

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

POPULĀCIJAS BIOMARĶIERU NOTEIKŠANA  
NOTEKŪDEŅOS AR NANO-PLŪSMAS ŠĶIDRUMU  
HROMATOGRĀFIJU- MASSPEKTROMETRIJU

BAKALAURA DARBS

Autors: **Arvis Prikulis**

Studenta apliecības numurs: ap19143

Darba vadītājs: *Dr. chem.*, prof. Vadims Bartkevičs

Darba vadītājs: doktorants *Mg. chem.* Deniss Fedorenko

RĪGA

2022

## ANOTĀCIJA

**Populācijas biomarķieru noteikšana notekūdeņos ar nano-plūsma šķidrumu hromatogrāfiju- masspektrometriju.** Prikulis A., zinātniskie vadītāji *Dr. chem.*, prof. Bartkevičs V, doktorants *Mg. chem.* Fedorenko D. Bakalaura darbs, 42 lappuses, 17 attēli, 11 tabulas, 62 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Darba gaitā tika ievākti notekūdeņu paraugi no dažādām Latvijas pilsētu (Daugavpils, Jelgava, Jēkabpils, Jūrmala, Liepāja, Rēzekne, Rīga, Salaspils, Tukums, Valmiera un Ventspils) notekūdeņu attīrīšanas iekārtām. Pielietojot nano-plūsma šķidruma hromatogrāfijas – Orbitrap masspektrometriskās metodi tika veikta populācijas biomarķieru un farmaceitisko līdzekļu satura noteikšana notekūdeņos. Tetrabultiamonija bromīds tika izmantots par jonu pāru reaģentu injekcijas sastāvā, lai uzlabotu polāro analītu sorbciju kolonnā. Veicot paraugu sagatavošanu bez papildu attīrīšanas ar *dilute-and-shoot* pieeju un izmantojot atšķaidīšanas faktoru 5 tika panākta jutība no 0,005 līdz 0,3 µg/L ar matricas efektiem robežās no 70 % līdz 111 %.

POPULĀCIJAS BIOMARĶIERI, NOTEKŪDEŅI, NANOPLŪSMAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, ORBITRAP MASSPEKTROMETRIJA, FARMACEITISKIE SAVIENOJUMI.

## ANOTATION

Determination of population biomarkers in effluents by nano-flow liquid chromatography- mass spectrometry. Prikulis A., supervisor *Dr. Chem.*, prof. Bartkevičs, *Mg. Chem.* Fedorenko D. Bachelor's thesis, 43 pages, 17 figures, 11 tables, 62 literature references. In Latvian.

In the course of the work, wastewater samples were collected from various wastewater treatment plants in Latvian cities (Daugavpils, Jelgava, Jēkabpils, Jūrmala, Liepāja, Rēzekne, Rīga, Salaspils, Tukums, Valmiera and Ventspils). The content of biomarkers and pharmaceuticals in wastewater samples was determined employing nanoflow liquid chromatography – Orbitrap mass spectrometry. Tetrabutylammonium bromide was used as an ion pair reagent to improve sorption of polar analyte molecules. Sample preparation procedure was performed using dilute-and-shoot approach without particular clean-up with dilution factor of 5. The sensitivity achieved was from 0,005 to 0,3 µg/L, and matrix effects were from 70 to 111%.

POPULATION BIOMARKERS, EFFLUENTS, NANOFLOW LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY, PHARMACEUTICALS.

# SATURS

Apzīmējumu saraksts.....	5
Ievads.....	6
1. Literatūras apskats .....	8
1.1. Populācijas biomarkķieri .....	8
1.1.1. 5-HIA.....	12
1.1.2. Etilsulfāts .....	14
1.1.3. Diklofenaks.....	15
1.1.4. Gabapentīns .....	16
1.1.5. Ibuprofēns .....	17
1.1.6. Kofeīns.....	18
1.1.7. Kotinīns.....	20
1.2. Nano-plūsmas šķidrumu hromatogrāfija .....	21
1.3. Masspektrometriskā detektēšana .....	23
2. Eksperimentālā daļa.....	25
2.1. Reāģenti un materiāli.....	25
2.2. Izmantoto šķīdumu sagatavošana .....	25
2.3. Paraugu sagatavošana.....	26
2.4. Instrumentālā analīze.....	27
3. Rezultāti un to izvērtējums .....	29
3.1. Jonu pāra reāģenta izmantošana polāro analītu analīzē apgrieztās fāzes hromatogrāfijā.....	29
3.2. Metodes validācija.....	32
3.3. Biomarkķieru analīzes rezultāti.....	35
Secinājumi .....	38
Izmantotā literatūra.....	39

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

5-HIAA	–	5-hidrokiindoletiķskābe
BMI	–	ķermeņa masas indekss
C18	–	oktadecilsilāns
DCF	–	diklofenaks
EtG	–	etilglikuronīds
EtS	–	etilsulfāts
HPLC	–	augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija
HRMS	–	augstas izšķirtspējas masspektrometrija
LC	–	šķidrums hromatogrāfija
LC-MS	–	šķidrums hromatogrāfija- masspektrometrija
LOQ	–	kvantificēšanas limits
MS/MS	–	tandēma masspektrometrija
NAI	–	notekūdeņu attīrīšanas iekārtas
Nano-LC	–	nano-plūsmas šķidrums hromatogrāfija
NL	–	normalizācijas līmenis
PLB	–	populācijas lieluma biomarķieris
QqQ	–	trīskāršs kvadrupols
SPE	–	cietfāzes ekstrakcija
TBAB	–	tetrabutilamonija bromīds
TIC	–	kopējās jonu plūsmas skaits
UPLC	–	ultra augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija
WBE	–	notekūdeņu epidemioloģija
WHO	–	Pasaules Veselības Organizācija

## IEVADS

Notekūdeņi ir sarežģīta matrica, kas satur informāciju par populācijas veselības un dzīvesveida rādītājiem. Notekūdeņu monitorings jau sen tiek izmantots legālo un nelegālo narkotiku lietošanas paradumu novērošanai. Vismodernākās analītiskās metodes spēj atklāt arī narkotisko vielu izgāšanas kanalizācijā gadījumus.<sup>1</sup> Notekūdeņu epidemioloģijas pētījumi sniedz ieskatu arī alkohola lietošanas, smēķēšanas un citu dzīvesveida paradumu novērtēšanai.<sup>2,3</sup> Pēdējos gados notekūdeņu monitoringa programmas ir kļuvušas par svarīgu informācijas avotu COVID-19 vīrusa uzraudzībai pandēmijas laikā. Ar to palīdzību iespējams ne tikai iegūt statistiku par inficēto gadījumu skaitu un izplatību, bet arī prognozēt jaunu uzliesmojumu gadījumus un paredzēt jaunu variantu izplatību, kā arī novērot faktisko slimības izplatīšanos ātrumu pirms klīniskā apstiprinājuma.<sup>4-6</sup> Ļoti svarīgs notekūdeņu epidemioloģijas mērķis ir novērtēt farmaceitisko un personīgās higiēnas līdzekļu lietošanu un to atliekvielu nonākšanu dabā, kas var radīt risku videi un tās ekosistēmām.<sup>7-9</sup>

Jonu pāra reaģenta izmantošana polāru savienojumu hromatogrāfiskās atdalīšanas uzlabošanai ir efektīvs veids, kā apvienot vairāku savienojumu ar dažādām polaritātēm noteikšanu vienā analīzē, neizmantojot sarežģītas metodes kā divdimensiju kolonnu hromatogrāfija.<sup>10,11</sup> Nano-plūsmas šķidrumu hromatogrāfija ir perspektīva analītiskā metode. Tā spēj uzlabot analīzes jutību, ļauj samazināt paraugu sagatavošanu, ļauj efektīvi veikt paraugu atšķaidīšanu kā rezultātā matricas efekti var tikt samazināti līdz vērā neņemamiem.<sup>12-14</sup> Tās priekšrocības ir mazs šķīdinātāju patēriņš, kas saskan ar zaļās ķīmijas principiem un samazina analīzes izmaksas un ietekmi uz vidi, labāks hromatogrāfiskais atdalījums, samazināts injekcijas tilpums un viegla savienošana ar masspektrometriju. Tomēr nano-plūsmas šķidrumu hromatogrāfijai ir arī savi trūkumi, tādēļ ir jānovērtē vai metode ir piemērota mērķim.<sup>15,16</sup> Orbitrap MS pielietošana apkārtējās vides paraugu analīzē ir perspektīva, jo ļauj panākt labāku selektivitāti un mazāku fona līmeni salīdzinājumā ar citām MS metodēm, piemēram tandēma MS.<sup>17,18</sup>

**Darba mērķis:** raksturot farmaceitisko savienojumu un populācijas biomarķieru saturu notekūdeņos Latvijas pilsētās.

### **Uzdevumi:**

1. Izpētīt literatūru par populācijas biomarķieriem un farmaceitiskiem preparātiem notekūdeņos.

2. Pielietot nano-plūsmas šķidrums hromatogrāfiju – Orbitrap masspektrometriju biomarkieru un farmaceitisko līdzekļu noteikšanai notekūdeņos un veikt metodes validāciju.
3. Raksturot matricas efektus pētāmajiem savienojumiem.
4. Novērtēt jonu pāra reaģenta izmantošanu polāru savienojumu sorbcijas uzlabošanai.
5. Noteikt farmaceitisko savienojumu un populācijas biomarkieru saturu reālos notekūdeņu paraugos no dažām Latvijas pilsētu attīrīšanas iekārtām.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Populācijas biomarķieri

Populācijas biomarķieri ir plaši izmantoti, lai sekotu līdzī populācijas pakļautībai toksiskām vielām, farmaceitisko vielu atliekvielām, vides piesārņotājiem, kā arī dažādu slimību riska prognozēšanai vai identificēšanai, populācijas veselībai un dzīves veida paradumiem. Notekūdens ir bagāts ar bioloģisku un ķīmisku informāciju, kas atspoguļo sabiedrības veselību. Ar informāciju par dažādu biomarķieru izdalīšanos, to pārvērtībām notekūdeņos un iedzīvotāju skaitu, kas dod ieguldījumu noteiktā sateces baseinā, populācijas biomarķieriem ir potenciāls sniegt informāciju par populācijas ekspozīciju ar ķīmiskajām vielām, patēriņu un citiem veselības aspektiem.<sup>19</sup>

Notekūdeņu epidemioloģijas (WBE) pieeja ir balstīta uz cilvēku veselības biomarķieriem, kas izdalās ar urīnu un fekālijām un nonāk notekūdeņu sistēmā. Šī pieeja tiek arvien vairāk izpētīta kā ievērojams instruments, lai novērtētu populācijas pakļautību vielām un patogēniem vai to iedarbības rādītājus, legālo un nelegālo narkotisko vielu lietošanas paradumus, farmaceitisko vielu patēriņu un iedzīvotāju dzīvesveida paradumus. Tā ir neinvazīva metode un to veic populācijas mērogā, tādējādi pasargājot indivīdu privātumu. Līdz šim WBE vispazīstamākais pielietojums ir bijis nelegālo narkotisko vielu patēriņa aplēses. Potenciālie pielietojumi iekļauj sistemātiska oksidatīvā stresa kvantitatīvu noteikšanu, infekcijas slimību un patogēnu noteikšanu, farmaceitisko vielu un to metabolītu novērtējums, populācijas lieluma marķieru kvantitatīvu noteikšanu, rūpnieciskās ķīmijas iedarbības marķieru noteikšanu un pārtikas un diētas marķieru noteikšanu. Ar WBE pieeju var veikt arī telpiskās un laika tendences, kā arī reakcijas uz dažādiem notikumiem konkrētos sateces baseinos.<sup>19-21</sup>

Lai WBE izmantotu vides faktoru iedarbības vai citu ar veselību saistītas informācijas kvantificēšanai vai aplēsēm par vielu patēriņu uz vienu iedzīvotāju, ir jāsaprot populācijas lielums, kas iegulda konkrētajā sateces baseinā. Līdz šim publicētos rakstos savākšanas periodam raksturīgais populācijas lielums, *de facto* iedzīvotāji, ir ieviesuši vislielāko nenoteiktību. Populācijas lieluma izmaiņas vai ne pārāk atjauninātu datu lietošana var nepamatoti samazināt vai palielināt aplēses par ikdienas patēriņu un iedzīvotāju. Notekūdeņu attīrīšanas iekārtu (NAI) apkalpoto iedzīvotāju skaits parasti tiek aprēķināts pēc to projektētās jaudas, tautas skaitīšanas datiem, vai hidroķīmiskajiem parametriem. Tautas skaitīšanas dati balstās uz fiksētu iedzīvotāju skaitu atbilstoši mājas adresei, kas parasti netiek atjauninātas un nerēķinās ar izmaiņām saistībā ar tūrisma vai pārvietošanās modeļiem. Iedzīvotāju skaits tiek

aprēķināts arī izmantojot hidroķīmiskos parametrus, piemēram ķīmiskā skābekļa patēriņu, bioloģiskā skābekļa patēriņu, kopējo slāpekli un fosforu. Tomēr šie parametri atspoguļo ne tikai cilvēka metabolisma atliekas, bet jebkuru biodegradējamu vielu, kas iekļūst notekūdeņu sistēmā, ko izmaina rūpnieciskās izplūdes, lauksaimnieciskā darbība, pārtikas atkritumi u.c. Amonija saturs notekūdeņos arī ir noteikts, kā netiešs urīna marķieris, kas dod zemākas populācijas vērtības, nekā tās, kas iegūtas no hidroķīmiskajiem parametriem un tautas skaitīšanas datiem, tomēr tas nespēj atšķirt cilvēku ieguldījumu no kopējā ieguldījuma.<sup>19,21</sup>

Tā kā populācijas lieluma biomarķierim ir jāatspoguļo populācijas lielums, kas iegulda notekūdeņu sistēmā, tā ekskrecijai teorētiski vajadzētu būt relatīvi nemainīgai dienās, kad populācijas izmaiņas nav notikušas. Kopējai ekskrecijai vajadzētu korelēt arī ar tautas skaitīšanas datiem, jo īpaši, ja populācijas lieluma biomarķieris var nokļūt notekūdeņu sistēmās no lauksaimniecības darbībām, piemēram, urīnviela vai virszemes ūdeņu piesārņojuma.<sup>22</sup>

Balstoties uz līdzšinējo sapratni, populācijas lieluma biomarķierim būtu jāatbilst vismaz pieciem kritērijiem: (1) tam ir jābūt kvantificējamam; (2) tam ir maza afinitāte pret notekūdeņu daļiņām vai filtrpapīru; (3) tam ir jābūt stabilam notekūdeņos; (4) tam ir jābūt patstāvīgai ekskrecijai un (5) kopējai ekskrecijai vajadzētu korelēt ar tautas skaitīšanas populācijas aplēsēm, tas nozīmē, ka nevajadzētu būt citam ieguldījumam, izņemot cilvēka metabolismu.<sup>22</sup>

Analītiskai metodei būtu jāspēj veikt noteikšanu zemos līmeņos, kuros atrodas meklējamā biomarķiera koncentrācija, izmantojot piemērotāko pašlaik pieejamo analītisko metodi. Sekojošie faktori kalpo aplēsēm par nepieciešamajām populācijas marķieru koncentrācijā urīnā: (1) lielākajai daļai analītisko metožu, kurās analizē notekūdeņus analītu kvantificēšanas limits (LOQ) ir ap ng/L koncentrācijām<sup>10,23</sup>, (2) ikdienas urīna izdalīšanās ir aptuveni 1 L un (3) ikdienas ūdens patēriņš parasti ir vairāki simti vai pat daži tūkstoši litru uz vienu iedzīvotāju.<sup>24</sup> Tādējādi minimālā populācijas biomarķiera koncentrācijai urīnā vajadzētu būt aptuveni μg/L koncentrācijas robežās, lai nodrošinātu tā kvantificēšanu notekūdeņos.<sup>22</sup>

Notekūdeņi satur suspendētas daļiņas, kas paraugu sagatavošanas procesā ir jānofiltrē pirms analīzes. Ja biomarķieris adsorbējas uz šīm daļiņām vai filtra materiāla, analītiskā atgūstamība un metodes precizitāte tiks ievērojami samazināta. Tas arī varētu ietekmēt kopējo populācijas marķiera daudzumu savāktajā paraugā, jo suspendēto daļiņu daudzumu paraugos būtu sarežģīti uzturēt konstantu.<sup>22</sup>

Stabilitāte arī ir svarīgs kritērijs izvēloties piemērotu populācijas lieluma biomarķieri. Lielpilsētu notekūdeņu attīrīšanas iekārtās, kas apkalpo 500000 iedzīvotāju var paiet pat 7 h līdz notekūdeņi sasniedz paraugu ņemšanas vietu. Šis aizkaves laiks var palielināties līdz 15 h

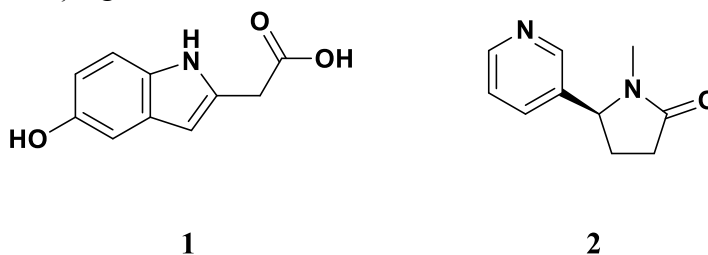
mazākās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Turklāt savāktie paraugi parasti atrodas NAI automātiskajos paraugu ņēmējos ne ilgāk kā 24 stundas, ja tos savāc kombinētais paraugu ņēmējs. Līdz ar to, pat ja pēc savākšanas analizējamo vielu koncentrāciju var stabilizēt, analizējamo vielu zudumus notekūdeņu cauruļvados un NAI automātiskajos paraugu ņēmējos ir grūti novērtēt, ja dažu stundu laikā notiek to ievērojama sadalīšanās.<sup>22</sup>

Izmantojot populācijas lieluma biomarķieri (PLB), dažādu vielu lietošanu var novērtēt tā, lai nebūtu nepieciešams precīzi noteikt populācijas lielumu. Atliekvielu (vai sākotnējo vielu metabolītu) koncentrācijas tiek normalizētas pret PLB koncentrāciju notekūdeņos pēc vienāduma 1.1.<sup>22</sup>

*patēriņš uz iedzīvotāju*

$$= \frac{\text{atliekvielu kocertrācija}}{\text{PLB koncentrācija}} \cdot \frac{\text{PLB ekskrecijas ātrums}}{\text{atliekvielu ekskrecijas faktors}} \quad (1.1)$$

Novērtējot analītu kvantificēšanas iespējas, afinitāti pret suspendētām daļiņām, stabilitāti notekūdeņos aprēķini pēc kotinīna, kofeīna un 5-hidroksiindoletīkskābes (5-HIAA) (1) (skatīt 1.1. attēlu) sakrīt ar tiem, kas rēķināti, izmantojot hidroķīmiskos parametrus. Izvērtējot arī ekskreciju starp nedēļas dienām populācijas mērogā izdalījās gan kotinīns, gan 5-HIAA ar nemainīgu ātrumu un abas koncentrācijas labi korelēja ar tautas skaitīšanas datiem. Gan kotinīns (2) (skatīt 1.1. attēlu), gan 5-HIAA ir piemēroti populācijas lieluma biomarķieri, bet 5-HIAA var būt piemērotāks starptautiskiem salīdzinājumiem, jo smēķēšanas paradumi pasaules reģionos ir atšķirīgi.<sup>21,22</sup>



1.1. att. 5-HIAA un kotinīna struktūrformulas

Biomarķieri, kas atspoguļo diētas īpašības, varētu sniegt papildus informāciju pārtikas patēriņa paradumiem populācijas izmērā. Šie biomarķieri sniegtu vispārīgāku informāciju par diētas paradumiem. Šāda pieeja ļautu izvairīties no neskaidrībām, kas saistītas ar pārtikas biomarķieru daudzuma atšķirībām pārtikas produktos. Piemēri šādiem biomarķieriem būtu ūdenī šķīstoši vitamīni, kuru 24 h izvadīšanās urīnā korelē ar uzturā uzņemto, kā arī augu izcelsmes polifenoli, kuru izvadīšanās ar urīnu korelē ar ķermeņa masas indeksu (BMI). Kā arī metabolikas pētījumi ir atklājuši biomarķierus, kas izdalās ar urīnu, specifiskiem pārtikas

produktiem, kā vīnogas, kvieši, krustziežu dzimtas dārzeņi, citrusaugļi, āboli un dažādas gaļas. Diētas biomarķieri papildinātu pastāvošās pieejas, lai novērtētu iedzīvotāju pārtikas patēriņa un uztura paradumus.<sup>19</sup>

Pastāv arī biomarķieri, kurus potenciāli varētu izmantot kā populācijas veselības marķierus. Plašāku saprašanu par oksidatīvo stresu varētu sniegt 8-iso-prostaglandīna mērījumus papildinot ar 8-hidroksi-20-deoksiguanozīns, kas ir saistīts ar oksidatīviem DNS bojājumiem smēķēšanas rezultātā. Ņemot vērā, ka smēķēšanas paradumus var izmērīt WBE izmantojot citus biomarķierus, kā kotinīnu, būtu noderīgi apspriest stresa biomarķierus, kuru izdalīšanos neietekmē smēķēšana. Ortotirozīns ir proteīnu oksidācijas stresa biomarķieris, kura izdalīšanās līmeņi ir paaugstināti tādos gadījumos, kad ir cukura diabēts un nieru mazspēja. Urīna olbaltumvielas un to fragmenti piedāvā iespējas pētījumiem ar biomarķieriem WBE, tomēr rutīnas analīzes notekūdeņos tiem vēl nav piedāvātas.<sup>19</sup>

Alkohola un tabakas izstrādājumu patēriņš ir svarīgs sabiedrības dzīvesveida un paradumu rādītājs. Pārmērīga alkohola lietošana izraisa daudzus nelabvēlīgus veselības traucējumus un izraisa līdz pat 5,3% no visiem nāves gadījumiem visā pasaulē. Kaut arī vairākos pasaules reģionos alkohola lietotāju skaits pēdējo 20 gadu laikā ir samazinājies, kopējais alkohola patēriņš uz vienu pasaules iedzīvotāju, kas vecāki par 15 gadiem, 2016. gadā bija 6,4 litri, kas ir par 1,1 litru vairāk kā 2005. gadā. Arī tabakas izstrādājumu lietošana ir saistīta ar daudziem novēršamiem veselības riskiem, tādēļ tā ir svarīga iespēja faktiskai alkohola patēriņa novērtēšanai un notekūdeņu epidemioloģijas monitoringā.<sup>19,25</sup>

Sanitācijai ir galvenā loma aizsardzībā pret infekcijas slimību izplatību, koncentrējot no kopienas izvadīto zarnu mikrobu slodzi vienā notekūdeņu plūsmā tālākai apstrādei. Tas padara notekūdeņus par ideālu matricu slimību uzraudzībai, jo tie atspoguļo visu zarnu patogēnu slodzi no vietējā sateces baseina un aptver kopienas slimību slogu. WBE infekcijas slimību uzraudzībai ir topošs lauks, kas ir aktuāls visā pasaulē un tā potenciāls turpina pieaugt, kā tas tika konstatēts COVID-19 pandēmijas laikā, jo strauji attīstās augstas caurlaidības sekvencēšana, bioinformātika un biostatistika, kas atbalsta arvien spēcīgākas metodes.<sup>19</sup>

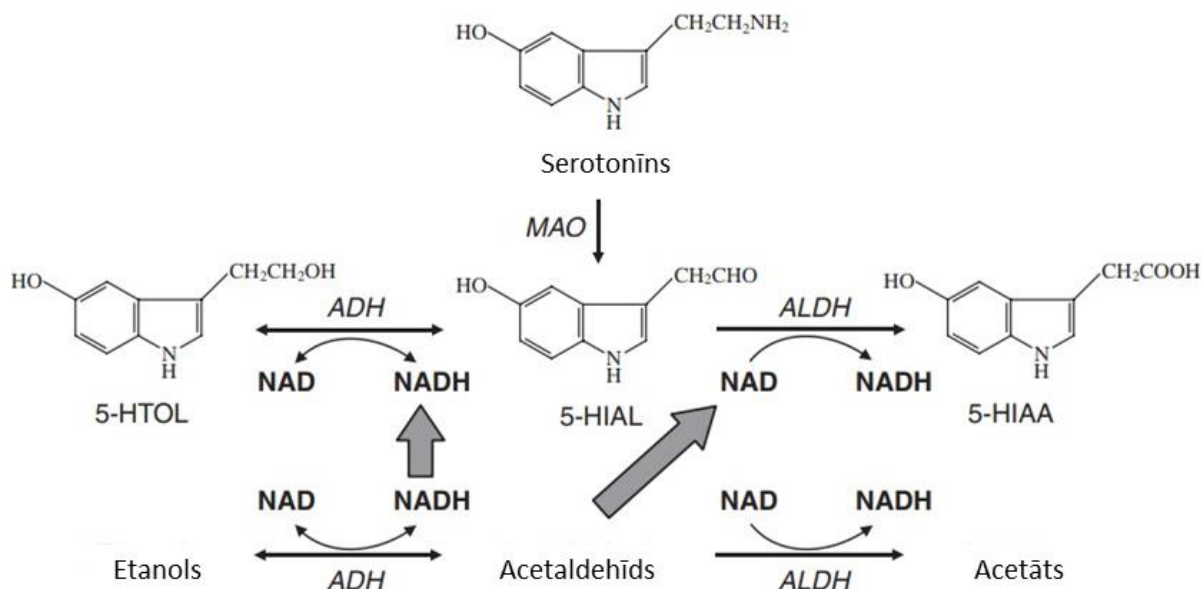
Notekūdeņi var sniegt daudz epidemioloģisko datu un pašreizējie centieni koncentrējas izvērtēt potenciālu izmantot neapstrādātus notekūdeņus un notekūdeņu attīrīšanas iekārtu ietekas, lai uzraudzītu farmaceitisko vielu patēriņu, veselību un dzīvesveida paradumus, iedzīvotāju slimību slogu, kā arī izvērtētu apītē esošo antibiotiku rezistences gēnu daudzveidību un bagātību, sniegtu savlaicīgu brīdinājumu par gaidāmajiem riskiem un novērtētu antibiotiku pārvaldības un veselības intervences programmas.<sup>21</sup>

Tomēr pārliecinoši pielietojumi biomarkšiem notekūdeņos ir atkarīgi no vairākiem laukiem, kuros ir nepieciešama lielāka saprašana. Piemēram urīna biomarkšiem, kuri netiek metabolizēti vai pārveidoti cilvēka organismā varētu nebūt derīgi biomarkšiem sateces baseinos, kas tiek izmantoti lauksaimniecības, pārtikas pārstrādes, ķīmiskajai un farmācijas rūpniecībai. Līdzīgi vajadzētu izvērtēt arī biomarkšiem stabilitāti, īpaši biomarkšiem, kuriem ir zināms, ka tos pārveido zarnu mikroflora un citi mikroorganismi, kas pastāv notekūdeņu sistēmā. Tādēļ kā prioritāte ir jāizvirza mērķis izvēlēties stabilus, labi zināmus un aprakstītus biomarkšiem, lai iegūtu objektīvu informāciju.<sup>19</sup>

### 1.1.1. 5-HIAA

Cilvēka metabolisma raksturīgās endogēnās ķīmiskās vielas ar viendabīgu izdalīšanos visā sabiedrībā un zemu dispersiju būtu ideāli *de facto* populācijas lieluma marķieri. Tiek piedāvāti dažādi biomarkšiem populācijas lieluma novērtēšanai, bet pašlaik 5-HIAA tiek uzskatīts par vispiemērotāko endogēno populācijas lieluma biomarkšiem, kas atbilst lielākajai daļai notekūdeņu epidemioloģijas kritērijiem.<sup>19</sup>

5-HIAA ir endogēns savienojums, kas rodas neurotransmitera, serotonīna, metabolismā un tiek izvadīts ar urīnu (skatīt 1.2. attēlu). Tā ekskrecija nav atkarīga no pasaules reģiona un tādēļ tas ir vairāk piemērots internacionāliem salīdzinājumiem. Tā konsekvents izdalīšanās ātrums urīnā ir aptuveni 3,44 μg/cilvēku/dienā.<sup>20</sup>



1.2. att. Serotonīna metabolisms<sup>26</sup>

Tomēr pastāv problēma ar biomarkšiem stabilitāti kanalizācijas sistēmās, jo tās parasti satur biofilmas, kas ir bagātas ar mikroorganismiem, kas spēj pārveidot vai degradēt organiskos

savienojumus. Saskaņā ar literatūras datiem 5-HIAA uzrādīja vislabāko stabilitāti no vairākiem pārbaudītajiem populācijas lieluma biomarķieriem notekūdeņu paraugu ņemšanas un uzglabāšanas stabilitātes testos, tomēr tas ir salīdzinoši nestabils neattīrītos notekūdeņos. Tā stabilitāti iespējams uzlabot uzglabājot notekūdeņus zemās temperatūrās, pievienojot nātrija metabilsulfītu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (2 g/L) vai paskābinot notekūdeņu paraugus līdz pH 2. Tas arī neuzrādīja afinitāti pret suspendētajām daļiņām. Šie rezultāti nodrošina apstākļus, lai 5-HIAA varētu izmantot korekcijai pret faktisko populāciju un, plaši izmantot WBE kā populācijas lieluma biomarķieri.<sup>19,20,22</sup>

Tomēr pastāv arī intraindividuālās un starpindividuālās atšķirības 5-HIAA izdalīšanā, ko var ietekmēt dažas slimības, piemēram, karcinoīda audzējs, karcinoīda sindroms vai malabsorbcijas sindromi kā celiakija, vai dažu augļu un riekstu daudzums uzturā, vai pat uzņemtā sāls daudzums. Tomēr 5-HIAA ekskrecijas atšķirības, kas saistītas ar diētas un uztura paradumiem kopējās populācijas mērogā netiek uzskatītas par būtiskām. Ar urīnu izdalīto 5-HIAA daudzumu var palielināt arī uzņemot zāles un pārtiku, kas satur triptofānu, no kā veidojas serotonīns cilvēka organismā (skatīt tabulu 1.1). Neatkarīgi no serotonīnu un tā metabolismu ietekmējošiem faktoriem, tika iegūta laba linearitāte starp populācijas lieluma biomarķiera, 5-HIAA, izdalīšanos un tautas skaitīšanas populāciju.<sup>20,22,27</sup>

*1.1. tabula*

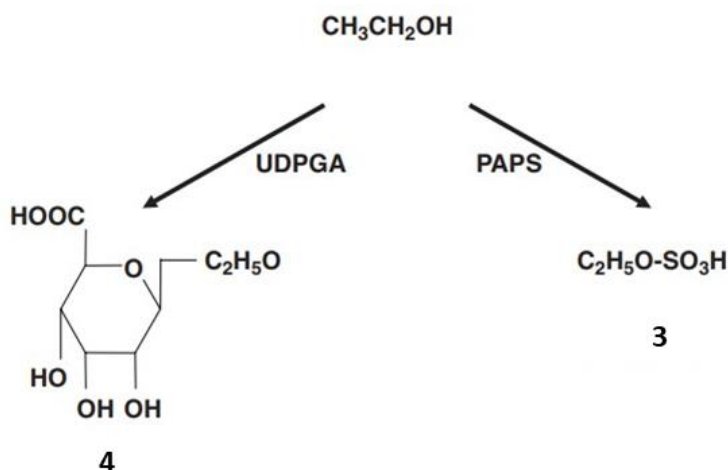
**Pārtikas produkti un ārstnieciskie līdzekļi, kas var veicināt paaugstinātu serotonīna daudzumu**

Pārtikas produkts	Ārstnieciskie līdzekļi
Avokado	Acetaminofēns
Banāni	Acetanilīds
Kivi	Kofeīns
Ananāsi	Hlorpromazīns
Plūmes	Varfarīns
Tomāti	Dekstroamfetamīns
Baklažāni	Efedrīns
Pekanrieksti	Fluoruracils
Hikorijas rieksti	Gvaifenezīns
Valrieksti	Melatonīns
Šokolāde	5-Aminosalicilskābe
Kafija	Metokarbamols
Tītara gaļa	Naproksēns
Cigaretēs	Nikotīns
Tēja	Fenobarbitāls
	Fenacetīns
	Fenotiazīns
	Rezerpīns
	Dekstrometorfāns

Neatkarīgi no tā, tika iegūta laba linearitāte starp populācijas lieluma biomarķiera, 5-HIAA, izdalīšanos un tautas skaitīšanas datiem.<sup>20,22</sup>

### 1.1.2. Etilsulfāts

Alkohola (etanola) patēriņš ir svarīgs sabiedrības veselības un dzīvesveida paradumu biomarķieris. Ir sakarības, kas saista populācijas kopējo alkohola patēriņu ar alkoholismu un neatbildīgu un vai pārmērīgu alkoholisko dzērienu lietošanu. Pārmērīgai alkohola lietošanai ir negatīva ietekme uz veselību gan ilgtermiņā, gan īstermiņā. Informāciju par alkohola patēriņu var gūt no alkohola tirdzniecības statistikas, bet šāda informācija ne vienmēr ir pieejama vai uzticama, tā nespēj rēķināties ar internacionālu tirdzniecību, izšķērdību un krājumu uzglabāšanu. Kā arī no intervijām un pašziņojuma aptaujām gūtā informācija var būt neprecīza, jo respondenti parasti neiekļauj informāciju par pārmērīgas lietošanas reizēm. Precīzākai alkohola patēriņa noteikšanai var izmantot specifisku tā metabolītu etilsulfātu (EtS) (3) vai etilglikuronīdu (EtG) (4) monitoringu (skatīt 1.3. attēlu).<sup>19,28-30</sup>



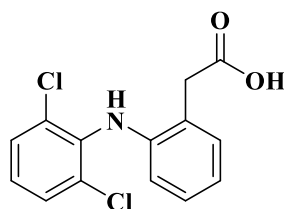
### 1.3. att. Etanola metabolisms par etilsulfātu un etilglikuronīdu<sup>26</sup>

Etilsulfāts un etilglikuronīds ir etanola tiešie otrās fāzes metabolīti, kas salīdzinot ar pirmās fāzes oksidatīvā metabolisma produktiem, nepārsniedz 0,1%, no kopējiem etanola metabolisma produktiem. To koncentrācija urīnā pēc etanola uzņemšanas sasniedz maksimālo koncentrāciju 4 h laikā un ir detektējama vēl 32 h pēc etanola uzņemšanas. Neņemot vērā EtS zemo izdalīšanās daudzumu pēc etanola uzņemšanas (0,010% - 0,016% no sākotnējās devas) tā lielais daudzums, ko patērē sabiedrība, ļauj to noteikt notekūdeņos. Dažos pētījumos EtS daudzums notekūdeņos ir pārvērsts etanola daudzumā, kas patērēts litros uz 1000 cilvēkiem dienā, ko var arī pārvērst standarta dzērienu vienībās.<sup>19,26,31</sup>

Etilsulfāta stabilitāte ir pētīta dažādās matricās un salīdzināta ar citu etanola metabolītu stabilitāti, ieskaitot etilglukuronīdu. Asins paraugos temperatūrās +37°C, +25°C +4°C un -20°C temperatūrā 7 dienu laika periodā EtS koncentrācijas no vidējās vērtības standartnovirze nepārsniedza 5%, savukārt EtG koncentrācija samazinājās +37°C un +25°C temperatūrā. Urīna paraugos istabas temperatūrā, +4°C un -20°C temperatūrā 3 nedēļu periodā EtS standartnovirze no vidējās vērtības bija mazāka par 10%. Notekūdeņu paraugos 18 h laikā EtS neuzrādīja degradācijas pazīmes, savukārt EtG koncentrācija pēc 18 h inkubācijas bija 50% no tā sākotnējās koncentrācijas. EtS koncentrāciju arī neietekmē iespējamās baktērijas, enzīmi un etanola koncentrācija paraugā. Šīs īpašības padara etilsulfātu par piemērotu biomarķieri faktiskai etanola patēriņa novērtēšanai.<sup>28,32,33</sup>

### 1.1.3. Diklofenaks

Diklofenaks (DCF) (**5**) (skatīt 1.4. attēlu) ir nesteroīds pretiekaisuma līdzeklis, ko izmanto sāpju un iekaisuma slimību ārstēšanai. Latvijā to pārdod ar zīmoliem kā Almiral, Diclac, DicloGen, Diclovit, Falogel, Olfen, Voltaren Emulgel un Voltaren Forte.<sup>34</sup> Tā plašākie pielietojumi ir uzņemot iekšķīgi, vai uzklājot uz ādas gēla veidā sāpju un iekaisumu mazināšanai vai mīksto audu traumu gadījumā. To var uzņemt arī rektāli svecītē un injekcijas veidā. Tā pretsāpju iedarbība var ilgt pat 8 h.<sup>35,36</sup>

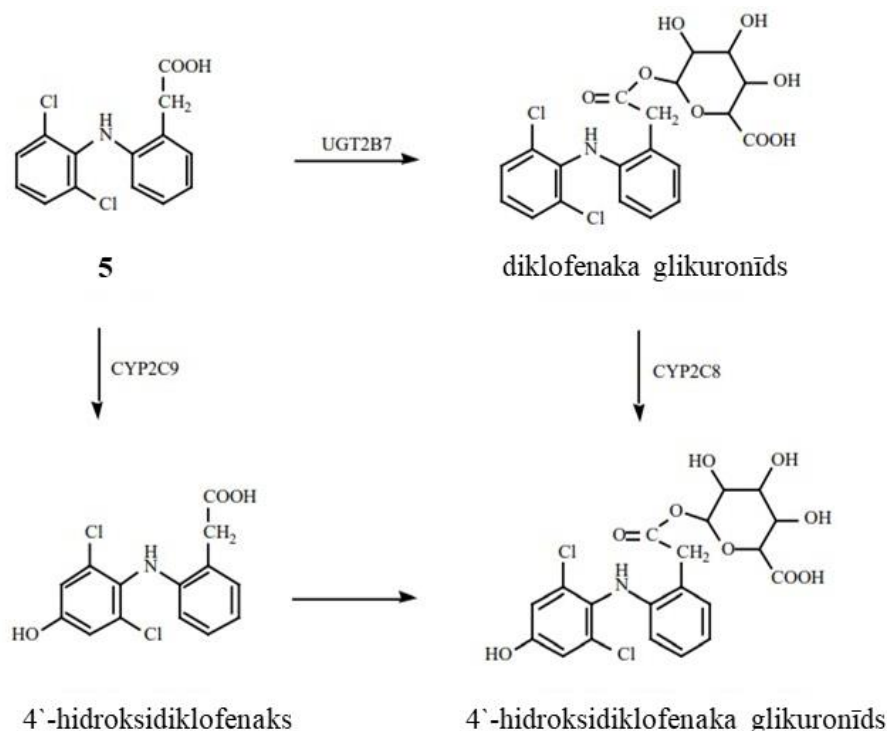


5

#### 1.4. att. Diklofenaka struktūrformula

Uzņemto DCF cilvēka ķermenis gandrīz pilnībā metabolizē. Konstatēts, ka lokālā gēla adsorbcija ir mazāka par 10% un atlikusī daļa tiek nomazgāta no ādas vai uznesta uz apgērba. Liela daļa no DCF, kas nonāk notekūdeņos varētu nākt caur ādu neuzņemtās devas nomazgāšanas ceļā, jo DCF plaši lieto gēla veidā. Lai mazinātu DFC piesārņojumu ir piedāvāta procedūra, kas iekļauj roku noslaucīšanu ar papīra salveti pirms mazgāšanas, tādējādi samazinot notekūdeņos nonākošo DFC no ādas par 60%. No uzņemtās devas 65–70% tiek izvadīti ar urīnu un 20–30% ar izkārnījumiem kā pamatzāles vai metabolīti (skatīt 1.5.attēlu). Lielākā daļa DCF tiek metabolizēti cilvēka organismā, un tikai < 1% no lietotās devas tiek izvadīts nemetabolizēta DCF veidā. Pasaules Veselības organizācija (WHO) ir definējusi diklofenaka dienas devu kā

100 mg, kas nozīmē, ka no šīs devas mazāk nekā 1 mg tiek izvadīti no cilvēka ķermeņa kā DCF un aptuveni 11 mg kā tā konjugāti. Pārējā ievadītās devas daļa tiek izvadīta kā DCF metabolīti vai to konjugāti, tomēr galveno DCF metabolītu pretiekaisuma aktivitāte ir vismaz 10 reizes

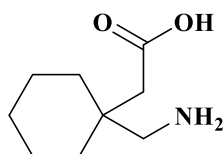


zemāka salīdzinājumā ar DCF aktivitāti.<sup>36,37</sup>

### 1.5. att. Diklofenaka metaboliskais ceļš cilvēka organismā.<sup>38</sup>

#### 1.1.4. Gabapentīns

Gabapentīns (**6**) (skatīt 1.6. attēlu) ir pretkrampju līdzeklis, ko izmanto arī epilepsijas un pēcherpetiskas neiralģijas ārstēšanai, bieži tiek izmantots tam neparedzētiem nolūkiem. To izraksta, lai ārstētu plašu veidu sāpes, ko var uzskatīt par atbildes reakcija uz opioīdu epidēmiju, un arī citas ar sāpēm nesaistītas diagnozes, tostarp bipolāros traucējumus un nemierīgo kāju sindromu.<sup>39</sup>



**6**

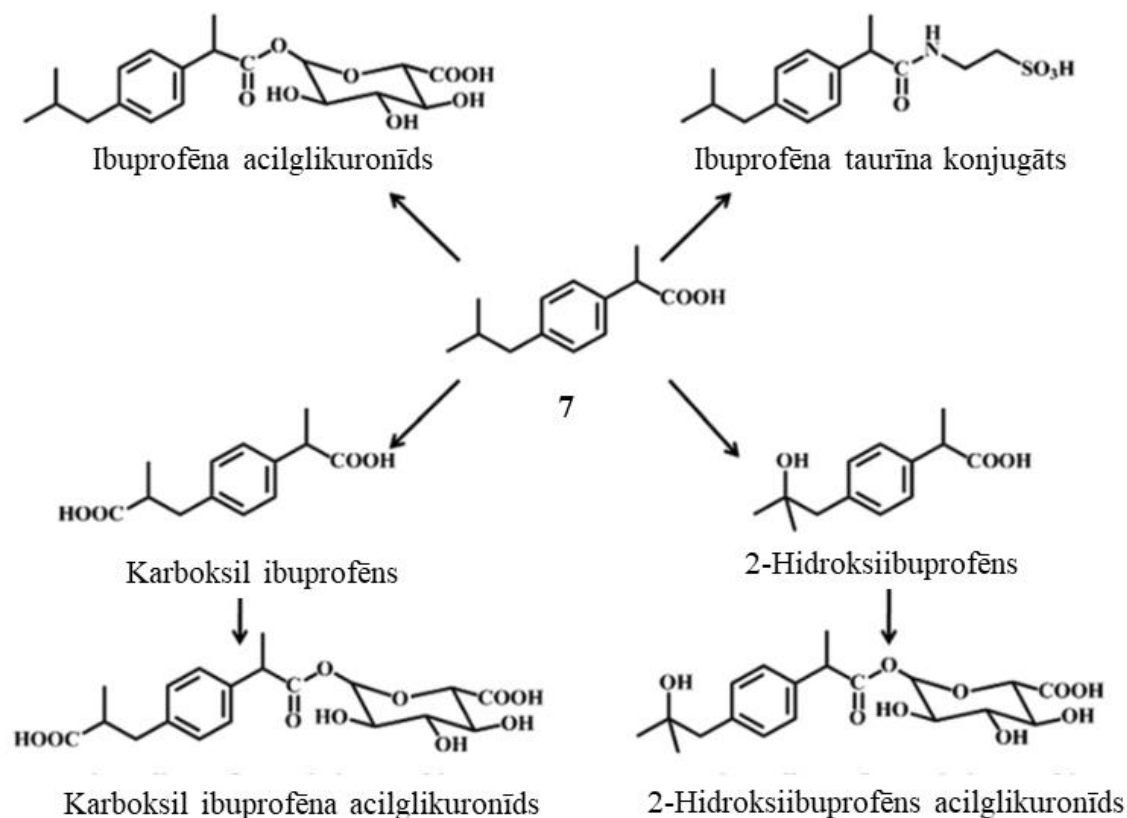
### 1.6. att. Gabapentīna struktūrformula

Gabapentīnu bieži izraksta arī veterinārārsti, arī tam neparedzētam lietojumam. Ir maz pierādījumu, kas pamatotu tā plašo izmantošanu kā pretsāpju līdzekli, tomēr veterinārārsti dažreiz dod priekšroku gabapentīnam virs nesteroīdiem pretiekaisuma līdzekļiem.<sup>40</sup>

Gabapentīns cilvēka organismā netiek metabolizēts organismā un tiek izvadīts nemainītā veidā caur nierēm. Savukārt dažādos dzīvniekos gabapentīns tiek metabolizēts atšķirīgi.<sup>41</sup>

### 1.1.5. Ibuprofēns

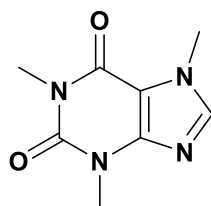
Ibuprofēns (7) ir nesteroīds pretiekaisuma līdzeklis, ko izmanto sāpju, drudža un iekaisuma ārstēšanai. Tas ir lēts bezrecepšu līdzeklis, kuram ir plašs paredzēto lietojumu skaits. Ibuprofēns ir toksisks videi, un koncentrācija NAI un ūdenstilpēs pieaug, jo palielinās tā patēriņš. Tas var radīt bīstamu ietekmi uz vidi tā bioloģiski aktīvās dabas dēļ, ņemot vērā, ka tā tipiskā deva ir 600 – 1200 mg un apmēram 15% no uzņemtā daudzuma tiek izvadīts nemetabolizētā veidā. Ibuprofēna metabolisms parādīts 1.7. attēlā. Tradicionālās notekūdeņu attīrīšanas metodes nav efektīva ibuprofēna vai tā metabolītu attīrīšanai tādēļ, tas kļūst visuresošs ūdenstilpēs. Nonākot ūdenstilpēs tas var bioakumulēties aļģēs un citos ūdens ekosistēmu organismos un lielās koncentrācijās var izraisīt ilgtermiņa toksicitāti vai apturēt to augšanu. Arī dažiem tā metabolītiem ir novērotas toksiskas īpašības uz ūdens ekosistēmām.<sup>19,42,43</sup>



1.7. att. Ibuprofēna metabolisms cilvēka organismā<sup>44</sup>

### 1.1.6. Kofeīns

Kofeīns (**8**) ( skatīt 1.8. attēlu) ir augos sastopams alkoloīds, kas pieder pie metilksanānu klases. Tas ir plaši lietots centrālās nervu sistēmas stimulants, ko cilvēki uzņem dažādos veidos gan no dabīgiem avotiem, gan ar kofeīnu bagātinātiem produktiem. Dabā sastopamie kofeīna avoti iekļauj kafijas pupiņas, tējas lapas, kolas riekstus, kakao pupiņas, gvarānas sēklas un paragvajijas ileksa lapas (Mate). Kofeīnu arī pievieno pārtikas produktiem, gāzētajiem dzērieniem, uztura bagātinātājiem un medikamentiem.<sup>45,46</sup>



**8**

#### 1.8. att. Kofeīna struktūrformula

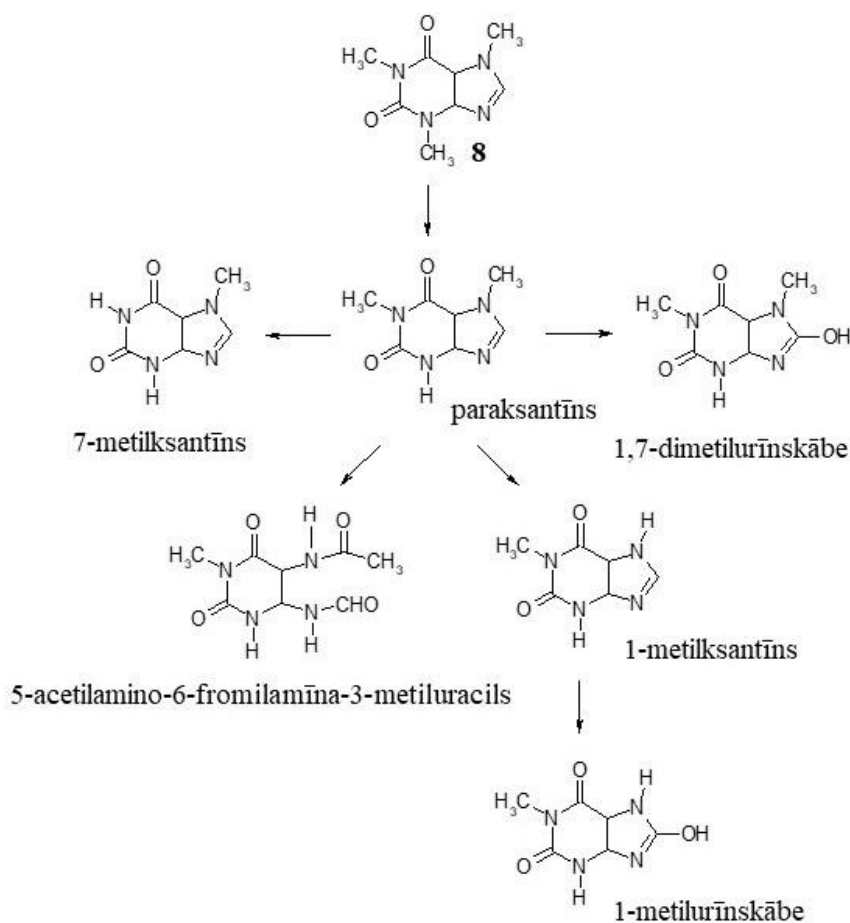
Kofeīnu uzņem aptuveni 90% no pasaules iedzīvotājiem un galvenie tā avoti ir tēja, kafija enerģijas un citi gāzētie dzērieni. Galvenais kofeīna lietošanas mērķis ir mundruma sajūtas radīšana, garstāvokļa un veiktspējas uzlabošana. Mazāk svarīgi tā uzņemšanas iemesli ir to saturošo dzērienu patīkamā garša, sociālie aspekti, uzlabotas koncentrēšanās spējas, palielināta fiziskā enerģija un stresa mazināšana.<sup>47,48</sup>

Uzņemtā kofeīna daudzuma noteikšanai dažādās populācijās ir izmantotas tādas metodes kā kofeīna metabolītu noteikšana urīnā un kofeīnu saturošu dzērienu uzņemšanas biežuma aptaujas. Vidējais dienā uzņemtais kofeīna daudzums Amerikas Savienoto Valstu studentiem ( $n = 1248$ ) bija 159 mg un kafija bija galvenais tā avots.<sup>47</sup> Savukārt Kanādas iedzīvotāju ( $n = 79$ ) vidējais uzņemtais kofeīna daudzums dienā bija 151 mg un lielākais kofeīna avots, bija to saturoši dzērieni.<sup>49</sup> Tēja ir otrs galvenais kofeīna avots un vidējais dienā uzņemtais tā avots no tējas Ķīnas iedzīvotājiem ( $n = 1082$ ) bija 180 mg.<sup>48</sup> Aptuveni 10% no iedzīvotājiem, kas piedalījās šajos pētījumos pārsniedza ieteikto kofeīna devu, kas ir 400 mg/dienā.<sup>50</sup>

Pārmērīga kofeīna lietošana var radīt nervu sistēmas traucējumus, kā miega traucējumus, garstāvokļa izmaiņas, nervozitāti, aizkaitināmību, nemieru un saasināt jau esošas psihiskos traucējumus. Kofeīna pārdozēšana rada nelabvēlīgus sirds un asinsvadu sistēmas simptomus, kā paaugstinātu asins spiedienu, aritmiju, sirdsklauves, miokarda infarktu un pat sirds apstāšanos. Toksiski efekti var iestāties ar dozām, kas lielākas par 1,2 g un dozas no 10 līdz 14 g ir letālas cilvēkiem. Grūtniecēm iespējamā toksikoloģiskā iedarbība iekļauj embrionālos

apgrūtinājumus, kā spontāno abortu, nedzīvi dzimušus bērnus, priekšlaicīgas dzemdības un zemu dzimšanas svaru. Tiek uzskatīts, ka ierasta kofeīna uzņemšana devās līdz 400 mg/d nerada nelabvēlīgus riskus veselībai veseliem pieaugušajiem. Balstoties WHO un *Health Canada* viedoklim, devas līdz 300 mg/dienā nerada embrionālos apgrūtinājumus vai nelabvēlīgus iznākumus bērnībā. Eiropas pārtikas drošības iestāde secināja, ka 200 mg/dienā nerada risku vai bažas par augļa drošību.<sup>48</sup>

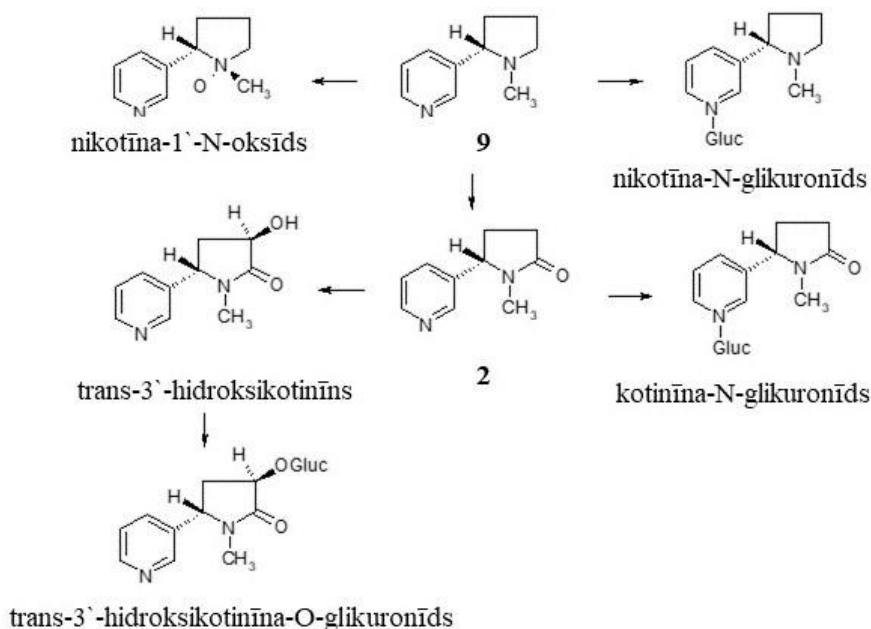
Uzņemto kofeīna daudzumu notekūdeņos var noteikt, izmantojot kofeīnu un tā metabolītus, paraksantīnu (1,7-dimetilksantīnu), 1-metilksantīnu, 7-metilksantīnu un 1,7-dimetilurīnskābi (skatīt 1.9. attēlu). No tiem 1-metilksantīns un 7-metilksantīns var nebūt optimāli kofeīna uzņemšanas biomarkķieri, jo tie ir arī attiecīgi teofilīna un teobromīna metabolīti, kas ir dažos pārtikas produktos, dzērienos un farmaceitiskajos preparātos. Ir konstatēta laba korelācija starp uzņemtā kofeīna daudzumu, kas noteikts ar WBE, izmantojot 1,7-dimetilurīnskābi, ar individuālo aptauju datiem, un dažos sateces baseinos ar kafijas tirdzniecības statistiku. Dažu kofeīna marķieru stabilitāte ir noteikta kā apmierinoša notekūdeņu pārbaudes laikā.<sup>19</sup>



1.9.att. Kofeīna metabolisms<sup>23</sup>

### 1.1.7. Kotinīns

Kotinīns (**2**) ir nikotīna (**9**) galvenais metabolīts, ko var izmantot tabakas un tabakas izstrādājumu lietošanas paradumu aplēsēm. Nikotīna metabolisms skatāms 1.10. attēlā. Tabakas un tabakas izstrādājumu atkarību izraisošā iedarbība ir saistīta ar nikotīna klātbūtni, kas ir galvenā psihoaktīvā viela tabakas augos. Smēķēšanai ir arī liela negatīva ietekme uz veselību.<sup>51</sup>



1.10. att. Nikotīna metabolisms<sup>23</sup>

Tabakas lietošanas aplēsēm izmanto nikotīna metabolītus kā galvenos biomarkierus, jo to farmakokinētika ir samērā labi zināma. Daži nikotīna patēriņa avoti, piemēram, nikotīna gumija, plāksteri un e-cigaretes, dos ieguldījumu šajās aplēsēs, kaut arī tie nav tabakas izstrādājumi un nenorāda uz smēķēšanas paradumiem. Notekūdeņos ir novērtēti arī citi tabakas biomarkieri, anabasīns un anatabīns, lai uzraudzītu tabakas patēriņu. Lai gan to farmakokinētika nav labi izprotama, tie var patiesāk atspoguļot tabakas lietošanu, jo tie ir sastopami tikai tabakas lapās, nevis citos nikotīna avotos, piemēram, nikotīna atmešanas terapijās.<sup>19</sup>

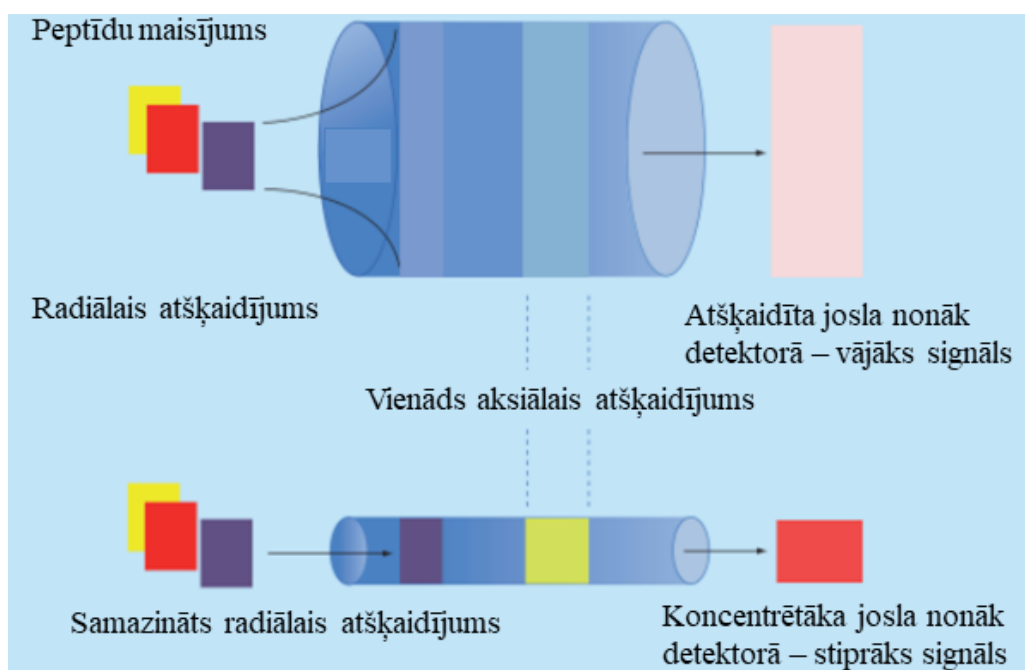
Kotinīns ir arī piedāvāts kā populācijas lieluma biomarkieris tā stabilitātes notekūdeņos un korelācijas ar tautas skaitīšanas datiem dēļ. Tomēr smēķēšana tiek uzskatīta par ģeogrāfisku un no kultūras atkarīgu uzvedību, tādēļ tā izmantojamību kā PLB vajadzētu ierobežot līdz salīdzinājumiem starp apgabaliem vai vienas un tās pašas zonas salīdzinājumiem laikā, vai izmantot citus, labākus PLB kā, piemēram, 5-HIAA.<sup>22</sup>

## 1.2. Nano-plūsmas šķidrumu hromatogrāfija

Pēdējo desmitgažu laikā sasniegtie tehnoloģiskie sasniegumi ir veicinājuši piemērotu platformu izstrādi darbam miniaturizētā šķidrumu hromatogrāfijas (LC) mērogā. Miniaturizētā LC var piedāvāt augstāku analīzes efektivitāti, kas nodrošina labāku hromatogrāfisko izšķirtspēju un vispārējo jutību nekā parastā LC. Nano-plūsmas LC (nano-LC), saistīta ar masspektrometrisko (MS) detektēšanu, var palīdzēt atrisināt problēmas, kas saistītas ar zemas koncentrācijas vielu analīzi sarežģītās matricās. Nano-LC hromatogrāfiskā atdalīšanas tiek veikta, izmantojot plūsmas ātrumu nanolitros minūtē (nL/min), kas rada augstu analītisko jutīgumu, pateicoties mazākam hromatogrāfiskajam atšķaidījumam, ko nodrošina šāda veida hromatogrāfija (skatīt 1.11 attēlu). Hromatogrāfisko atšķaidījumu var aprēķināt pēc formulas 1.2.<sup>16,52-54</sup>

$$D = \frac{C_0}{C_{max}} = \frac{\pi d_c^2 \varepsilon (1+k) \sqrt{2HL\pi}}{4V_{inj}} \quad (1.2)$$

- , kur
- $C_0$  – sākotnējā analīta koncentrācija paraugā;
  - $C_{max}$  – analīta koncentrācija pīķa maksimumā (galīgā koncentrācija);
  - $D_c$  – kolonnas iekšējais diametrs;
  - $L$  – kolonnas garums;
  - $H$  – teorētisko šķīvju augstums;
  - $V_{inj}$  – injekcijas tilpums;
  - $\varepsilon$  – kopējā porainība.



1.11. att. Hromatogrāfiskā atšķaidījuma attēlojums<sup>55</sup>

Nano-LC ir liels potenciāls analītikas nozarē, kaut arī tas ir mazāk izmantots rutīnas analīzēs, salīdzinājumā ar augsti efektīvo šķidrumu hromatogrāfiju (HPLC), kaut gan nano-LC ir svarīga loma pētniecībā un tādās nozarēs kā: bioanalītiskā ķīmija, proteomika, biomedicīna, kriminālistika, hirālā atdalīšana, vides paraugu analīze, farmācijā, pārtikas produktu analīze un agroķīmija. Tā piedāvā iespēju noteikt mērķa analītus sarežģītās matricās, mazās koncentrācijās. Kā arī salīdzinājumā ar HPLC plūsmas ātrums ir aptuveni tūkstoš reižu mazāks (no mL/min skalas līdz nL/min), kas samazina nepieciešamo eluenta daudzumu un līdz ar to veidojas mazāk atkritumu. Nano-LC ir arī vieglāk savienojams ar MS detektoriem, jo mazāks plūsmas ātrums un šaurāks kapilāru un emitera iekšējais diametrs nodrošina vieglāku un pilnīgāku analītu jonizāciju. Kā arī samazinātais kolonnas iekšējais diametrs samazina hromatogrāfisko atšķaidījumu.<sup>16,52,56</sup>

Miniaturizācijas ieguvums ir arī kolonnas ar mazāku iekšējo diametru un mazākiem daļiņu diametriem vai kolonnas, kur stacionārā fāze ir uznesta uz kolonnas iekšējās sienas, kā tas ir, piemēram, gāzu hromatogrāfijā. Atkarībā no kolonnas iekšējā diametra un plūsmas ātruma ir izveidojušās vairākas klasifikācijas šķidrumu hromatogrāfijai, un viena no tām ir parādīta 1.2. tabulā.<sup>16</sup>

1.2. tabula

**Šķidrumu hromatogrāfijas kolonnas iekšējā diametra un imantotā plūsmas ātruma apzīmējumi<sup>57</sup>**

Apzīmējums	Kolonnas iekšējais diametrs	Tipiskais plūsmas ātrums	Veiktspējas novērtējums
Nano-LC	20 – 100 μm	20 – 500 nL/min	Augsta efektivitāte un jutība
Kapilārā LC	100 – 500 μm	0,5 – 10 μL/min	Labs kompromiss efektivitātei un caurlaidspējai ar uzmanību jutībai
Mikro LC	0,5 – 2,1 mm	10 – 500 μL/min	Labs kompromiss efektivitātei un caurlaidspējai ar uzmanību slodzei
Parastā LC	2,1- 4,6 mm	0,5 – 2,5 mL/min	Augstas caurlaidspējas analīzes
Preparatīva LC	≥ 4,6 mm	≥ 2,5 mL/min	Veikta tikai spiedienā no 200 līdz 400 bar

Nanoplūsmas nodrošināšanai ir nepieciešama, precīza un stabila eluenta padeves sistēma. Turklāt, lai samazinātu gradienta aizkavi un atšķaidījumu, sistēmai ir jābūt minimālam tukšajam tilpumam. Mūsdienās visplašāk tiek izmantoti miniaturizēti divu virzuļu sūkņi, kas nodrošina pastāvīgu eluenta padevi un zemas spiediena pulsācijas. Šļirces sūkņi var vadīt

mobilo fāzi bez pulsācijām, bet limitējošs faktors ir ierobežots tilpums iekšējā rezervuārā, ko var pārvarēt izmantojot divus vai vairākus šļirces sūkņus. Pastāv arī elektroosmotiskie vai elektrokinētiskie sūkņi, kas izmanto elektroosmotisko plūsmu miniaturizētās kolonnās. Elektroosmotisko plūsmu panāk pieliekot noteiktu spriegumu. Lai arī tie spēj nodrošināt bezimpulsa plūsmu, tiem ir daudz ierobežojumu kā neatkārtojams eluēšanas gradients un nesaderība ar lielu organisko šķīdinātāju daudzumu kustīgajā fāzē.<sup>16,52</sup>

Visu augstspiediena nedalīto nanoplūsmas konfigurāciju būtiskas daļas ir vadības bloks un precīzs nanoplūsmas mērītājs. Vadības bloks virza virzuļa kustību ļoti precīzi atbilstoši plūsmas vērtībai, ko uztver augstas precizitātes nanoplūsmas mērītājs un precīzu plūsmas ātrumu panāk ar spiediena un termoplūsmas sensoru palīdzību. Tipiskā nedalītā nanoplūsmas konfigurācijā ir viens nanoplūsmas mērītājs katrā kanālā, kas kalibrēts atbilstoši izmantotajam šķīdinātājam. Šķīdinātāji no atsevišķiem kanāliem tiek sapludināti maisītājā. Tilpumu izmaiņu, kas notiek sajaucoties dažādiem šķīdinātājiem un spiediena dēļ, faktiskā plūsma tiek koriģēta, lai atbilstu iestatītajam plūsmas ātrumam. Šādu konfigurāciju izmanto vairums komerciāli pieejamo sistēmu, kas paredzētas nano-LC. Vēsturiski sākotnējā pieeja plūsmas gradienta izveidei var panākt attēces plūsmas kontroles sistēma, kur tīri šķīdinātāji, kas tiek piegādāti ar izokrātiskiem sūkņiem, tiek sadalīti caur T veida cauruli ar atšķirīgu iekšējo diametru un refluksēti atpakaļ uz rezervuāru.<sup>52</sup>

Neraugoties uz visām šīm priekšrocībām, nano-LC ir daži trūkumi. Vidēji analīzes laiks ir lielāks, kaut gan tas ir atkarīgs no konkrētās metodes, grūtības noteikt un apturēt noplūdes iekārtās un kapilāru un savienojumu aizsērēšana maza diametra dēļ ir dažas kaitinošas problēmas, kas saistītas ar nano-LC. Visbeidzot, komerciāli pieejamās nano-LC platformas arī cieš no to augstajām izmaksām un dārgiem palīgmateriāliem.<sup>16,52</sup>

### **1.3. Masspektrometriskā detektēšana**

Šķidrums hromatogrāfijas- augstas izšķirtspējas masspektrometrijas (HRMS) izmantošana sarežģītu matricu analizēšanai ir kļuvusi par nozīmīgu pētījumu jomu. HRMS priekšrocības ir palielināta selektivitāte un samazināts fons. Notekūdeņu sarežģītās matricas dēļ to analizēšanai izmanto jutīgas metodes kā Orbitrap, tandēma masspektrometriju (MS/MS) un trīskāršā kvadrupola (QQQ) masspektrometriju. Tabulā 1.3. apkopoti dažādu biomarkieru detektēšanas parametri notekūdeņos izmantojot MS.

## Populācijas biomarkieru noteikšanas parametri notekūdeņos izmantojot MS

Analīts	Hromatogrāfijas veids	Detektēšana	Paraugu sagatavošana	LOQ	Matricas efekts	Atsauce
EtS	Ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija (UPLC)	Tandēma kvadrupolu masspektrometrija (MS/MS)	Tiešā injekcija	8 nM	-	28
Kotinīns	LC	trīskāršā kvadrupola (QqQ) MS/MS	Tiešā injekcija	0,2 µg/L	33% - 40%	51
Kofeīns	HPLC	QqQ MS/MS	Cietfāzes ekstrakcija (SPE)	3,6 ng/L	-	23
Kotinīns	HPLC	QqQ MS/MS	SPE	0,43 ng/L	-	23
5-HIAA	UPLC	QqQ MS	SPE	2,5 ng/L	109,7%	8
Kotinīns	UPLC	QqQ MS	SPE	5,0 ng/L	40,4%	8
Kofeīns	UPLC	QqQ MS	SPE	100,0 ng/L	99,8%	8
Kofeīns	UPLC	Kvadrupolu orbitālā jonu slazda MS	SPE	2,0 ng/L	-	58
DCF	UPLC	Kvadrupolu orbitālā jonu slazda MS	SPE	1,0 ng/L	-	58

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Reāģenti un materiāli

#### Laboratorijas trauki un piederumi

- Analītiskie svāri *Kern 770* ar precizitāti 0,0001 g;
- Laboratorijas stikla mērtāuki, A klase;
- Centrifūgas polipropilēna mēģenes 15 un 50 mL;
- Automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu;
- Šļircēs un reģenerētās celulozes šļircēs filtri ar poru izmēru 0,45 μm;
- Centrifūgas stobriņi;
- Hromatogrāfiskās stikla viāles;
- Mehāniskais kratītājs, piem., *Vortex*;
- Termostatējamā centrifūga, piem., *Ependorf Centrifuge 5810R*.

#### Reāģenti

- Metanols (*HPLC* tīrības pakāpe);
- Dejonizēts ūdens (1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm);
- Amonija acetāts (*ACS* tīrības pakāpe);
- Acetonitrils (*LC-MS* tīrības pakāpe);
- Dejonizēts ūdens (*LC-MS* tīrības pakāpe);
- Tetrabutilamonija bromīds (*TBAB*) (>98% tīrība);
- Kofeīns (*Sigma Aldrich*, farmaceitiskais sekundārais standarts);
- Kotinīns (*Sigma-Aldrich*, tīrība 99,6%);
- Diklofenaka nātrija sāls (*Sigma-Aldrich*, tīrība 98,5%);
- Etilsulfāta nātrija sāls (*Sigma-Aldrich*, tīrība 98%);
- Gabapentīns (*Sigma-Aldrich*, tīrība 98,8%);
- 5-HIAA (*Sigma-Aldrich*, tīrība 99%);
- Ibuprofēns (*Dr.Ehrenstorfer*, tīrība 98,9%).

### 2.2. Izmantoto šķīdumu sagatavošana

101 mM *TBAB* šķīdums: 10 mL mērkolbā iesvēra 0,326 g *TBAB* un izšķīdināja nelielā *LC-MS* tīrības ūdens daudzumā, un uzpildīja līdz atzīmei ar *LC-MS* tīrības ūdeni.

500 mM amonija acetāta šķīdums: 50 mL mērkolbā iesvēra 1,93 g amonija acetāta un izšķīdināja nelielā LC-MS tīrības ūdens daudzumā, un uzpildīja līdz atzīmei ar LC-MS tīrības ūdeni.

10 mM amonija acetāta šķīdums ūdenī ar 1% acetonitrila: 100 mL mērkolbā pievienoja 2 mL 500 mM amonija acetāta šķīduma, 1 mL ACN un uzpildīja līdz atzīmei ar LC-MS tīrības ūdeni.

**Pamatšķīduma pagatavošana.** Pamatstandartšķīdumus ar koncentrāciju ~1000 ng/μL pagatavoja 10 mL mērkolbā. ~10 mg standartvielas izšķīdināja atbilstošā šķīdinātājā un izpildīja līdz atzīmei ar atbilstošo šķīdinātāju. Pamatšķīdumu precīzo koncentrāciju aprēķināja izmantojot standartvielas precīzo iesvaru, tīrību un savienojuma veidu, kādā tas ir standartvielā. Pamatšķīdumus uzglabāja -18°C temperatūrā.

**Darba standartšķīdumu pagatavošana.** Darba standartšķīdumus ar koncentrāciju 1 ng/μL pagatavoja atšķaidot pamatstandartšķīdumus 10 mL mērkolbā ar metanolu līdz atzīmei.

### 2.3. Paraugu sagatavošana

Notekūdēns paraugus sakratīja, nelielu alikvotu samaisīta parauga filtrēja ar 0,45 μm reģenerētās celulozes (RC) membrānu šļirces filtru centrifūgas stobriņā un centrifugēja ar 20000 apgriezieniem minūtē, 10 minūtes 4°C temperatūrā. 200 μL filtrēta un centrifugēta parauga pārnesa stikla viālē bez ieliktna, pievienoja 20 μL 500 mM amonija acetāta šķīduma, 110 μL 101 mM TBAB šķīduma un 670 μL LC-MS tīrības ūdens (kopējais parauga tilpums 1 mL). Kalibrēšanas paraugiem pievienoja darba standartšķīdumu ar koncentrāciju 1 ng/μL vai 0,1 ng/L attiecīgi pārrēķinot pievienoja LC-MS tīrības ūdens tilpumu, lai kopējais tilpums būtu 1000 μL un paraugu atšķaidīšanas faktors ir 5 (*dilute-and-shoot* pieeja). Kalibrēšanas standartu sagatavošanas shēma parādīta 2.1 tabulā. Paraugus samaisīja ar *Vortex* palīdzību un analizēja ar nanoplūsmas šķīdumu hromatogrāfiju- Orbitrap masspektrometriju.

2.1. tabula

**Kalibrācijas šķīdumu pagatavošanas shēma**

Līmenis	Analītu koncentrācijā paraugā, μg/L	Standartšķīduma koncentrācija, ng/μL	V NH <sub>4</sub> OAc, μL	V TBAB, μL	V paraugs, μL	V std, μL	V H <sub>2</sub> O, μL
1	0,5	0,1	20	110	200	5	665
2	1	10	20	110	200	1	669
3	2	10	20	110	200	2	668
4	5	10	20	110	200	5	665
5	10	10	20	110	200	10	660

Līmenis	Analītu koncentrācijā paraugā, $\mu\text{g/L}$	Standartšķiduma koncentrācija, $\text{ng}/\mu\text{L}$	V $\text{NH}_4\text{OAc}$ , $\mu\text{L}$	V TBAB, $\mu\text{L}$	V paraugs, $\mu\text{L}$	V std, $\mu\text{L}$	V $\text{H}_2\text{O}$ , $\mu\text{L}$
1	0,5	0,1	20	110	200	5	665
6	20	10	20	110	200	20	650
7	50	10	20	110	200	50	620
8	100	10	20	110	200	100	570

## 2.4. Instrumentālā analīze

Instrumentālo analīzi veica, izmantojot nanoplūsmas šķidrumu hromatogrāfu *UltiMate 3000 RSLCnano* (Thermo Fischer Scientific, USA), kas savienots ar kvadrupola orbitālā jonu slazda augstas izšķirtspējas masspektrometru *Q-Exactive Focus Orbitrap-HRMS* (Thermo Fischer Scientific, USA). Šķidrumu hromatogrāfs aprīkots ar *EASY-Spray C18* (150 x 0,075 mm, daļiņu diametrs 2  $\mu\text{m}$ ) nano-LC kapilāro kolonnu ar integrētu emiteri (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Kolonnas temperatūra iestatīta 30°C un plūsmas ātrums 500 nL/min. Kustīgās fāzes “A” sastāvs - 10 mM amonija acetāta šķidrumu LC-MS tīrības ūdenī ar 0,01% etiķskābes un 1% acetonitrila piedevu un kustīgā fāze “B” - acetonitrils. Gradianta programmu skatīt tabulā 2.2. Cilpas tilpums 70 nL, temperatūra autosamplerī 10°C.

2.2. tabula

### Metodē izmantotā gradianta programmas parametri

Laiks, min	A, %	B, %	Taisnes slīpums
0,0	95	5	5
1,0	95	5	5
11,0	65	35	5
13,5	20	80	6
26,0	20	80	5
27,0	95	5	4
45,0	95	5	4

Masspektrometriskā detektēšana tika veikta pozitīvajā un negatīvajā jonizācijā *Full Scan* režīmā. Jonizācijas veids nanoplūsmas elektroizsmidzināšanas interfeiss (*EASY-Spray source*). *Spray Voltage* 2,26 kV, kapilāra temperatūra 200°C, S – lēcas *RF* līmenis 60 vienības, izšķirtspēja 70000, *AGC target* 3e6, *Max. IT* 300 ms un skenēšanas diapazons 100 – 350 m/z. Analītu skenēšanas parametri skatāmi tabulā 2.3.

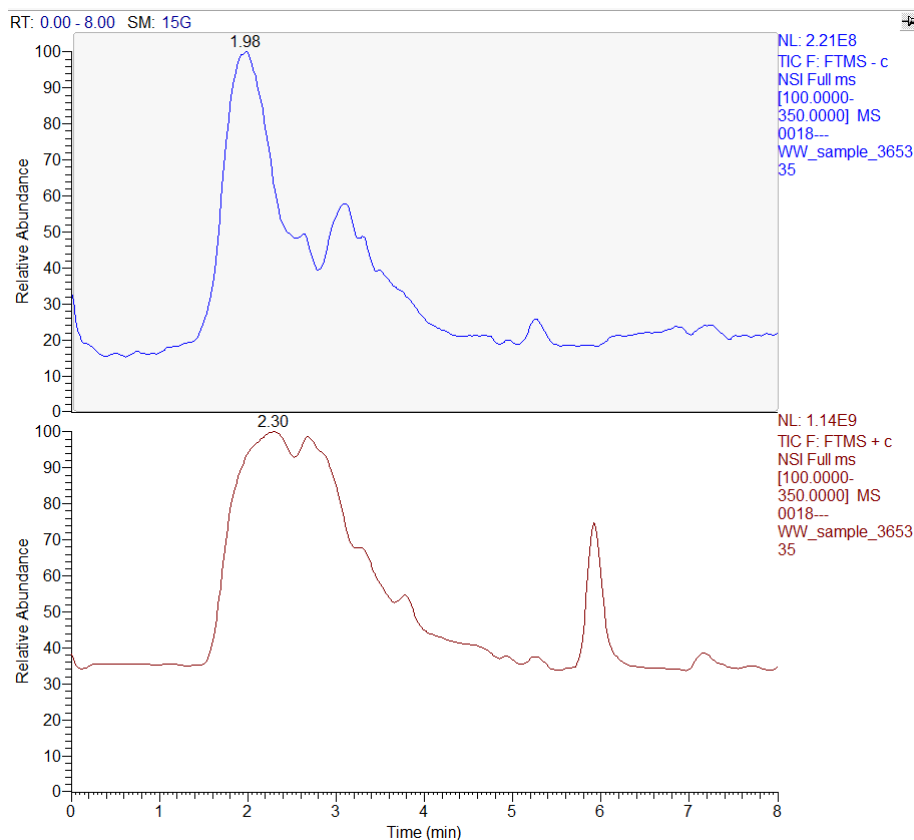
Analītu MS skenēšanas parametri

Savienojums	Molekulārā jona veids	Polaritāte	Molekulārais jons, m/z
Kofeīns	$[M+H]^+$	+	195,0876
Kotinīns	$[M+H]^+$	+	177,1022
Diklofenaks	$[M-H]^-$	-	294,0094
Etilsulfāts	$[M-H]^-$	-	124,9914
Gabapentīns	$[M+H]^+$	+	172,1332
5-HIAA	$[M+H]^+$	+	192,0655
Ibuprofēns	$[M-H]^-$	-	205,1234

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

#### 3.1. Jonu pāra reaģenta izmantošana polāro analītu analizē apgrieztās fāzes hromatogrāfijā

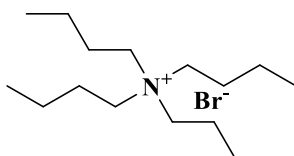
Ļoti polāri savienojumi kā etilsulfāts, 5-HIAA un dažādi joni nesorbējas uz analītisko kolonnu nepolārajām nekustīgajām fāzēm kā C18 un izdalās brīvajā tilpumā. 3.1.attēlā novērojams, kā palielinās kopējais jonu plūsmas skaits (TIC) brīvajā tilpumā polāro savienojumu un neorganisko jonu ietekmē. Lai uzlabotu polāru analītu izdalīšanas laiku, kas nepārklātos ar brīvajā tilpumā esošo jonu signāliem, izvēlējās izmantot jonu pāra reaģentu. Jona pāra reaģenta izmantošana kopā ar apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfiju palielina izdalīšanas laikus, hromatogrāfisko izšķiršanu un MS jutīgumu hidrofilu savienojumiem. To izmanto, piemēram, hidrofilu savienojumu kā oligonukleotīdu analizēs. Tika izvērtēti vairāki jonu pāra reaģenti balstoties uz to Log P vērtībām (skatīt tabulu 3.1.). Šajā darbā tika izmantots TBAB (**10**) reaģents, tā struktūrformula ir redzama 3.2. attēlā. Log P vērtība ir nejonizēta savienojuma lipofilitātes mērs, kur P ir tā sadalījuma koeficients oktanolā/ūdens sistēmā, un kas raksturo savienojuma tieksmi atrasties nepolārajā nekustīgajā fāzē. Tik izvērtēta arī TBAB koncentrācijas ietekme uz analītu izdalīšanas laiku un MS jutīgumu. <sup>11,19</sup>



3.1. att. TIC hromatogramma relatīvā daudzuma sadalījums laikā notekūdeņu paraugā

Jonu pāra reaģentu logP vērtības

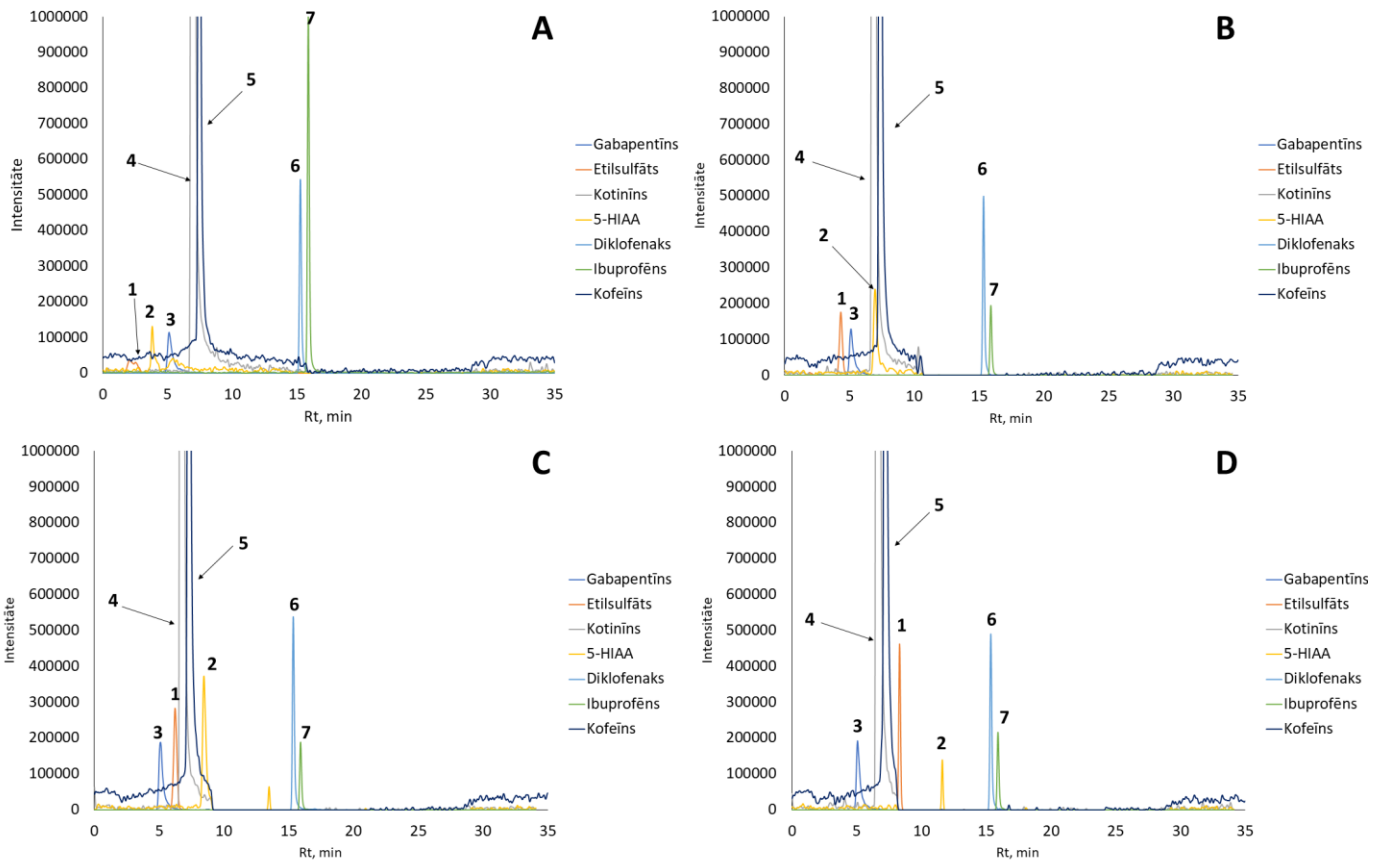
Jonu pāra reaģents	LogP vērtība
TBAB	2,01
Cetrimonija bromīds	8,9
Dietilamīns	4,162
Oktiltrimetilamonija bromīds	4,348
Tetraoktilamonija bromīds	8,44
Dodeciltrimetilamonija bromīds	6,624
Cetilpiridīnija hlorīds	3,47



10

## 3.2. att. TBAB struktūrformula

Jonu pāra reaģents satur gan lipofīlas daļas, kas ļauj tam sorbēties uz nekustīgās fāzes stacionārās daļas, gan hidrofilās daļas (pozitīvi lādēts terciālais amīns), kas saista polārus savienojumus un aiztur tos, būtībā padarot to par līdzīgu jonapmaiņas hromatogrāfijai. Pēc laika, gradientā pieaugot organikas saturam, pats jonu pāru reaģents arī desorbējās un tiek izskalots no kolonnas. Ir 3 veidi, kā mēdz pielietot jonu pāru veidošanos hromatogrāfiskajās sistēmās: (1) stacionārās fāzes modificēšana ar jonu pāri veidojošu modifikatoru; (2) jonu pāru reaģenta pievienošana kustīgajai fāzei un (3) jonu pāru reaģenta pievienošana injekcijai. Otrais un trešais gadījums ir līdzīgi ar to, ka jonu pāris veidojas kustīgajā fāzē un tad saistās ar kolonna nekustīgo fāzi. Tika izvēlēts izmantot trešo veidu, tādējādi samazinot no kolonnas izdalītā jonu pāru reaģenta ietekmi, kas nonāk masspektrometriskajā detektorā. 3.3. attēlā parādīts, kā izvēlētais jonu pāru reaģents uzlabo izvēlēto polāro savienojumu izdalīšanas laiku un MS jutību.


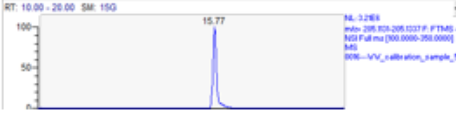



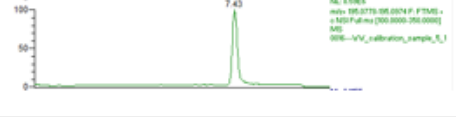
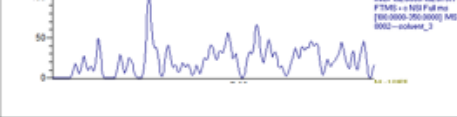


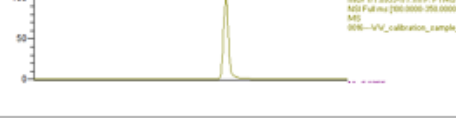

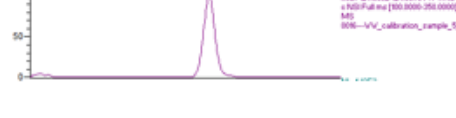
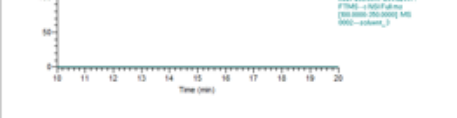
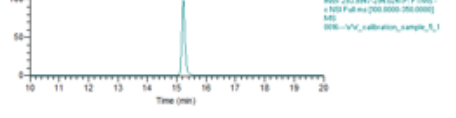


3.3. att. Jonu pāra reaģenta TBAB ietekme uz analītu izdalīšanas laiku un MS jutīgumu; (A) 0 mM TBAB; (B) 5 mM TBAB; (C) 10 mM TBAB; (D) 15 mM TBAB; 1 – etilsulfāts, 2 – 5-HIAA, 3 – gabapentīns, 4 – kotinīns, 5 – kofeīns, 6 – diklofenaks, 7 – ibuprofēns

Novērojams, ka palielinot TBAB koncentrāciju palielinās izdalīšanas laiks gan etilsulfātam, gan 5-HIAA, kā arī uzlabojas to noteikšanas jutība, kas attēlā redzams, kā signāla intensitātes palielināšanās. EtS aiztures laiks neizmantojot jonu pāra reaģentu – 2,07 min, normalizācijas līmenis (NL) –  $3,78E4$ ; izmantojot 5 mM TBAB – 4,33 min un NL –  $1,76E5$ ; izmantojot 10 mM TBAB – 6,22 min un NL –  $2,83E5$ ; izmantojot 15 mM TBAB – 8,32 min un NL –  $4,63E5$ . 5-HIAA aiztures laiks neizmantojot jonu pāra reaģentu – 3,82 min, NL –  $1,32E5$ ; izmantojot 5 mM TBAB – 6,96 min un NL –  $2,40E5$ ; izmantojot 10 mM TBAB – 8,45 min un NL –  $3,75E5$ ; izmantojot 15 mM TBAB – 11,62 min un NL –  $1,40E5$ . Tomēr TBAB pievienošana paraugam samazina ibuprofēna signāla intensitāti, kas skaidrojams ar to, ka jonu pāra reaģenta izdalīšanās no kolonnas pārklājas ar ibuprofēna izdalīšanas laiku un tā jutība MS tiek slāpēta reaģenta relatīvi lielās koncentrācijas dēļ. Kā optimālākais jonu pāra reaģents tika izvēlēts TBAB ar koncentrāciju 11 mM. Literatūrā ir aprakstīti vairāki piemēri jonu pāra reaģenta izmantošanai polāro savienojumu analīzē, piemēram, oligonukleotīdus un aminoskābes vai hormonus.<sup>11,59</sup>

### 3.2. Metodes validācija

**Selektivitāte.** Metodes selektivitāti pārbaudīja, pagatavojot paraugus ar un bez standartpiedevas. Ņemot vērā, ka biomarkieru klātbūtne ir konstatējama visos analizētos notekūdeņu paraugos, selektivitātes pārbaudei tika izmantots dejonizēts ūdens (skatīt attēlu 3.4).

Savienojums	Blank	Notekūdeņu paraugs + 10 µg/L
Ibuprofēns		
Gabapentīns		
Kofeīns		
5-HIAA		
Kotinīns		
Etilsulfāts		
Diklofenaks		

3.4. att. Biomarkieru hromatogrammas notekūdeņos tukšajā paraugā un paraugā ar piedevu 10 µg/L

**Kvantificēšanas robeža.** Metodes kvantificēšanas robežas (LOQ) noteikšanai izmantoja formulu 3.1, veicot kalibrēšanu uz parauga ar standartpiedevu metodi, ņemot vērā koncentrāciju paraugā un attiecību starp signālu un troksni (S/N), rezultāti apskatāmi 3.2. tabulā.<sup>60</sup>

$$LOQ = \frac{10 \cdot C}{S/N} \quad (3.1)$$

, kur C – savienojuma koncentrācija paraugā pēc standartpiedevas metodes;  
S/N – attiecība signāls pret troksni.

3.2. tabula

#### Metodes LOQ novērtēšana

Savienojums	Kalibrēšanas taisnes slīpuma koeficients	Kalibrēšanas taisnes brīvais loceklis	Koncentrācija uz parauga, µg/L	Signāls - troksnis (S/N)	LOQ, µg/L
Kofeīns	3,89E+06	7,87E+07	20,24	1203	0,17
Kotinīns	2,09E+07	2,20E+07	1,05	2056	0,005
Diklofenaks	1,39E+06	5,24E+05	0,38	109	0,03
Etilsulfāts	8,08E+05	5,67E+06	7,02	243	0,3
Gabapentīns	7,41E+05	2,63E+06	3,55	470	0,08
5-HIAA	1,06E+06	7,00E+06	6,62	581	0,11
Ibuprofēns	4,48E+05	1,10E+06	2,46	545	0,05

**Metodes precizitāte un ticamība.** Ticamības un precizitātes noteikšanai tika veikta divu dienu validācija. Tika izmantota standartpiedevu metode paraugam koncentrāciju diapazonā no 0,5 līdz 100 µg/L. Ticamības un precizitātes novērtēšanai tika analizēti seši paraugi divos koncentrāciju līmeņos 10 µg/L un 50 µg/L. Aprēķini veikti izmantojot programmu *Microsoft Excel*. Ticamības novērtēšanai pēc formulas 3.2 izmantoja atkārtotos mērījumus divos koncentrāciju līmeņos 10 µg/L un 50 µg/L, salīdzinot tos ar pievienoto standartpiedevu koncentrāciju.<sup>60</sup>

$$Ticamība = \frac{C_{sp, \text{ vidējā}}}{C_{sp}} \cdot 100 \% \quad (3.2)$$

, kur  $C_{sp, \text{ vidējā}}$  – vidējā koncentrācija no atkārtotiem mērījumiem paraugos ar standartpiedevu, µg/L;

$C_{sp}$  – pievienotā standartpiedevas koncentrācija, µg/L.

**Metodes nenoteiktība.** Mērījumu nenoteiktību aprēķina pēc formulas 3.3 kā metodes precizitātes komponente tika izmantots variācijas koeficients reproducējamības jeb starp dienu RSD (skatīti 3.3. tabulu).<sup>60</sup>

$$U_c = k \cdot RSD \quad (3.3)$$

- , kur  $U_c$  – metodes paplašinātā nenoteiktība pie 95 % ticamības intervāla, %;  
 $k$  – pārklāšanās koeficients, 2;  
RSD – iekšlaboratorijas reproducējamība, %.

3.3. tabula

**Mērījumu ticamība, reproducējamība un nenoteiktība pie koncentrācijām 10 µg/L un 50 µg/L**

Savienojums	Ticamība 1. dienā, % pie 10 µg/L (n = 6)	Ticamība 2. dienā, % pie 10 µg/L (n = 6)	Starp dienu ticamība, % pie 10 µg/L (n = 6)	RSD 1. dienā, % pie 10 µg/L (n = 6)	RSD 2. dienā, % pie 10 µg/L (n = 6)	Starp dienu RSD, % pie 10 µg/L (n = 6)	$U_c$ , % pie 10 µg/L (2xRSD)
Kofeīns	102	106	104	4,1	6,8	5,6	11
Kotinīns	105	99	102	4,3	4,6	5,4	11
Diklofenaks	96	98	97	5,6	5,1	5,3	11
Etilsulfāts	95	99	97	7,9	4,6	6,4	13
Gabapentīns	97	100	99	6,2	4,7	5,5	11
5-HIAA	91	107	99	9,8	6,8	12	23
Ibuprofēns	97	107	102	5,5	3,8	7,0	14
Savienojums	Ticamība 1. dienā, % pie 50 µg/L (n = 6)	Ticamība 2. dienā, % pie 50 µg/L (n = 6)	Starp dienu ticamība, % pie 50 µg/L (n = 6)	RSD 1. dienā, % pie 50 µg/L (n = 6)	RSD 2. dienā, % pie 50 µg/L (n = 6)	Starp dienu RSD, % pie 50 µg/L (n = 6)	$U_c$ , % pie 50 µg/L (2xRSD)
Kofeīns	95	106	101	3,7	7,9	8,0	16
Kotinīns	97	91	94	5,5	6,0	6,3	13
Diklofenaks	94	99	96	4,9	5,6	5,7	11
Etilsulfāts	91	98	95	8,5	6,8	8,2	16
Gabapentīns	95	98	96	5,8	5,1	5,5	11
5-HIAA	86	103	95	9,3	7,4	12	25
Ibuprofēns	94	101	98	4,7	5,9	6,5	13

**Matricas efektu novērtēšana.** Matricas efektu novērtēšanai salīdzināja taisnes slīpuma koeficientu, veicot ārējo kalibrēšanu un kalibrēšanu ar standartpiedevu koncentrāciju diapazonā 0,5 – 50 µg/L. Matricas efektu aprēķināja pēc formulas 3.4.<sup>60</sup> Iegūtie dati apkopoti 3.4. tabulā un matricas efektu grafiskā attēlojuma piemērs parādīts 3.5. attēlā.

$$ME = \frac{a_{addition}}{a_{standard}} \cdot 100\% \quad (3.4)$$

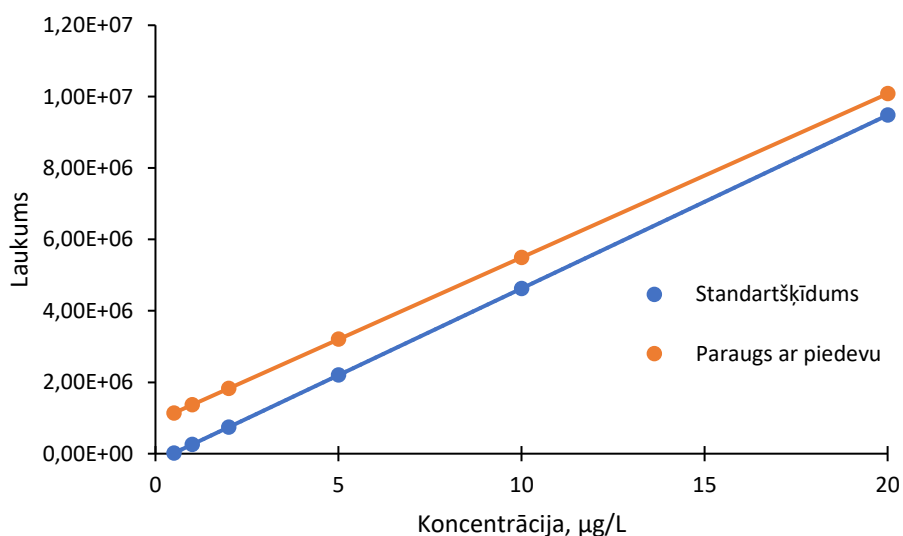
, kur  $a_{\text{addition}}$  – kalibrēšanas taisnes slīpuma koeficients kalibrēšanai ar standartpiedevu;

$a_{\text{standard}}$  – kalibrēšanas taisnes slīpuma koeficients ārējai kalibrēšanai.

3.4. tabula

**Matricas efektu noteikšana**

Savienojums	Taisnes slīpuma koeficients ar standartpiedevu	Taisnes slīpuma koeficients ārējai kalibrēšanai	ME, %
Kofeīns	3529000	5049000	70
Kotinīns	21490000	20670000	104
Diklofenaks	1449000	1306000	111
Etilsulfāts	764100	893100	86
Gabapentīns	457900	458700	100
5-HIAA	1239000	1500000	83
Ibuprofēns	1768000	1774000	100

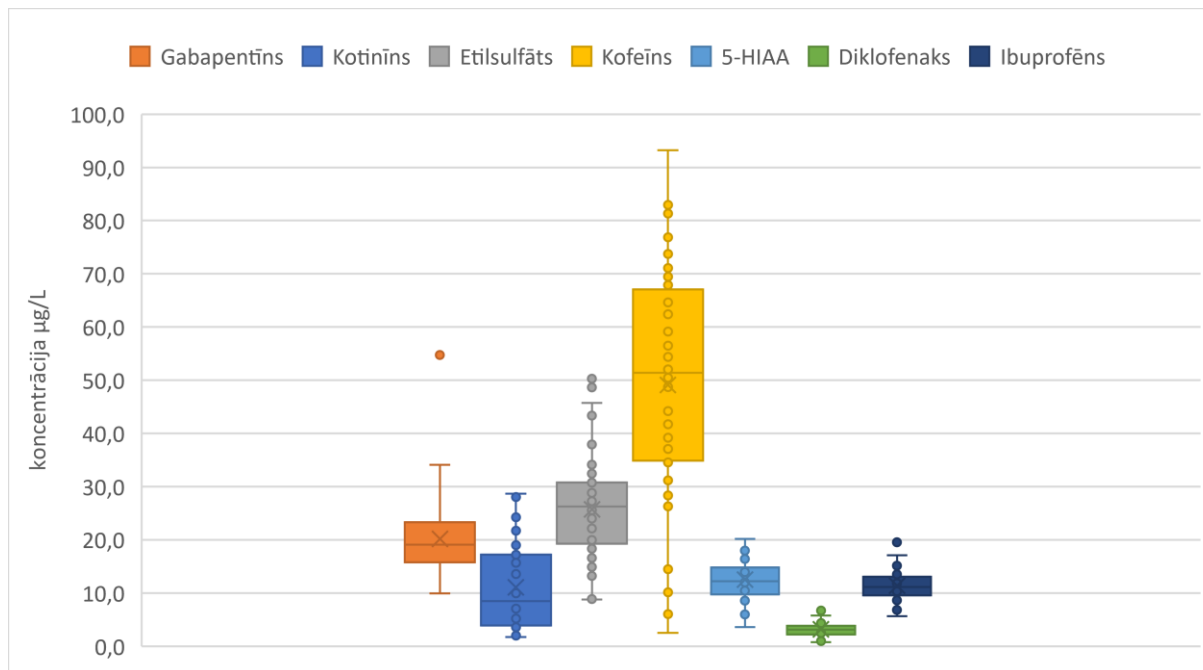


3.5. att. Matricas efektu grafisks attēlojums, izmantojot taisnes slīpumu standartšķīdumā un paraugā ar standartpiedevu gabapentīnam

### 3.3. Biomarkķieru analīzes rezultāti

Analīzei tika saņemti 52 paraugi no 13 dažādām notekūdeņu attīrīšana iekārtām 11 Latvijas pilsētās (Daugavpils, Jelgava, Jēkabpils, Jūrmala, Liepāja, Rēzekne, Rīga, Salaspils, Tukums, Valmiera un Ventspils), laika periodā no 31.03.2022 līdz 12.04.2022. Visi nosakāmie analīti tika detektēti visos analizētajos paraugos. Visaugstākās koncentrācijas tika konstatētas kofeīnam (93,2 µg/L), gabapentīnam (54,8 µg/L), un etilsulfātam (50,3 µg/L) (skatīt 3.6. attēlu). Augstās gabapentīna koncentrācijas var būt saistītas ar tā lietošanu rekreācijas

nolūkiem. Kofeīna un etilsulfāta augstās koncentrācijas ir saistītas ar sabiedrības ieradumiem un kulturālajiem aspektiem. Kofeīnam, etilsulfātam un kotinīnam ir novērots ļoti liels koncentrāciju diapazons, kas varētu būt saistīts ar vielu un to saturošu produktu lietošanas iezīmēm.



3.6. att. Analizēto biomarkieru kastītes un to koncentrācijas, atsevišķie punkti norāda novirzes no tendences

Salīdzinot iegūtos rezultātus ar līdzīgam publikācijām Latvijā un Baltijas reģionā ir iespējams izvērtēt sakritību un noteikto koncentrāciju izkliedi (skatīti 3.5. tabulu) un sekot līdzi populācijas zāļu lietošanas un dzīvesveida paradumu izmaiņām laikā.

3.5. tabula

**Populācijas biomarkieru vidējās, maksimālās koncentrācijas Latvijā un Baltijas reģionā un izmantotās metodes LOQ un ME.**

Savienojums	Mediānā vērtība, µg/L	Koncentrāciju diapazons, µg/L	LOQ, µg/L	ME, %	Atsauce
Kofeīns	51,4	2,5 – 93,2	0,17	70	Šis darbs
	63,5	23,8 – 156,3	5	-	10
	-	7,0 – 12,0	0,0001	125	61
	2,0	0,2 – 43,9	0,5	-	62
Kotinīns	8,5	1,7 – 28,7	0,005	104	Šis darbs
	4,9	2,4 – 10,1	0,0001	-	10
Diklofenaks	3,1	0,7 – 6,7	0,03	111	Šis darbs
	1,7	0,6 – 2,7	0,005	-	10
	-	0,004 – 0,012	0,0001	51	61
	0,3	0,03 – 3,2	0,05	-	62

Savienojums	Mediānā vērtība, µg/L	Koncentrāciju diapazons, µg/L	LOQ, µg/L	ME, %	Atsauce
Etilsulfāts	26,3	8,8 – 50,3	0,3	86	Šis darbs
	22,5	13,1 – 43,6	1	-	10
Gabapentīns	19,1	9,9 – 54,8	0,08	100	Šis darbs
	16,5	7,3 – 50,2	1	-	10
5-HIAA	12,2	3,6 – 20,2	0,11	83	Šis darbs
	12,4	4,9 – 17,7	1	-	10
Ibuprofēns	11,1	5,7 – 19,5	0,05	100	Šis darbs
	12,6	7,3 – 25,4	0,005	-	10
	-	0,1 – 0,3	0,0005	56	61
	0,6	0,1 – 28,5	1	-	62

Jāatzīst, ka analizēto paraugu skaits ir samērā mazs un to izkliede laikā nav pietiekama, lai korekti spriestu par tendencēm Latvijas populācijā. Tomēr ir redzams, ka izstrādātā metode dod salīdzināmus rezultātus, kas iespējo tās pielietošanu notekūdeņu monitoringa pētījumos, kur ilgākā laika periodā varētu gūt ieskatu par Latvijas populācijas dzīvesveida paradumiem un farmaceitisko vielu lietošanas tendencēm.

## SECINĀJUMI

1. Tika veikta literatūras izpēte par populācijas biomarķieru un farmaceitisko līdzekļu noteikšanu notekūdeņos un eksperimentiem izvēlēti 7 savienojumi (kofeīns, kotinīns, diklofenaks, etilsulfāts, gabapentīns, 5-HIAA un ibuprofēns).
2. Tika veikta nano-plūsmas šķidrums hromatogrāfijas – Orbitrap masspektrometrijas metodes validācija biomarķieru un farmaceitisko līdzekļu noteikšanai notekūdeņos. Veicot paraugu sagatavošanu bez papildu attīrīšanas pēc *dilute-and-shoot* pieejas un izmantojot atšķaidīšanas faktoru 5 tika panākta jutība no 0,005 līdz 0,3 µg/L un ir raksturīgi nelieli matricas efekti robežās no 70 % līdz 111 %.
3. TBAB izmantošana par jonu pāra reaģentu injekcijas sastāvā uzlaboja polāru savienojumu sorbciju kolonnā.
4. Tika veikta izvēlēto farmaceitisko savienojumu un populācijas biomarķieru noteikšana notekūdeņos no Latvijas pilsētu (Daugavpils, Jelgava, Jēkabpils, Jūrmala, Liepāja, Rēzekne, Rīga, Salaspils, Tukums, Valmiera un Ventspils) notekūdeņu attīrīšanas iekārtām. Atrasto savienojumu koncentrācijas ir sekojošas: gabapentīns no 9,9 līdz 54,8 µg/L, kotinīns no 1,7 līdz 28,7 µg/L, etilsulfāts no 8,8 līdz 50,3 µg/L, kofeīns no 2,5 līdz 93,2 µg/L, 5-HIAA no 3,6 līdz 20,2 µg/L, diklofenaks no 0,7 līdz 6,7 µg/L un ibuprofēns no 5,7 līdz 19,5 µg/L.
5. Sagatavota bāze turpmākai pētījuma programmas īstenošanai.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) Boogaerts, T.; Jurgelaitiene, L.; Dumitrascu, C.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kannan, A.; Been, F.; Emke, E.; de Voogt, P.; Covaci, A.; van Nuijs, A. L. N. Application of Wastewater-Based Epidemiology to Investigate Stimulant Drug, Alcohol and Tobacco Use in Lithuanian Communities. *Sci. Total Environ.* **2021**, *777*, 145914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145914>.
- (2) Salgueiro-González, N.; Rousis, N. I.; Gracia-Lor, E.; Borsotti, A.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. First Comprehensive Study of Alcohol Consumption in Italy Using Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *776*, 145863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145863>.
- (3) Gao, J.; Zheng, Q.; Lai, F. Y.; Gartner, C.; Du, P.; Ren, Y.; Li, X.; Wang, D.; Mueller, J. F.; Thai, P. K. Using Wastewater-Based Epidemiology to Estimate Consumption of Alcohol and Nicotine in Major Cities of China in 2014 and 2016. *Environ. Int.* **2020**, *136*, 105492. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105492>.
- (4) Aguiar-Oliveira, M. de L.; Campos, A.; R. Matos, A.; Rigotto, C.; Sotero-Martins, A.; Teixeira, P. F. P.; Siqueira, M. M. Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance—A Brief Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17* (24), 9251. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>.
- (5) Wang, Y.; Liu, P.; Zhang, H.; Ibaraki, M.; VanTassell, J.; Geith, K.; Cavallo, M.; Kann, R.; Saber, L.; Kraft, C. S.; Lane, M.; Shartar, S.; Moe, C. Early Warning of a COVID-19 Surge on a University Campus Based on Wastewater Surveillance for SARS-CoV-2 at Residence Halls. *Sci. Total Environ.* **2022**, *821*, 153291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153291>.
- (6) Vo, V.; Tillett, R. L.; Papp, K.; Shen, S.; Gu, R.; Gorzalski, A.; Siao, D.; Markland, R.; Chang, C.-L.; Baker, H.; Chen, J.; Schiller, M.; Betancourt, W. Q.; Buttery, E.; Pandori, M.; Picker, M. A.; Gerrity, D.; Oh, E. C. Use of Wastewater Surveillance for Early Detection of Alpha and Epsilon SARS-CoV-2 Variants of Concern and Estimation of Overall COVID-19 Infection Burden. *Sci. Total Environ.* **2022**, *835*, 155410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155410>.
- (7) Batucan, N. S. P.; Tremblay, L. A.; Northcott, G. L.; Matthaei, C. D. Medicating the Environment? A Critical Review on the Risks of Carbamazepine, Diclofenac and Ibuprofen to Aquatic Organisms. *Environ. Adv.* **2022**, *7*, 100164. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100164>.
- (8) Hou, C.; Chu, T.; Chen, M.; Hua, Z.; Xu, P.; Xu, H.; Wang, Y.; Liao, J.; Di, B. Application of Multi-Parameter Population Model Based on Endogenous Population Biomarkers and Flow Volume in Wastewater Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *759*, 143480. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143480>.
- (9) Shamsudin, M. S.; Azha, S. F.; Ismail, S. A Review of Diclofenac Occurrences, Toxicology, and Potential Adsorption of Clay-Based Materials with Surfactant Modifier. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10* (3), 107541. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107541>.
- (10) Pugajeva, I.; Ikkere, L. E.; Jansons, M.; Perkons, I.; Sukajeva, V.; Bartkevics, V. Two-Dimensional Liquid Chromatography - Mass Spectrometry as an Effective Tool for Assessing a Wide Range of Pharmaceuticals and Biomarkers in Wastewater-Based

Epidemiology Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *205*, 114295. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114295>.

- (11) Donegan, M.; Nguyen, J. M.; Gilar, M. Effect of Ion-Pairing Reagent Hydrophobicity on Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Analysis of Oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1666*, 462860. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462860>.
- (12) Alcántara-Durán, J.; Moreno-González, D.; Gilbert-López, B.; Molina-Díaz, A.; García-Reyes, J. F. Matrix-Effect Free Multi-Residue Analysis of Veterinary Drugs in Food Samples of Animal Origin by Nanoflow Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *245*, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.083>.
- (13) Moreno-González, D.; Alcántara-Durán, J.; Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A. Matrix-Effect Free Quantitative Liquid Chromatography Mass Spectrometry Analysis in Complex Matrices Using Nanoflow Liquid Chromatography with Integrated Emitter Tip and High Dilution Factors. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1519*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.006>.
- (14) Moreno-González, D.; Pérez-Ortega, P.; Gilbert-López, B.; Molina-Díaz, A.; García-Reyes, J. F.; Fernández-Alba, A. R. Evaluation of Nanoflow Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis in Food. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1512*, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.019>.
- (15) Fedorenko, D.; Bartkevics, V. Recent Applications of Nano-Liquid Chromatography in Food Safety and Environmental Monitoring: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2021**, 1–25. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1938968>.
- (16) Vasconcelos Soares Maciel, E.; de Toffoli, A. L.; Sobieski, E.; Domingues Nazário, C. E.; Lanças, F. M. Miniaturized Liquid Chromatography Focusing on Analytical Columns and Mass Spectrometry: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1103*, 11–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.064>.
- (17) Belarbi, S.; Vivier, M.; Zaghouni, W.; Sloovere, A. D.; Agasse-Peulon, V.; Cardinael, P. Comparison of New Approach of GC-HRMS (Q-Orbitrap) to GC-MS/MS (Triple-Quadrupole) in Analyzing the Pesticide Residues and Contaminants in Complex Food Matrices. *Food Chem.* **2021**, *359*, 129932. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129932>.
- (18) Saito-Shida, S.; Hamasaka, T.; Nemoto, S.; Akiyama, H. Multiresidue Determination of Pesticides in Tea by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry: Comparison between Orbitrap and Time-of-Flight Mass Analyzers. *Food Chem.* **2018**, *256*, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.123>.
- (19) Choi, P. M.; Tschärke, B. J.; Donner, E.; O'Brien, J. W.; Grant, S. C.; Kaserzon, S. L.; Mackie, R.; O'Malley, E.; Crosbie, N. D.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F. Wastewater-Based Epidemiology Biomarkers: Past, Present and Future. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *105*, 453–469. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>.
- (20) Thai, P. K.; O'Brien, J. W.; Banks, A. P. W.; Jiang, G.; Gao, J.; Choi, P. M.; Yuan, Z.; Mueller, J. F. Evaluating the In-Sewer Stability of Three Potential Population Biomarkers for Application in Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2019**, *671*, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.231>.
- (21) Rico, M.; Andrés-Costa, M. J.; Picó, Y. Estimating Population Size in Wastewater-Based Epidemiology. Valencia Metropolitan Area as a Case Study. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *323*, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.079>.

- (22) Chen, C.; Kostakis, C.; Gerber, J. P.; Tschärke, B. J.; Irvine, R. J.; White, J. M. Towards Finding a Population Biomarker for Wastewater Epidemiology Studies. *Sci. Total Environ.* **2014**, *487*, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.075>.
- (23) Senta, I.; Gracia-Lor, E.; Borsotti, A.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. Wastewater Analysis to Monitor Use of Caffeine and Nicotine and Evaluation of Their Metabolites as Biomarkers for Population Size Assessment. *Water Res.* **2015**, *74*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.002>.
- (24) *Water Use Statistics - Worldometer*. <https://www.worldometers.info/water/> (accessed 2022-05-28).
- (25) World Health Organization. *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*; World Health Organization: Geneva, 2018.
- (26) Helander, A.; Beck, O. Chapter 17 Analytical Markers of Acute and Chronic Alcohol Consumption. In *Handbook of Analytical Separations*; Elsevier, 2008; Vol. 6, pp 567–588. [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(06\)06017-7](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(06)06017-7).
- (27) Joy, T.; Walsh, G.; Tokmakejian, S.; Van Uum, S. H. Increase of Urinary 5-Hydroxyindoleacetic Acid Excretion but Not Serum Chromogranin a Following Over-The-Counter 5-Hydroxytryptophan Intake. *Can. J. Gastroenterol.* **2008**, *22* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1155/2008/472159>.
- (28) Reid, M. J.; Langford, K. H.; Mørland, J.; Thomas, K. V. Analysis and Interpretation of Specific Ethanol Metabolites, Ethyl Sulfate, and Ethyl Glucuronide in Sewage Effluent for the Quantitative Measurement of Regional Alcohol Consumption: ETHANOL BIOMARKERS IN SEWAGE. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2011**, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01505.x>.
- (29) Gmel, G.; Rehm, J. The Empirical Testability of Skog's Theory of Collective Drinking Behaviour. *Drug Alcohol Rev.* **2000**, *19* (4), 391–399. <https://doi.org/10.1080/713659432>.
- (30) Stahre, M.; Naimi, T.; Brewer, R.; Holt, J. Measuring Average Alcohol Consumption: The Impact of Including Binge Drinks in Quantity-Frequency Calculations. *Addiction* **2006**, *101* (12), 1711–1718. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01615.x>.
- (31) Helander, A.; Beck, O. Mass Spectrometric Identification of Ethyl Sulfate as an Ethanol Metabolite in Humans. *Clin. Chem.* **2004**, *50* (5), 936–937. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031252>.
- (32) Liu, Y.; Zhang, X.; Li, J.; Huang, Z.; Lin, Z.; Wang, J.; Zhang, C.; Rao, Y. Stability of Ethyl Glucuronide, Ethyl Sulfate, Phosphatidylethanol and Fatty Acid Ethyl Esters in Postmortem Human Blood. *J. Anal. Toxicol.* **2018**, *42* (5), 346–352. <https://doi.org/10.1093/jat/bky010>.
- (33) Wurst, F. M.; Dresen, S.; Allen, J. P.; Wiesbeck, G.; Graf, M.; Weinmann, W. Ethyl Sulphate: A Direct Ethanol Metabolite Reflecting Recent Alcohol Consumption. *Addiction* **2006**, *101* (2), 204–211. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2005.01245.x>.
- (34) *Aktīvās vielas – Latvijas Zāļu reģistrs*. <https://dati.zva.gov.lv/zalu-registrs/substances/D> (accessed 2022-05-29).
- (35) *Diclofenac (Systemic) Monograph for Professionals*. Drugs.com. <https://www.drugs.com/monograph/diclofenac-systemic.html> (accessed 2022-05-22).
- (36) Vieno, N.; Sillanpää, M. Fate of Diclofenac in Municipal Wastewater Treatment Plant — A Review. *Environ. Int.* **2014**, *69*, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021>.

- (37) Bielfeldt, S.; Urquhart, D.; Brandt, M.; Hennighausen, N.; Bazzanella, R. Reduction of Residual Topical Diclofenac in Waste Water by a Wiping Procedure before Hand Washing. *Chemosphere* **2022**, *292*, 133350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133350>.
- (38) Tang, W. The Metabolism of Diclofenac - Enzymology and Toxicology Perspectives. *Curr. Drug Metab.* **2003**, *4* (4), 319–329. <https://doi.org/10.2174/1389200033489398>.
- (39) Zhao, D.; Nunes, A. P.; Baek, J.; Lapane, K. L. An Algorithm to Identify Gabapentin Misuse and/or Abuse in Administrative Claims Data. *Drug Alcohol Depend.* **2022**, *235*, 109429. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2022.109429>.
- (40) Reader, R.; Olaitan, O.; McCobb, E. Evaluation of Prescribing Practices for Gabapentin as an Analgesic among Veterinary Professionals. *Vet. Anaesth. Analg.* **2021**, *48* (5), 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2021.06.007>.
- (41) Vollmer, K. O.; von Hodenberg, A.; Kölle, E. U. Pharmacokinetics and Metabolism of Gabapentin in Rat, Dog and Man. *Arzneimittelforschung.* **1986**, *36* (5), 830–839.
- (42) Chopra, S.; Kumar, D. Ibuprofen as an Emerging Organic Contaminant in Environment, Distribution and Remediation. *Heliyon* **2020**, *6* (6), e04087. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04087>.
- (43) Ding, T.; Yang, M.; Zhang, J.; Yang, B.; Lin, K.; Li, J.; Gan, J. Toxicity, Degradation and Metabolic Fate of Ibuprofen on Freshwater Diatom *Navicula* Sp. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *330*, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.004>.
- (44) Sanoh, S.; Horiguchi, A.; Sugihara, K.; Kotake, Y.; Tayama, Y.; Uramaru, N.; Ohshita, H.; Tateno, C.; Horie, T.; Kitamura, S.; Ohta, S. Predictability of Metabolism of Ibuprofen and Naproxen Using Chimeric Mice with Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40* (12), 2267–2272. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.047555>.
- (45) Frary, C. D.; Johnson, R. K.; Wang, M. Q. Food Sources and Intakes of Caffeine in the Diets of Persons in the United States. *J. Am. Diet. Assoc.* **2005**, *105* (1), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.10.027>.
- (46) Durrant, K. L. Known and Hidden Sources of Caffeine in Drug, Food, and Natural Products. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1996**, *42* (4), 625–637. <https://doi.org/10.1331/108658002763029607>.
- (47) Mahoney, C. R.; Giles, G. E.; Marriott, B. P.; Judelson, D. A.; Glickman, E. L.; Geiselman, P. J.; Lieberman, H. R. Intake of Caffeine from All Sources and Reasons for Use by College Students. *Clin. Nutr.* **2019**, *38* (2), 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.004>.
- (48) Yong, L.; Song, Y.; Xiao, X.; Sui, H.; Xu, H.; Tan, R.; Yang, X.; Song, J.; Li, J.; Wei, S. Quantitative Probabilistic Assessment of Caffeine Intake from Tea in Chinese Adult Consumers Based on Nationwide Caffeine Content Determination and Tea Consumption Survey. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, 113102. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113102>.
- (49) Vanderlee, L.; Reid, J. L.; White, C. M.; Acton, R. B.; Kirkpatrick, S. I.; Pao, C.-I.; Rybak, M. E.; Hammond, D. Evaluation of a 24-Hour Caffeine Intake Assessment Compared with Urinary Biomarkers of Caffeine Intake among Young Adults in Canada. *J. Acad. Nutr. Diet.* **2018**, *118* (12), 2245–2253.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.07.016>.
- (50) Wikoff, D.; Welsh, B. T.; Henderson, R.; Brorby, G. P.; Britt, J.; Myers, E.; Goldberger, J.; Lieberman, H. R.; O'Brien, C.; Peck, J.; Tenenbein, M.; Weaver, C.; Harvey, S.; Urban, J.; Doepker, C. Systematic Review of the Potential Adverse Effects of Caffeine

Consumption in Healthy Adults, Pregnant Women, Adolescents, and Children. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 585–648. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.002>.

- (51) Rodríguez-Álvarez, T.; Rodil, R.; Rico, M.; Cela, R.; Quintana, J. B. Assessment of Local Tobacco Consumption by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Sewage Analysis of Nicotine and Its Metabolites, Cotinine and Trans-3'-Hydroxycotinine, after Enzymatic Deconjugation. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (20), 10274–10281. <https://doi.org/10.1021/ac503330c>.
- (52) Šesták, J.; Moravcová, D.; Kahle, V. Instrument Platforms for Nano Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1421*, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.090>.
- (53) Cutillas, P. Principles of Nanoflow Liquid Chromatography and Applications to Proteomics. *Curr. Nanosci.* **2005**, *1* (1), 65–71. <https://doi.org/10.2174/1573413052953093>.
- (54) Szumski, M.; Buszewski, B. State of the Art in Miniaturized Separation Techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32* (1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/10408340290765434>.
- (55) Wilson, S. R.; Vehus, T.; Berg, H. S.; Lundanes, E. Nano-LC in Proteomics: Recent Advances and Approaches. *Bioanalysis* **2015**, *7* (14), 1799–1815. <https://doi.org/10.4155/bio.15.92>.
- (56) Fanali, C.; Dugo, L.; Dugo, P.; Mondello, L. Capillary-Liquid Chromatography (CLC) and Nano-LC in Food Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.021>.
- (57) Sneekes, E.-J.; Rieux, L.; Swart, R. Nano LC: Principles, Evolution, and State-of-the-Art of the Technique. *LCGC N. Am.* **2011**, *29* (10), 926–934.
- (58) Choi, Y.; Kim, K.; Kim, D.; Moon, H.; Jeon, J. Ny-Ålesund-Oriented Organic Pollutants in Sewage Effluent and Receiving Seawater in the Arctic Region of Kongsfjorden. *Environ. Pollut.* **2020**, *258*, 113792. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113792>.
- (59) Knox, J. H.; Hartwick, R. A. Mechanism of Ion-Pair Liquid Chromatography of Amines, Neutrals, Zwitterions and Acids Using Anionic Heteroions. *J. Chromatogr. A* **1981**, *204*, 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81633-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81633-7).
- (60) Hasegawa, K.; Minakata, K.; Suzuki, M.; Suzuki, O. The Standard Addition Method and Its Validation in Forensic Toxicology. *Forensic Toxicol.* **2021**, *39* (2), 311–333. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00585-8>.
- (61) Pugajeva, I.; Rusko, J.; Perkons, I.; Lundanes, E.; Bartkevics, V. Determination of Pharmaceutical Residues in Wastewater Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *133*, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.008>.
- (62) Perkons, I.; Rusko, J.; Zacs, D.; Bartkevics, V. Rapid Determination of Pharmaceuticals in Wastewater by Direct Infusion HRMS Using Target and Suspect Screening Analysis. *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 142688. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142688>.

Bakalaura darbs „**Populācijas biomarķieru noteikšana notekūdeņos ar nano-plūsmas šķidrums hromatogrāfiju- masspektrometriju**” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāji prof., *Dr. chem.* Vadims Bartkevičs: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

*Mg. chem.* Deniss Fedorenko: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzente, *Dr. chem.* Iveta Pugajeva: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: \_\_\_\_\_ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: \_\_\_\_\_ Ilze Gaile  
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

\_\_\_\_\_ protokols Nr. \_\_\_\_\_ (ieraksta sekretārs)  
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)