest test Mandel'a, w którym mają zastosowanie:

- pierwszorzędną funkcja kalibracyjna

$$y = a + bx$$

- drugorzędowa funkcja kalibracyjna

$$y = a + bx + cx^2$$

Test zakłada, że względnie duże odchylenia zmiennych wartości funkcji liniowej są spowodowane nieliniowością i mogą być poprawione przez wybór funkcji drugiego rzędu.

Różnica wariancji DS^2 jest obliczana z wykorzystaniem reszkowego odchylenia standardowego s_{y_1} (z pierwszorzędowej funkcji kalibracyjnej) i s_{y_2} (z drugorzędowej funkcji kalibracyjnej):

$$DS^2 = (N - 2)s_{y_1}^2 - (N - 3)s_{y_2}^2 \quad (20)$$

Dla $f=1$ stopnia swobody

Wartość testowa TV obliczana dla testu F:

$$TV = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad (21)$$

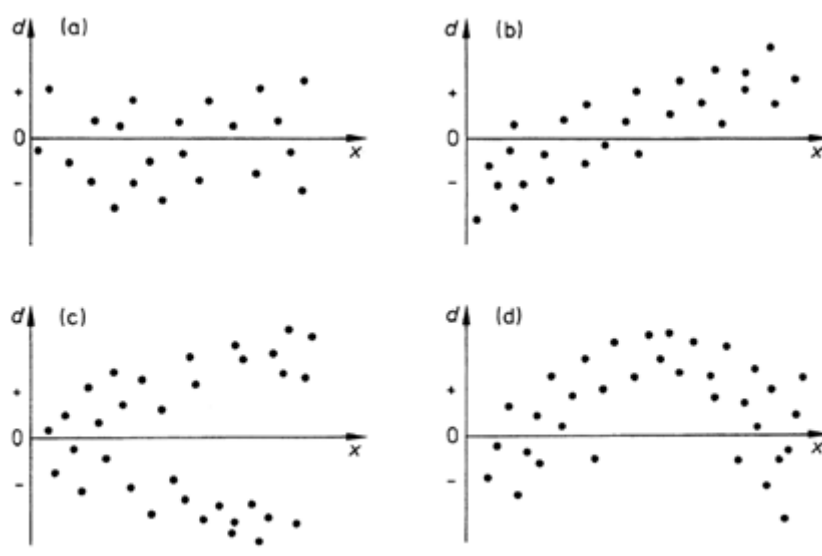
Wartość TV porównywana jest z wartością tabelaryczną F przy $f_1=1$, $f_2=N-3$ stopniach swobody i $P=99\%$. Jeżeli $TV \leq F$, funkcja drugiego rzędu nie dostarcza lepszych czynników i przyjmujemy funkcję liniową. Jeżeli $TV > F$ należy zawęzić zakres stosowanych stężeń. Jeśli to nie pomoże, należy zastosować funkcję drugiego rzędu.

Stosowana jest także analiza reszkowa d_i

$$d_i = \hat{y}_i - y_i \text{ dla } i=1...n$$

y_i - obserwacja

$\hat{y}_i$ - wartość oszacowana z y_i krzywej regresji



Graficzne przedstawienie residuów w zależności od stężenia x : a) idealny przebieg, model jest prawidłowy; b) trend liniowy, prawdopodobnie błąd w obliczeniach albo złe założenia; c) wzrastające wariancje, tj. niehomogenność wariancji; d) przebieg nieliniowy będący rezultatem wyboru niewłaściwej funkcji regresji.

❖ Weryfikacja precyzji

Homogenność wariancji

Równanie regresji liniowej zakłada stały brak precyzji (odchylenia mierzonych wartości) wariancji w całym zakresie.

Brak homogenności może prowadzić nie tylko do zmniejszenia precyzji, lecz także do zmniejszenia dokładności metody poprzez zmianę nachylenia krzywej.

Aby określić homogenność wariancji należy zanalizować $n=10$ próbek wzorcowych w najniższych (x_1) i najwyższych (x_n) stężeniach.

Otrzymuje się $2n(n=10)$ pomiarów (y_{ij}) z dwóch serii, z których obliczane są wartości: $\bar{y}_1, \bar{y}_N, s_1^2, s_N^2$.

$$s_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (22)$$

Wariancje obu serii sprawdzane są pod względem homogenności przy użyciu testu F.

$$TV = \frac{s_N^2}{s_1^2} \quad (23)$$

Wartość TV porównujemy z tabelaryczną wartością F przy $f_1=9$ $f_2=9$ w stopniach swobody, $P=99\%$, test dwustronny

Jeśli $TV > f$ świadczy to o znaczącej niehomogenności wariancji, co zmusza do podjęcia następujących kroków:

- wyboru węższego zakresu stężeń (działanie zalecone)
- użycie regresji ważonej
- użycie krzywej wielokrotnego dopasowania.

Outliers (wyniki odbiegające)

Dane kalibracyjne powinny być pozbawione wartości odbiegających (outliers). Nietypowe wartości są sprawdzane za pomocą testu F

$$TV = \frac{(N_{A1}-2)s_{yA1}^2 - (N_{A2}-2)s_{yA2}^2}{s_{yA2}^2} \quad (24)$$

Wartość TV jest porównywana z tabelaryczną wartością f przy $f_1=1$ i $f_2=n_{A2}-2$ przy $P=99\%$. Jeśli $TV < f$ można z prawdopodobieństwem 1% stwierdzić brak wartości odbiegających.

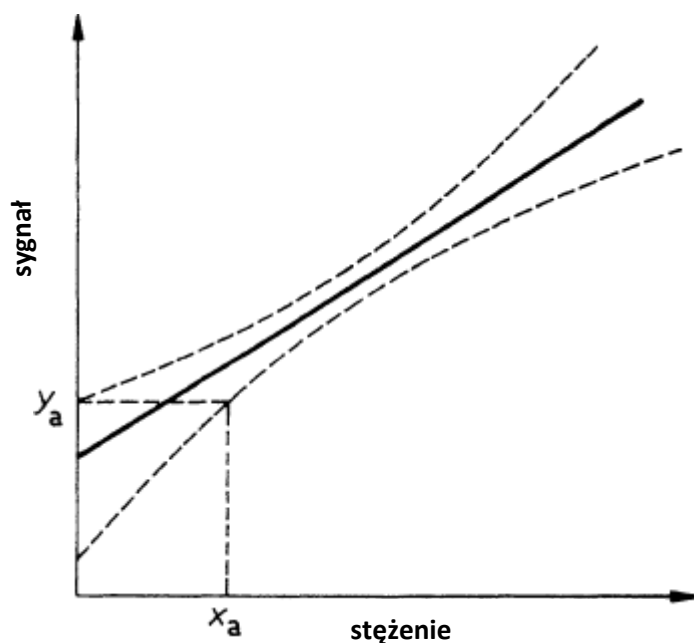
Obecność wartości odbiegającej można stwierdzić także przy pomocy testu T poprzez obliczenie parametrów regresji z wyłączeniem „podejrzanej” wartości, obliczenie przedziału predykcji i sprawdzenie czy „podejrzana” wartość znajduje się w tym przedziale.

$$\begin{aligned} CI(\hat{y}_A) &= \hat{y}_A \pm t \times s_{yA2} \times \sqrt{1 + \frac{1}{N_{A2}} + \frac{(x_A - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{1}{N_{A2}}(\sum x_i)^2}} \\ &= a_2 + b_2 \times x_A \pm t \times s_{yA2} \times \sqrt{1 + \frac{1}{N_{A2}} + \frac{(x_A - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{1}{N_{A2}}(\sum x_i)^2}} \end{aligned} \quad (25)$$

Dla $P=95\%$, $f = N_{A2} - 2$, test dwustronny

Zabezpieczenie dolnej granicy

Funkcja kalibracyjna ma zastosowanie dla analiz ilościowych tylko wtedy, gdy wszystkie wyniki są znacząco różne od zera. Dlatego bada się, czy dolna granica jest różna od zera. W tym celu należy zgodnie z wytycznymi obliczyć wartość x_a przy $N-2$ stopniach swobody używając jednostronnej wartości tabelarycznej t



Wyznaczenie x_a z zastosowaniem wartości pomocniczej y_a

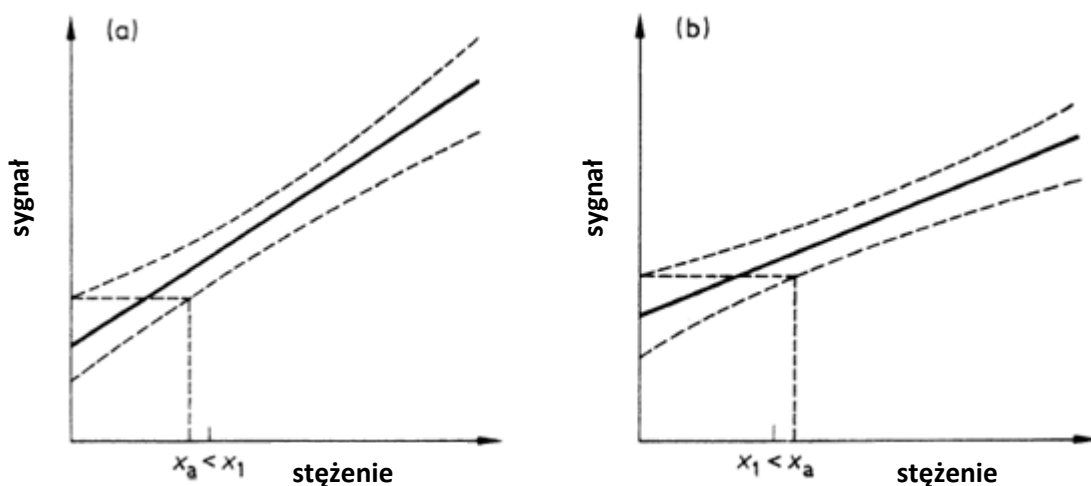
$$x_a = 2CI_x(y = y_a) \quad (26)$$

dla $t(f = N - 2, P = 95\%, \text{test jednostronny})$

$$x_a = 2 \times \frac{y_a - a}{b} \quad (27)$$

gdzie:

$$y_a = a + s_y \times t \times \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (28)$$



Sprawdzenie granicy zakresu x_1 . a) $x_a < x_1$; b) $x_a > x_1$.

Jeśli $x_a < x_1$ oznacza to, że wybrany zakres jest statystycznie uzasadniony. Innymi słowy niski zakres x_1 jest znacząco różny od stężenia zerowego. Jeśli zachodzi sytuacja odwrotna, tzn. gdy x_1 nie jest znacząco różny od stężenia zerowego analizy, zakres jest uzasadniony tylko dla stężeń większych niż x_a . Analizę należy przeprowadzać powyżej tej wartości oraz sporządzić nową krzywą kalibracyjną z wyższym zakresem początkowych stężeń.

Analizy w bardzo niskich stężeniach

W większości przypadków precyzja wyników analizy rośnie wraz ze zmniejszaniem stężenia substancji analizowanej. Jednak przy bardzo niskich stężeniach (analiza śladów) może wystąpić problem z odróżnieniem sygnału próbki od próby ślepej lub z oznaczeniem ilościowym z dostateczną precyzją.

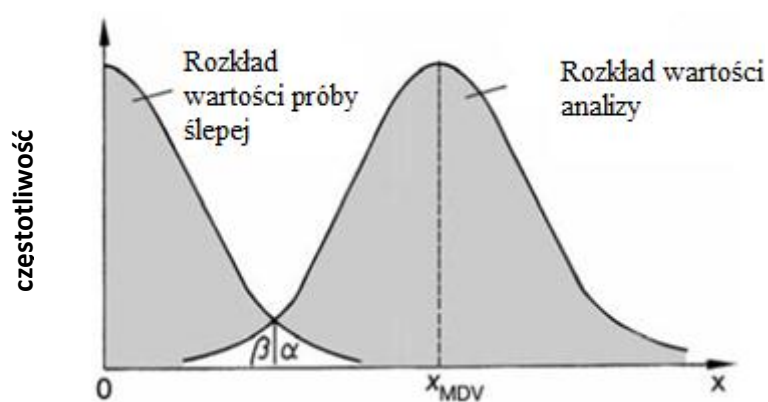
Jeżeli uzyskany wynik analizy nie jest istotnie większy od 0, można to interpretować na dwa sposoby:

- próbka nie zawiera analitu (wynik jest rezultatem nieprecyzji metody analitycznej)
- analit znajduje się w próbce (kolejne analizy dostarczają średnią wyników- na jej podstawie odrzuca się wynik wątpliwy).

Obie możliwości można określić statystycznie dla każdej zmierzonej wartości. O tym, który rodzaj błędu występuje, decydują następujące kryteria:

-prawdopodobieństwo, że próbka nie zawiera analitu, mimo pozytywnego wyniku pomiaru- jest to błąd α

-prawdopodobieństwo, że próbka zawiera analit ale wynik równy jest 0 (wartość próby ślepej)- błąd β .



Rozkład próby ślepej i wartości analizy z błędami α i β

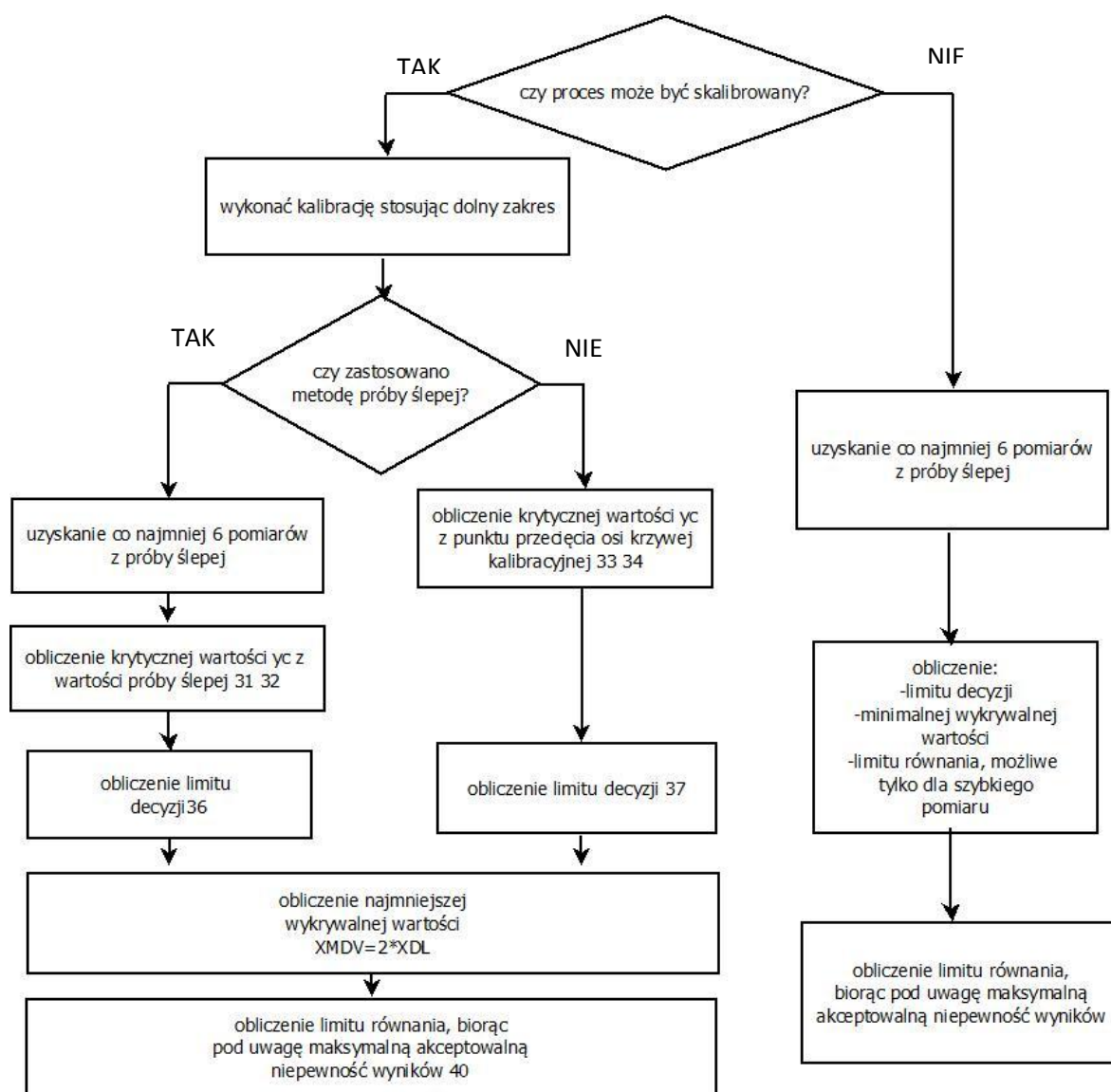
W praktyce analitycznej przy danej precyzji można określić trzy charakterystyczne wartości:

-granica detekcji x_{DL}

-granica wykrywalności x_{MDV}

-granica oznaczalności x_{LQ}

By móc określić x_{DL} i x_{MDV} należy najpierw ustalić czy dany proces analityczny może być skalibrowany.



Kryteria wyboru między metodą próby ślepej a metodą funkcji kalibracyjnej.

➤ Obliczanie granicy detekcji

Obliczoną krytyczną wartość y_c umieszczamy w równaniu funkcji kalibracyjnej a rozwiązanie daje granicę detekcji x_{DL}

$$x_{DL} = \frac{y_c - a}{b} \quad (29)$$

Średnia i odchylenie standardowe powinny się opierać na co najmniej $N_B=6$ zmierzonych wartościach uzyskanych w powtarzalnych warunkach.

$$\Delta \bar{y}_B = s_B \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_b}} \quad (30)$$

Dla $f=N_B-1$ stopni swobody

$$y_c = \bar{y}_B + \Delta y_B \quad (31)$$

Jeżeli stosujemy metodę linii kalibracyjnej, wartość krytyczna y_c jest obliczana jako suma punktu przecięcia osi, a , i przewidywanego zakresu punktu przecięcia osi Δa .

$$\Delta a = s_y \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_c} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{cc}}} \quad (32)$$

Dla $f=N_C-2$ stopni swobody

$$y_c = a + \Delta a \quad (33)$$

❖ Obliczanie limitu decyzji metodą próby ślepej:

$$\begin{aligned} x_{DL} &= \frac{\bar{y}_B + s_B \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}} - \bar{y}_B}{b} \\ &= \frac{s_B}{b} \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}} \end{aligned} \quad (34)$$

Dla $f=N_B-1$ stopni swobody

❖ Obliczanie limitu decyzji metodą linii kalibracyjnej:

$$x_{DL} = \frac{a + s_y \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} - a}{b} \quad (35)$$

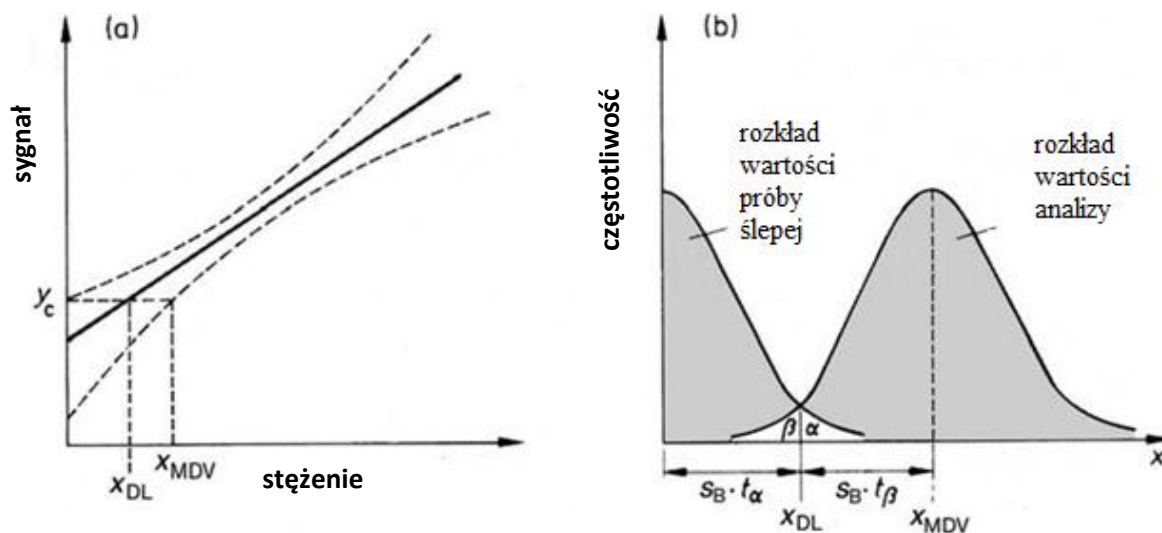
$$\frac{s_y}{b} \times t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (36)$$

Dla $f=N_C-2$ stopni swobody

Jest to test jednostronny. Współczynnik t jest zależny od prawdopodobieństwa akceptowalnego błędu α oraz ilości stopni swobody, f

➤ Wyznaczenie minimalnej wykrywalnej wartości.

Oznaczenie ilościowe przy stałym stężeniu jest możliwe w przypadku, gdy wynik jest równy minimalnej wykrywalnej wartości x_{MDV} . Tylko wtedy jest osiągnięty wymagany poziom istotności.



Najmniejsza wykrywalna wartość: a) uzyskana z zastosowaniem funkcji kalibracyjnej skojarzonej z przedziałem ufności; b) uzyskana z zastosowaniem rozkładu wartości próby ślepej, z założeniem, że s jest identyczne

Wartość numeryczna granicy wykrywalności x_{MDV} jest zależna od wybranych poziomów istotności i liczby stopni swobody. Jest to również test jednostronny.

Dla równych poziomów istotności α i β ($\alpha = \beta$):

$$t_{\alpha} = t_{\beta} = t$$

Stąd:

$$x_{MDV} = 2x_{DL}$$

❖ granica wykrywalności wyznaczona z zastosowaniem rozkładu wartości próby ślepej

$$x_{MDV} = x_{DL} + \frac{s_B}{b} \times t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_B}} \quad (37)$$

Dla $f=N_B-1$ stopni swobody

❖ granica wykrywalności wyznaczona z zastosowaniem funkcji kalibracyjnej

$$x_{MDV} = x_{DL} + s_{x0} \times t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_C} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (38)$$

Dla $f=N_C-2$ stopni swobody

➤ granica oznaczalności

Granica oznaczalności jest określona przez minimalne stężenie substancji (x), które może być zanalizowane przy określonej maksymalnej względnej nieprecyzji i niepewności otrzymanych wyników, Δx_{rel}

Walidacja poszczególnych etapów procesu i badanie wpływu matrycy

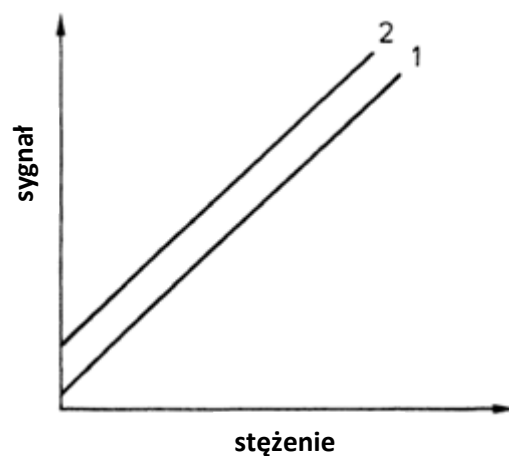
Ważnym jakościowym kryterium procesu analitycznego jest możliwość zastosowania krzywej do różnych próbek. Zakłada się, że osoba tworząca nową metodę bada ją na wpływ takich czynników jak np. wpływ poszczególnych etapów przygotowania próbki lub efekt matrycy. Czynniki te mogą mieć wpływ na zmniejszenie precyzji i/lub zmianę stałych systematycznych lub proporcjonalnych systematycznych odchyłek wyniku analitycznego od wartości rzeczywistej.

Obliczenie funkcji odzysku pozwala na znalezienie błędu systematycznego i proporcjonalnego jak również prześledzenie wpływu poszczególnych etapów przygotowania próbki.

➤ Błędy systematyczne

❖ Błędy stałe.

Dla stałych błędów systematycznych odchylenie jest niezależne od stężenia co prowadzi do równoległego przesunięcia krzywej kalibracyjnej.



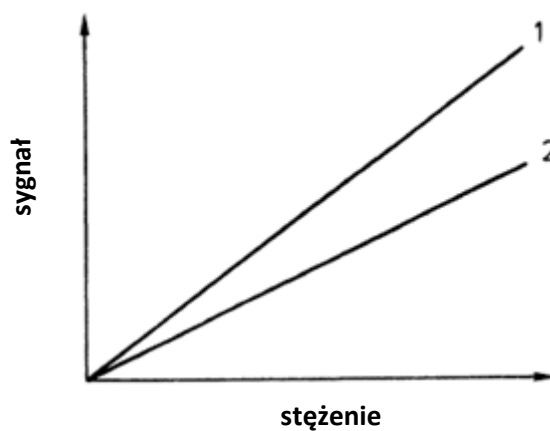
Przedstawienie stałego systematycznego odchylenia (2)

❖ Błędy proporcjonalne

Dla błędów proporcjonalnych zmiana stężenia skutkuje zmianą odchylenia co prowadzi do zmiany nachylenia krzywej. Co zostało zobrazowane na ryc.1-14

Błąd systematyczny może być wykryty metodą wzorca wewnętrznego lub przy pomocy funkcji odzysku

Stężenie analizowanych składników ma wpływ na proporcjonalne błędy systematyczne. Z wielokrotnione odchylenia od właściwych wartości mogą pojawiać się wskutek poszczególnych etapów procesu lub jako efekt matrycy.



Proporcjonalne odchylenie systematyczne (2)

Wynik analizy(x_f) jest obliczany na podstawie wartości sygnału (y_f) i funkcji analitycznej.

➤ **Funkcja odzysku.**

Aby określić wpływ procedury lub modyfikacji próbki analitycznej na wynik analizy, przeprowadza się eksperyment odzysku i ustala funkcję odzysku.

Eksperyment jest przeprowadzony w zakresie stężeń stosowanych podczas analizy.

Początkowo funkcja kalibracyjna określana jest wzorem:

$$y = a_c + b_c \times x_c \quad (39)$$

Następnie każdą próbkę w określonym zakresie stężeń należy poddać procesowi modyfikacji np. dodając matrycę. Wynik analizy x_f obliczamy używając wartości sygnału y_f przy pomocy funkcji:

$$x_f = \frac{y_f - a_c}{b_c} \quad (40)$$

Jeśli wartości x_f odłożone są na rzędnej, a wartości x_c na odciętej otrzymujemy graficzne przedstawienie funkcji odzysku:

$$x_f = a_f + b_f \times x_c \quad (41)$$

W przypadku braku błędu systematycznego proporcjonalnego i stałego otrzymujemy prostą o współczynniku nachylenia $b=1$ i wartości współczynnika przecięcia z osią x $a=0$

❖ **Określenie precyzji analitycznej.**

Precyzję analityczną bada się porównując odchylenie standardowe metody w funkcji kalibracyjnej z resztkowym odchyleniem standardowym w funkcji odzysku(wzór nr 42).

$$TV = \left(\frac{s_{y_f}}{s_{x_o_c}} \right)^2 \quad (42)$$

Jeśli $TV > V$ przy $f_1=f_2=n_{c-2}$ i $P=99\%$ należy odrzucić hipotezę zerową i przyjąć przy zadanym stopniu istotności różnicę odchyłeń standardowych tych dwóch funkcji.

❖ **Sprawdzenie pod kątem błędów systematycznych:**

Ponieważ w pomiarach zawsze występują przypadkowe błędy, niemożliwe jest uzyskanie idealnych wartości $a_f=0$, $b_f=1$ punktu przecięcia osi i nachylenia krzywej. Aby określić występowanie systematycznych odchyłeń, należy obliczyć przedziały ufności dla a_f i b_f

$$CI(a_f) = a_f \pm t_{f,P} \times s_{a_f} \quad (43)$$

$$CI(a_f) = a_f \pm t_{f,P} \times s_{y_f} \times \sqrt{\frac{1}{N_f} + \frac{\bar{x}_c^2}{Q_{xx}}} \quad (44)$$

gdzie:

$$s_{y_f} = \sqrt{\frac{\sum [x_{if} - (a_f + b_f \times x_{ic})]^2}{N_f - 2}} \quad (45)$$

N_f -ilość stężeń

Przedział ufności dla b_f :

$$CI(b_f) = b_f \pm t_{f,P} \times s_{b_f} \quad (46)$$

$$CI(b_f) = b_f \pm \frac{t_{f,P} \times s_{y_f}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (47)$$

(t = współczynnik t-Studenta: $f=N_f-2$, $P=95\%$)

Jeśli przedział ufności $CI(a_f)$ nie zawiera wartości $a_f=0$, stały błąd systematyczny występuje z 95% prawdopodobieństwem. Natomiast jeśli przedział ufności $CI(b_f)$ nie zawiera wartości $b_f=1$ to prawdopodobieństwo występowania stałego systematycznego odchylenia wynosi 95%.

➤ **zastosowanie funkcji odzysku.**

Funkcja odzysku jest stosowana w celu sprawdzania poszczególnych etapów procesu pod kątem proporcjonalnych błędów systematycznych i wpływu matrycy.

Dla proporcjonalnych błędów systematycznych może być określony współczynnik odzysku (RR):

$$RR = b_f \times 100(\%) \quad (48)$$

4. PIŚMIENNICTWO

1. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Assessing illicit drugs in wastewater, Insights 9, Lisbon: EMCDDA, 2008
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_65636_EN EMCDDA-insights9-wastewater.pdf
2. Daughton, C.G. (2001), in Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Scientific and regulatory issue (eds Daughton, C.G. and Jones-Lepp, T.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 348–364 (<http://epa.gov/nerlesd1/chemistry/pharma/book-conclude.htm>)
3. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R: Presence of therapeutic drugs in the environment Lancet 2000, 355:1789-1790
4. Kummerer K: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources, Chemosphere 2001, 45:957-969
5. Heberer T: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, Toxicol Lett 2002, 131:5-17
6. Zuccato E. et al. Cocaine in Surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abused, Environ. Health, 2005, 4, 14
7. Funk W., Dammann V., Donnewert G.: "Quality assurance in Analytical Chemistry", Wiley