APLICACIÓN DE LA SPE EN LÍNEA EN EL ANÁLISIS ENANTIOSELECTIVO DE CONTAMINANTES EMERGENTES QUIRALES EN AGUAS RESIDUALES

Marina Arenas, Carmen Mejías, Julia Martín, Juan Luis Santos, Irene Aparicio, Esteban Alonso

Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, 41011, Sevilla, España
anquimed@us.es, X (twitter): @anquimed, IG (Instagram): @anquimed
https://grupo.us.es/anquimed/

Abstract

Este trabajo examina el uso de la extracción en fase sólida en línea (SPE en línea) como una técnica automatizada e innovadora para el análisis enantioselectivo de contaminantes emergentes quirales. Para ello, se destacan dos estudios de caso: el primero enfocado en el análisis de antibióticos fluoroquinolonas quirales en aguas residuales y superficiales y, el segundo, en la determinación de fármacos antidepresivos y β-bloqueantes quirales en aguas residuales, ambos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS). Los resultados demuestran que la SPE en línea ofrece alta eficiencia en la preconcentración de analitos, simplificando y automatizando el tratamiento de muestras. Comparada con métodos convencionales, mantiene una excelente enantioresolución, sensibilidad y reproducibilidad. Además, su simplicidad y compatibilidad con técnicas cromatográficas acopladas a sistemas de detección avanzados confirman su potencial como una alternativa automática y eficaz para el análisis enantioselectivo medioambiental.

1. Introducción

Los contaminantes emergentes son sustancias químicas que no estaban reguladas anteriormente ni se monitoreaban de forma rutinaria en el medioambiente, pero que hoy se reconocen como una posible amenaza creciente para el medioambiente y la salud humana. Entre ellos podemos encontrar fármacos, productos de cuidado personal, microplásticos o compuestos perfluorados, entre otros.

Tras su uso, estas sustancias pueden llegar a las estaciones depuradoras de aguas residuales a través del sistema del alcantarillado. Los tratamientos actuales empleados en la depuración de aguas no se centran en este tipo de contaminantes, lo que se traduce habitualmente en una degradación incompleta. Posteriormente, las aguas efluentes se vierten a las aguas superficiales, contaminando así el medioambiente. Por ello es esencial la monitorización de contaminantes emergentes en las aguas residuales, al ser éstas unas de las principales fuentes de contaminación ambiental. Además, la epidemiología basada en aguas residuales es una herramienta poderosa y emergente en salud pública que consiste en analizar las aguas residuales para detectar la presencia de sustancias químicas, patógenos o marcadores genéticos que reflejan el estado de salud de una población.

Los compuestos quirales son moléculas especulares con al menos un centro quiral, asimétrico o estereogénico que está unido a diferentes átomos o grupos. Una sustancia química quiral consiste en al menos un par de enantiómeros o isómeros ópticos que giran el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, pero que presentan las mismas propiedades físicas y químicas. Muchos contaminantes orgánicos ambientales (fármacos, pesticidas, retardantes de llama bromados, bifenilos policlorados, etc.) son compuestos quirales producidos en su forma racémica [1]. La quiralidad tiene un impacto en el medioambiente porque, aunque los procesos ambientales, físicos y químicos afectan a ambos enantiómeros de la misma manera, pueden interactuar de forma diferente con otras moléculas quirales (proteínas, enzimas o receptores), lo que a su vez puede dar lugar a diferentes comportamientos biológicos y toxicológicos [2]. Por lo tanto, sus diferencias en la biodegradación, transformación o acumulación en el medioambiente deben considerarse para evaluar de manera correcta los riesgos para la salud, ya que cada enantiómero puede afectar a los organismos vivos de forma diferente. Por ello, su determinación enantioselectiva es un requisito fundamental.

Las técnicas de extracción empleadas previamente para el análisis de contaminantes quirales de muestras medioambientales han sido la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción empleando disolventes supramoleculares, la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida magnética [3].

La mayoría de los métodos analíticos descritos para la determinación de contaminantes quirales en muestras medioambientales se basan en la cromatografía de líquidos [4] y en la cromatografía de gases [5], comúnmente acopladas a espectrometría de masas debido a la alta selectividad y sensibilidad que proporciona [6]. Otras técnicas analíticas empleadas son la cromatografía de fluidos supercríticos, la electroforesis capilar y la cromatografía multidimensional [3].

Un aspecto clave en la determinación individualizada de los enantiómeros es su correcta separación, la cual se lleva a cabo utilizando un selector quiral. El selector puede añadirse a la fase móvil cromatográfica o al electrolito de fondo en electroforesis capilar, o encontrarse recubriendo, o inmovilizado, en la superficie de un soporte sólido (fases estacionarias quirales) en los llamados métodos directos [3]. También se pueden emplear métodos indirectos que utilizan agentes de derivatización enantioméricamente puros [6]. Los selectores quirales inmovilizados descritos incluyen ciclodextrinas y sus derivados, derivados de polisacáridos, proteínas, antibióticos, ligandos quirales, alcaloides de quina y derivados de aminoácidos, así como polímeros de impresión molecular [7].

En los últimos años han aparecido nuevas alternativas en el tratamiento de muestra, como la extracción en fase sólida en línea con la cromatografía de líquidos (online SPE-LC), pero hasta la fecha ha sido escasamente empleada en análisis enantioméricos.

2. Fundamentos de la extracción en fase sólida en línea con cromatografía de líquidos

La SPE en línea es una técnica que combina el proceso de tratamiento de muestras líquidas con su separación y análisis, generalmente mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, permitiendo aislar y preconcentrar los analitos de matrices complejas como son las aguas residuales. Algunos autores ya han señalado la idoneidad y los beneficios de su uso con contaminantes emergentes en aguas residuales [8-11].

En esta técnica, los cartuchos de SPE se disponen antes de la columna cromatográfica, programando todo el proceso de extracción como parte del método cromatográfico. La muestra se carga en los cartuchos, donde los analitos son retenidos, mientras que compuestos de la matriz que podrían generar interferencias son eliminados. Los compuestos retenidos son eluidos hasta la columna analítica para su separación y posterior detección. Antes de cargar una nueva muestra, los cartuchos se someten a una etapa de limpieza y acondicionamiento.

El sistema para la SPE en línea consta de un bucle de inyección, una válvula conmutadora de dos posiciones y 10 puertos y una bomba cuaternaria. La válvula conmutadora permite trabajar simultáneamente con dos cartuchos de SPE, uno en modo de carga y el otro en modo de elución (Fig. 1). En el modo de carga, la muestra es arrastrada hacia el cartucho. En el modo de elución, los analitos retenidos son arrastrados hacia la columna analítica por los mismos disolventes que actúan de fase móvil en la separación cromatográfica.

Inicialmente, la muestra se carga en el bucle, desde donde es arrastrada por el disolvente de carga hacia uno de los cartuchos de SPE, donde los analitos son retenidos. Durante ese proceso por el otro cartucho circula la fase móvil. Tras la carga de la muestra, se activa la válvula conmutadora y el primer cartucho cambia al modo de elución, permitiendo que la fase móvil transporte los analitos retenidos a la columna analítica. Mientras la muestra está siendo eluida, el otro cartucho, es lavado y acondicionado para poder ser utilizado para la siguiente muestra.

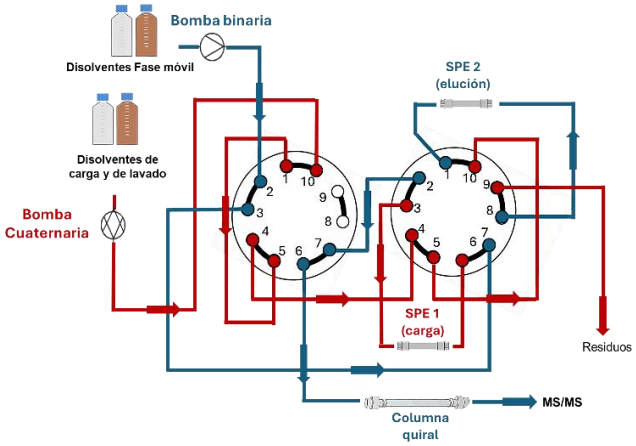

Fig. 1. Esquema de la SPE en línea-LC-MS/MS.

Las variables comúnmente optimizadas para esta técnica son el tipo de cartucho de SPE (material de relleno y dimensiones) que dependerá de las propiedades fisicoquímicas de los analitos a determinar, el volumen de carga de muestra, los disolventes de acondicionamiento de los cartuchos de SPE, entre los que se incluye el pH del disolvente de carga de la muestra y los disolventes de limpieza de los cartuchos. Otras variables a optimizar pueden ser la duración y flujo de carga de la muestra.

La SPE automatizada en línea se ha revelado como una prometedora técnica de tratamiento de muestras para el análisis de trazas de productos farmacéuticos en muestras ambientales líquidas. Permite procesar muestras en poco tiempo; minimizar la pérdida de analitos que puede producirse en tratamientos de muestras de varios pasos; reducir la intensidad de trabajo en comparación con las técnicas de tratamiento offline de muestras, que suelen requerir mayor manipulación por etapas de evaporación y reconstitución [12]; y mejorar la seguridad del analista. Además, permite reducir el consumo de disolvente, el volumen de muestra necesario, la generación de residuos plásticos y el coste del análisis, ya que los cartuchos son reutilizables, en comparación con la SPE offline [13]. No obstante, hasta la fecha solo se han descrito unos pocos métodos que empleen SPE en línea con LC-MS/MS para la determinación de contaminantes emergentes en muestras de aguas ambiental [14,15]. Sin embargo, casi ninguno de ellos incluye la determinación enantioselectiva de compuestos quirales. La Fig. 2 muestra el procedimiento genérico de la SPE en línea.

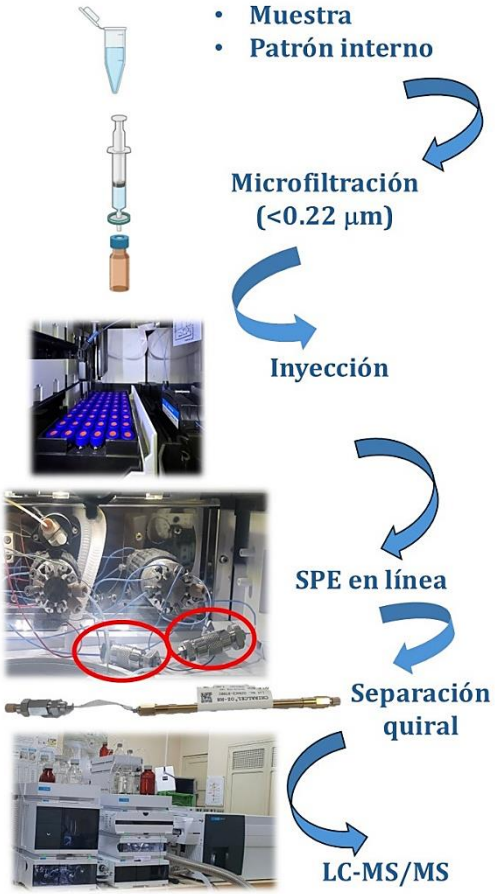

Fig. 2. Esquema genérico de la metodología analítica para la determinación enantioselectiva de analitos en matrices acuosas mediante SPE en línea-LC-MS/MS.

3. Determinación enantioselectiva de antibióticos fluoroquinolonas quirales en aguas residuales y superficiales basada en SPE en línea con LC-MS/MS

Cada vez preocupa más el uso excesivo y abusivo de los antibióticos. Estas prácticas están provocando un aumento de la resistencia a los antibióticos, lo que pone en peligro el tratamiento de las enfermedades infecciosas más comunes [16]. Las fluoroquinolonas han sido incluidas en la lista de antibióticos de importancia crítica por la Organización Mundial de la Salud [17]. La ciprofloxacina ha sido incluida en la 3ª [18] y la ofloxacina ha sido incluida en la 4ª [19] y 5ª [20] listas de vigilancia de sustancias para el seguimiento a escala de la Unión Europea en el ámbito de la política de aguas.

En este estudio se aplicó por primera vez la SPE en línea acoplada a cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem para el análisis enantioselectivo de principios activos farmacológicos en muestras de aguas residuales y superficiales. El principal objetivo fue el análisis automatizado y enantioselectivo de antibióticos fluoroquinolonas quirales y no quirales de manera simultánea y de forma automatizada [13]. Las fluoroquinolonas se seleccionaron en base a su amplio uso en medicina humana (ciprofloxacina (CIP) y ofloxacina (OFL)) y en medicina veterinaria (flumequina (FLU)). También se incluyeron cuatro de sus principales metabolitos (7-Hidroxiflumequina (OH-FLU), Ofloxacina N-óxido (OFL N-OX), N-desmetilofloxacina (DM-OFL) y desetilenociprofloxacina (DES-CIP)). En total, cinco analitos de los siete seleccionados son compuestos quirales.

El proceso de extracción propuesto fue muy simple. Para ello, las muestras de agua (0,95 mL) se mezclaron con 0,5 mL de patrón interno en tubos *Eppendorf* para una concentración final del mismo de 25 ng/mL, se agitó en vórtex durante 30 segundos y se microfiltró (<0,22 µm) con un filtro de jeringa. Se inyectaron en el sistema 700 µL de muestra. A continuación, la muestra se transfirió a un cartucho de SPE en línea haciendo pasar agua durante 2 minutos a un flujo de 2 mL/min. Tras la carga de la muestra en el cartucho, la válvula se cambió al modo de elución permitiendo que la fase móvil transfiriera los compuestos retenidos en el cartucho de SPE a la columna cromatográfica para la separación de los analitos. Mientras se eluía el cartucho SPE, el cartucho SPE empleado en el anterior análisis es lavado y acondicionado para ser utilizado en la siguiente muestra. Los cartuchos se lavaron y acondicionaron haciendo pasar metanol a un flujo de 2 mL/min durante 4,4 minutos. A continuación, se empleó agua durante 3,5 minutos al mismo flujo para su acondicionamiento. La SPE en línea se llevó a cabo en cartuchos de SPE de fase reversa Bond Elut Online PLRP-S (12,5 mm × 4,6 mm diámetro interno, 15-20 µm).

La elución de los analitos de los cartuchos de SPE se realizó mediante la fase móvil empleada en la separación cromatográfica. Dicha separación se llevó a cabo en la columna Chiralcel OZ-RH (150 mm × 4,6 mm diámetro interno, 5 µm) a una temperatura de 30 °C y protegida por una precolumna Chiralcel OZ-RH (10 mm × 4 mm diámetro interno, 5 µm). La fase móvil estaba compuesta por una disolución acuosa de 10 mM $HCOONH_4$ ajustada a pH 5,4 (con HCOOH) (disolvente A) y metanol (disolvente B). La elución de los analitos se llevó a cabo en modo isocrático con una proporción 8:92 disolvente A:disolvente B a un flujo de 1,5 mL/min. Por último, la determinación se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con ionización por *electrospray* en modo positivo. Se empleó el modo *Multiple Reaction Monitoring (MRM)* seleccionándose dos transiciones, una para la cuantificación y otra para la confirmación. El tiempo total de análisis fue de 14 minutos [3].

El volumen de carga de muestra es uno de los parámetros clave a optimizar en la SPE en línea debido a su gran impacto en la sensibilidad. Para ello, en la optimización de la metodología, se probaron volúmenes de carga de muestra en el rango de 100 a 1000 µL, empleando para ello agua residual influente dopada a 20 ng/mL. Como puede observarse en la Fig. 3, las señales de todos los compuestos aumentaron significativamente con el aumento del volumen de muestra de 400 µL a 700

µL. A volúmenes mayores, la respuesta permaneció constante para la mayoría de los compuestos, excepto para los enantiómeros de flumequina y desmetilofloxacina cuyas señales disminuyeron posiblemente asociado a un mayor efecto matriz. Por lo tanto, se seleccionó 700 µL como volumen de muestra de carga.

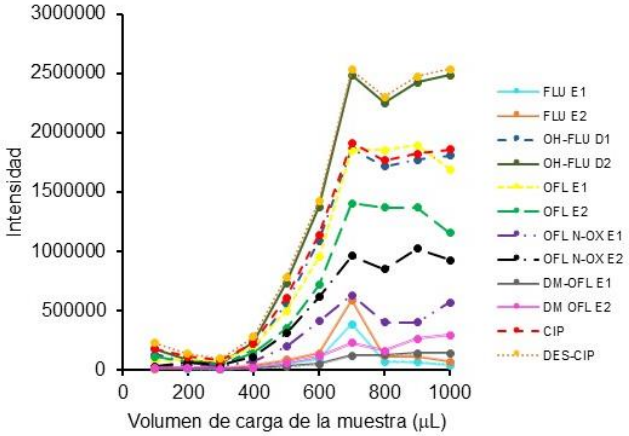

Fig. 3. Influencia del volumen de carga de la muestra en la sensibilidad.

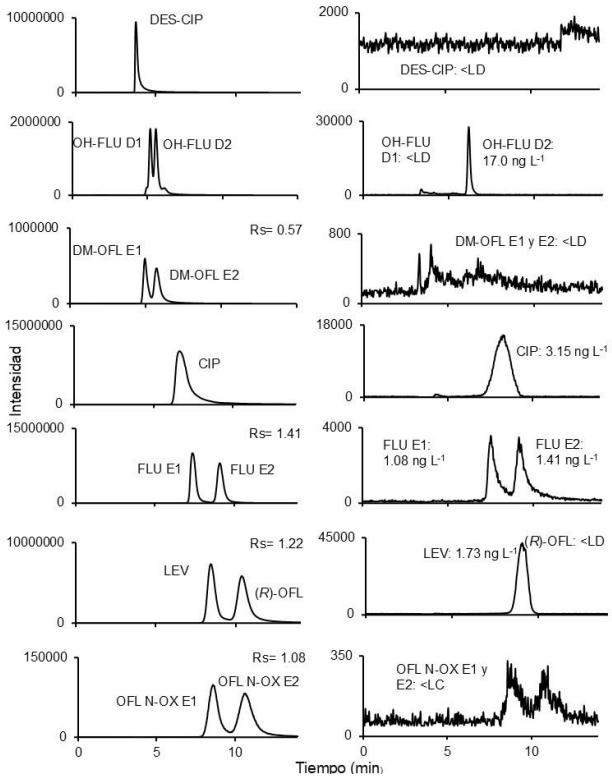

Fig. 4. Cromatogramas *MRM* de antibióticos fluoroquinolonas en agua residual influente dopada a 0,5 µg/L (izquierda) y sin dopar (derecha). Rs: resolución enantiomérica. <LD: inferior al límite de detección. <LC: inferior al límite de cuantificación.

El método se validó a tres niveles de concentración para su aplicación a aguas superficiales y aguas residuales efluentes e influentes. Se observó efecto matriz por lo que fue necesario emplear una calibración en muestra. Los valores de exactitud oscilaron entre el 61,4 y el 122% en aguas residuales y entre el 73,4% y el 119% en aguas superficiales. La precisión, expresada como desviación estándar relativa, fue inferior al 13,6% para todos los compuestos y matrices de muestra. Los límites de cuantificación del método oscilaron entre 0,2 y 50 ng/L para todos los compuestos en aguas residuales y superficiales. En la Fig. 4 se pueden observar los cromatogramas *MRM* obtenidos empleando las condiciones óptimas para un agua residual influente dopada (0,5 µg/L) y sin dopar.

4. Determinación enantioselectiva de fármacos β-bloqueantes y antidepresivos quirales en aguas residuales basada en SPE en línea con LC-MS/MS

En este trabajo, se desarrolló un método analítico para la determinación enantioselectiva de fármacos quirales de los grupos terapéuticos de β-bloqueantes y antidepresivos en aguas residuales influentes y efluentes [21]. Se trata de una metodología sencilla y automatizada, que incluye el tratamiento de la muestra, el lavado y reacondicionamiento del cartucho, así como la determinación de los enantiómeros en un tiempo total de 40 minutos. Los analitos fueron tres β-bloqueantes (atenolol (ATE), metoprolol (MET) y propranolol (PRO)), cinco antidepresivos (citalopram (CIT), fluoxetina (FLX), duloxetina (DLX), sertralina (SER) y venlafaxina (VLF)) y dos de sus metabolitos (norfluoxetina (NOR) y O-desmetilvenlafaxina (ODV)). Los compuestos fueron seleccionados en función de su presencia en el medio ambiente, su uso prolongado, ya que se emplean en el tratamiento de enfermedades crónicas, y su creciente consumo en los últimos años [22,23]. Además, la fluoxetina y el propranolol se incluyen en la última lista de vigilancia [20] como contaminantes emergentes a monitorizar y el citalopram, el metoprolol y la venlafaxina se encuentran entre los indicadores de la necesidad de realizar un tratamiento cuaternario en las depuradoras en la reciente Directiva Europea sobre tratamiento de aguas residuales urbanas [24].

En el método analítico desarrollado, se añadieron 50 µL de una solución de mezcla de dos patrones internos (atenolol-d^7 y venlafaxina-d^6 a una concentración de 20 µg/L para cada enantiómero) a 950 µL de agua residual previamente filtrada a través de un filtro de jeringa de celulosa (<0,22 µm). Se cargaron 600 µL de muestra en el bucle de inyección, que fueron transferidos a un cartucho SPE Bond Elut Online PLRP-S (12,5 mm × 4,6 mm diámetro interno, 15-20 µm). La carga de la muestra se hizo con agua (pH 6,5) a un flujo de 1,5 mL/min, durante 3 minutos. La fase móvil empleada para transportar los analitos a la columna y para su posterior separación cromatográfica, consistió en una mezcla de metanol y de una disolución acuosa 10 mM de acetato

amónico a pH 4 (98:2, v/v). Mientras el cartucho SPE cargado estaba en el proceso de elución, el otro cartucho se lavó con una mezcla de metanol:acetonitrilo (50:50, v/v) a 2 mL/min durante 5 minutos y se acondicionó con agua (pH 6,5) antes de ser utilizado para la siguiente muestra.

La separación de los enantiómeros se llevó a mediante cromatografía de líquidos, empleando una columna quiral Chirobiotic V (250 mm × 2,1 mm de diámetro interno, 5 µm) protegida por una precolumna quiral Astec Chirobiotic V (20 mm × 4 mm de diámetro interno, 5 µm), ambas de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se llevó a cabo una elución isocrática con un caudal de 0,4 mL/min, empleando la fase móvil anteriormente descrita. La determinación de los analitos se hizo mediante espectrometría de masas en tándem, según un método previamente establecido [25].

Se optimizaron los parámetros más relevantes para la SPE en línea, empleando agua residual influente dopada con una mezcla de los analitos y los patrones internos a una concentración de 1,0 µg/L para cada enantiómero.

En primer lugar, se evaluaron dos tipos diferentes de cartuchos: Oasis HLB (20 mm × 4,6 mm, 25 µm) de Waters y PLRP-S (12,5 mm × 2,1 mm de diámetro interno, 15–20 µm) de Agilent. Para ambos materiales, los analitos mostraron una respuesta similar. Sin embargo, los cartuchos Oasis HLB presentaron menor reproducibilidad y peor resolución enantiomérica de algunos compuestos (propranolol, duloxetina. fluoxetina y sertralina). En consecuencia, se seleccionaron los cartuchos PLRP-S.

A continuación, se evaluó la influencia del volumen de carga de muestra en un rango de 100 a 900 µL. Las señales de todos los analitos aumentaron al incrementar el volumen de muestra hasta los 600 µL. A partir de este volumen, la respuesta se mantuvo constante o disminuyó, probablemente debido a un efecto de supresión iónica causado por la matriz. Por lo tanto, el volumen óptimo se estableció en 600 µL.

Se optimizó también el pH del disolvente de carga, probando valores entre 4 y 6,5. Como muestra la Fig. 5, a valores de pH más ácidos las respuestas de la mayoría de los analitos aumentaron. Sin embargo, para otros compuestos como el metoprolol y el metabolito O-desmetilvenlafaxina, las señales disminuyeron. Además, los enantiómeros del citalopram no pudieron separarse a valores de pH inferiores a 6,5. Por tanto, se seleccionó este valor como un compromiso entre la sensibilidad y la resolución enantiomérica para todos los analitos.

A continuación, se evaluó el caudal para la carga de las muestras, probando los valores 1, 1,5 y 2,0 mL/min. Las mejores respuestas para la mayoría de los analitos se obtuvieron con el caudal intermedio de 1,5 mL/min.

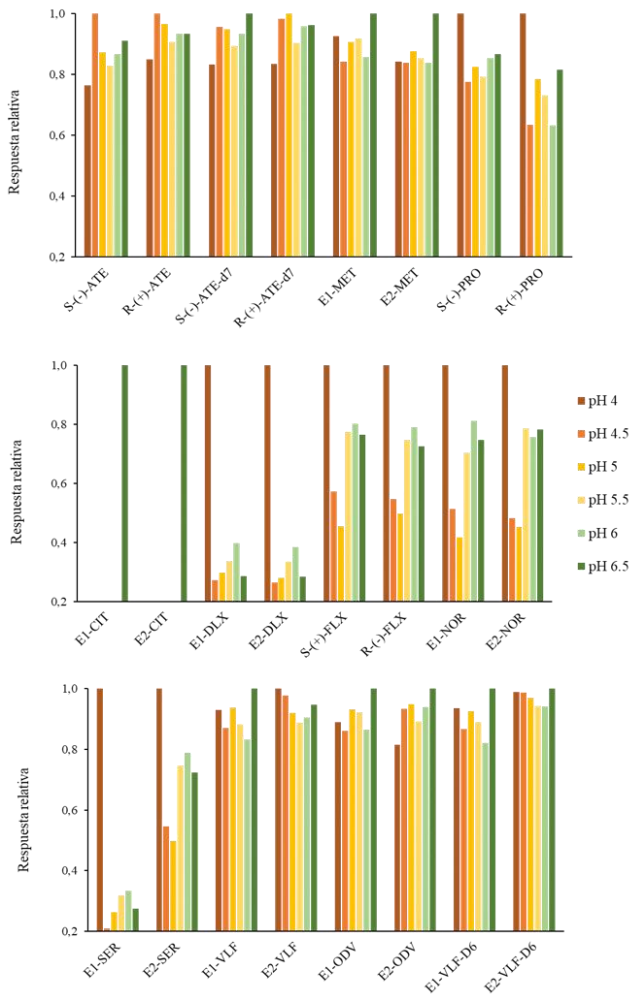

Fig. 5. Influencia del pH del disolvente de carga sobre la sensibilidad, expresada como respuesta relativa.

Finalmente, se optimizó el disolvente de lavado para asegurar que no se producía contaminación entre una inyección y otra. Como disolventes de lavado se evaluaron metanol, acetonitrilo y una mezcla 50:50 (v/v) de los dos, obteniéndose un lavado más eficaz para la mezcla de ambos disolventes.

El método fue validado para su aplicación en aguas residuales influentes y efluentes, a tres niveles de concentración. La resolución enantiomérica estuvo comprendida entre 0,51 - 1,24, como muestra la Fig. 6 donde se recogen los cromatogramas *MRM* obtenidos para agua residual influente dopada a 0,1 µg/L. El efecto matriz fue superior en las aguas residuales influentes. Para garantizar una cuantificación adecuada, además de los patrones internos, se utilizaron rectas de calibrado en matriz. La exactitud estuvo comprendida entre 60,8% - 114%, y la precisión, expresada como desviación estándar relativa, fue inferior al 12,5% para todos los compuestos. Los límites de cuantificación oscilaron entre 0,10 y 100 ng/L en aguas residuales influentes y entre 0,1 y 50 ng/L en los efluentes.

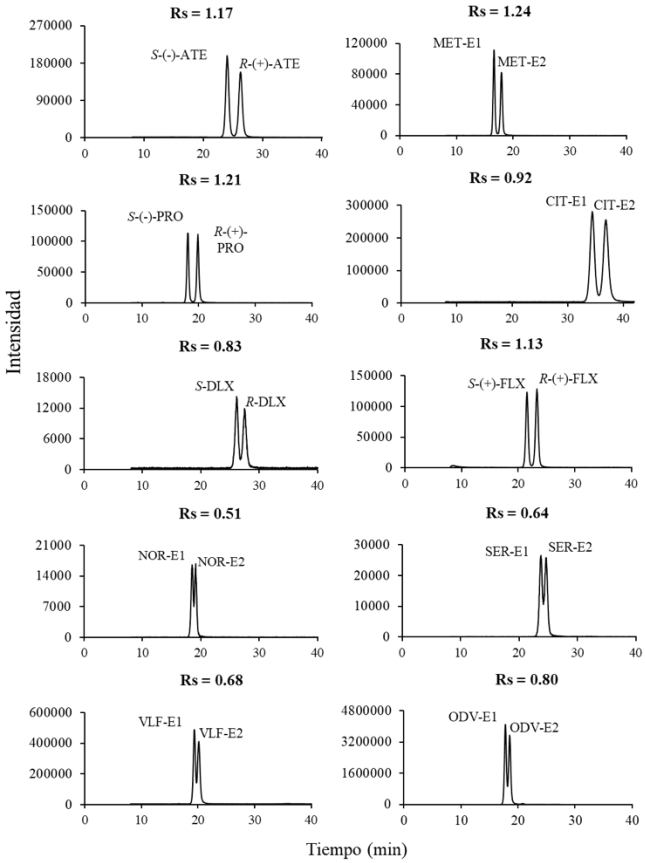

Fig. 6. Cromatogramas *MRM* de fármacos β-bloqueantes y antidepresivos en agua residual influente dopada a 0,1 ng/L. Rs: resolución enantiomérica.

5. Conclusiones

Esta investigación evidencia que los tratamientos de muestra basados en SPE en línea representan una estrategia eficaz para el análisis enantioselectivo de contaminantes quirales en muestras ambientales. Una característica clave de este enfoque es su capacidad de automatización, fundamental en laboratorios de análisis de rutina. La SPE en línea también presenta otras ventajas como la reducción de la intensidad del trabajo y del tiempo de procesamiento de las muestras, y la disminución de la pérdida de analitos, el consumo de disolventes y la generación de residuos, al mismo tiempo que aumenta la seguridad del analista.

Las dos metodologías analíticas presentadas han sido optimizadas y validadas para la determinación enantiomérica de distintos grupos de fármacos quirales, entre los que se incluyen antibióticos, antidepresivos, β-bloqueantes y algunos de sus metabolitos, en aguas residuales y superficiales. Ambos métodos han permitido abordar con eficacia separaciones enantioméricas en matrices ambientales complejas, consolidando la aplicabilidad de la SPE en línea acoplada a LC-MS/MS como una técnica automatizada, sensible, robusta y versátil para el análisis de contaminantes quirales.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del proyecto PID2020-117641RB-I00 por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y del proyecto US-1254283 por la Junta de Andalucía, Consejería de Economía y Conocimiento. Marina Arenas agradece el contrato predoctoral FPU20/00540 del Ministerio de Universidades. Carmen Mejías agradece el contrato predoctoral VIPPIT-US2021II.2A de la Universidad de Sevilla.

Información complementaria en separación quiral

Analysis of Chiral Pollutants in the Environment: Fundamentals, Techniques and Applications. Comprehensive Analytical Chemistry series, Elsevier, 1ª Edición, Volumen 111 –Publicación: 3 de noviembre de 2025. Editor de la serie: Damià Barceló. Editores del volumen: Irene Aparicio, Esteban Alonso, Juan Luis Santos.
Hardback ISBN: 978044334581
eBook ISBN: 9780443345821

Referencias

[1] C. Mejías, M. Arenas, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, A systematic review on distribution and ecological risk assessment for chiral pharmaceuticals in environmental compartments, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 260 (2022) 3. https://doi.org/10.1007/s44169-021-00003-5
[2] M. Arenas, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Enantioselective behavior of environmental chiral pollutants: A comprehensive review, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 52:17 (2022) 2995-3034. https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1900764
[3] M. Arenas, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, An overview of analytical methods for enantiomeric determination of chiral pollutants in environmental samples and biota, TrAC Trends Anal. Chem. 143 (2021) 116370. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116370
[4] S. Tong, Liquid-liquid chromatography in enantioseparations, J. Chromatogr. A. 1626 (2020) 461345. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461345
[5] S. Xie, X. Chen, J. Zhang, L. Yuan, Gas chromatographic separation of enantiomers on novel chiral stationary phases, TrAC Trends Anal. Chem. 124 (2020) 115808. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115808
[6] C. Ribeiro, A.R. Ribeiro, A.S. Maia, M.E. Tiritan, Occurrence of chiral bioactive compounds in the aquatic environment: a review, Symmetry (Basel). 9 (2017) 1-33. https://doi.org/10.3390/sym9100215
[7] J. Guo, Q. Wang, D. Xu, J. Crommen, Z. Jiang, Recent advances in preparation and applications of monolithic chiral stationary phases, TrAC Trends Anal. Chem. 123 (2020) 115774. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115774
[8] M.Á. de la Serna Calleja, S. Bolado, J.J. Jiménez, R. López-Serna, Performance critical comparison of offline SPE, online SPE, and direct injection for the determination of CECs in complex liquid environmental

matrices, Microchem. J. 187 (2023) 108395. https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108395
[9] A. Rubirola, M.R. Boleda, M.T. Galceran, Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters, J. Chromatogr. A. 1493 (2017) 64–75. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.075
[10] D. Sang, N. Cimetiere, S. Giraudet, R. Tan, D. Wolbert, P. Le Cloirec, Online SPE-UPLC-MS/MS for herbicides and pharmaceuticals compounds' determination in water environment: A case study in France and Cambodia, Environ. Adv. 8 (2022) 100212. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100212
[11] C.A. Marasco Júnior, D.M. Sartore, R.S. Lamarca, B.F. da Silva, Á.J. Santos-Neto, P.C.F. d. Lima Gomes, On-line solid-phase extraction of pharmaceutical compounds from wastewater treatment plant samples using restricted access media in column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1180 (2021) 122896. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122896
[12] K.D. Danields, M. Park, Z. Huang, A. Jia, G.S. Flores, H.K. Lee, S.A. Snyder, A review of extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in environmental waters, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 50 (2020) 2271-2299. https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1705723
[13] C. Mejías, J.L. Santos, J. Martín, I. Aparicio, E. Alonso, Automatised on-line SPE-chiral LC-MS/MS method for the enantiomeric determination of main fluoroquinolones and their metabolites in environmental water samples, Microchem. J. 185 (2023) 108217. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108217
[14] A.C. Faleye, A.A. Adegoke, K. Ramluckan, J. Fick, F. Bux, T.A. Stenström, Concentration and reduction of antibiotic residues in selected wastewater treatment plants and receiving waterbodies in Durban, South Africa, Sci. Total Environ. 678 (2019) 10-20. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.410
[15] V.R. Panditi, S.R. Batchu, P.R. Gardinali, Online solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry determination of multiple classes of antibiotics in environmental and treated waters, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 5953-5964. https://doi.org/10.1007/s00216-013-6863-8
[16] World Health Organization, (2020), Fact sheet: Antibiotic resistance. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance (Accessed May 2025)
[17] World Health Organization, (2018), Antimicrobial Resistance Division, Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th edition. ISBN: 9789241515528. https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528 (Accessed May 2025)
[18] European Commission, (2020), Commission Implementing Decision (EU) 2020/1161 of 4 August 2020 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (C(2020) 5205). https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2020/1161/oj/eng (Accessed May 2025)
[19] European Commission, (2022), Commission Implementing Decision (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (C(2022) 5098). https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2022/1307/oj/eng (Accessed May 2025)
[20] European Commission, (2025), Commission Implementing Decision (EU) 2025/439 of 28 February 2025 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (C(2025) 1244). https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2025/439/oj/eng (Accessed May 2025)
[21] M. Arenas, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Automatised online SPE-LC-MS/MS method for the enantioselective determination of chiral β-blockers and antidepressants in wastewater, Anal. Chim. Acta. 1361 (2025) 344152. https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344152
[22] V.K. Vashistha, A. Kumar, Stereochemical facets of clinical β-blockers: An overview, Chirality. 32 (2020) 722–735. https://doi.org/10.1002/chir.23200
[23] M.J. Fernandes, P. Paíga, A. Silva, C.P. Llaguno, M. Carvalho, F.M. Vázquez, C. Delerue-Matos, Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal, Chemosphere. 239 (2020) 124729. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124729
[24] European Parliament, Directive (EU) 2024/3019 of The European Parliament and of The Council of 27 November 2024 concerning urban wastewater treatment., Off. J. Eur. Union. 3019 (2024) 1–59. https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2024/3019/oj/eng (Accessed May 2025)
[25] M. Arenas, J.L. Santos, J. Martín, I. Aparicio, E. Alonso, Enantioselective LC-MS/MS determination of antidepressants, β-blockers and metabolites in agricultural soil, compost and digested sewage sludge, Anal. Chim. Acta. 1261 (2023) 341224. https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341224