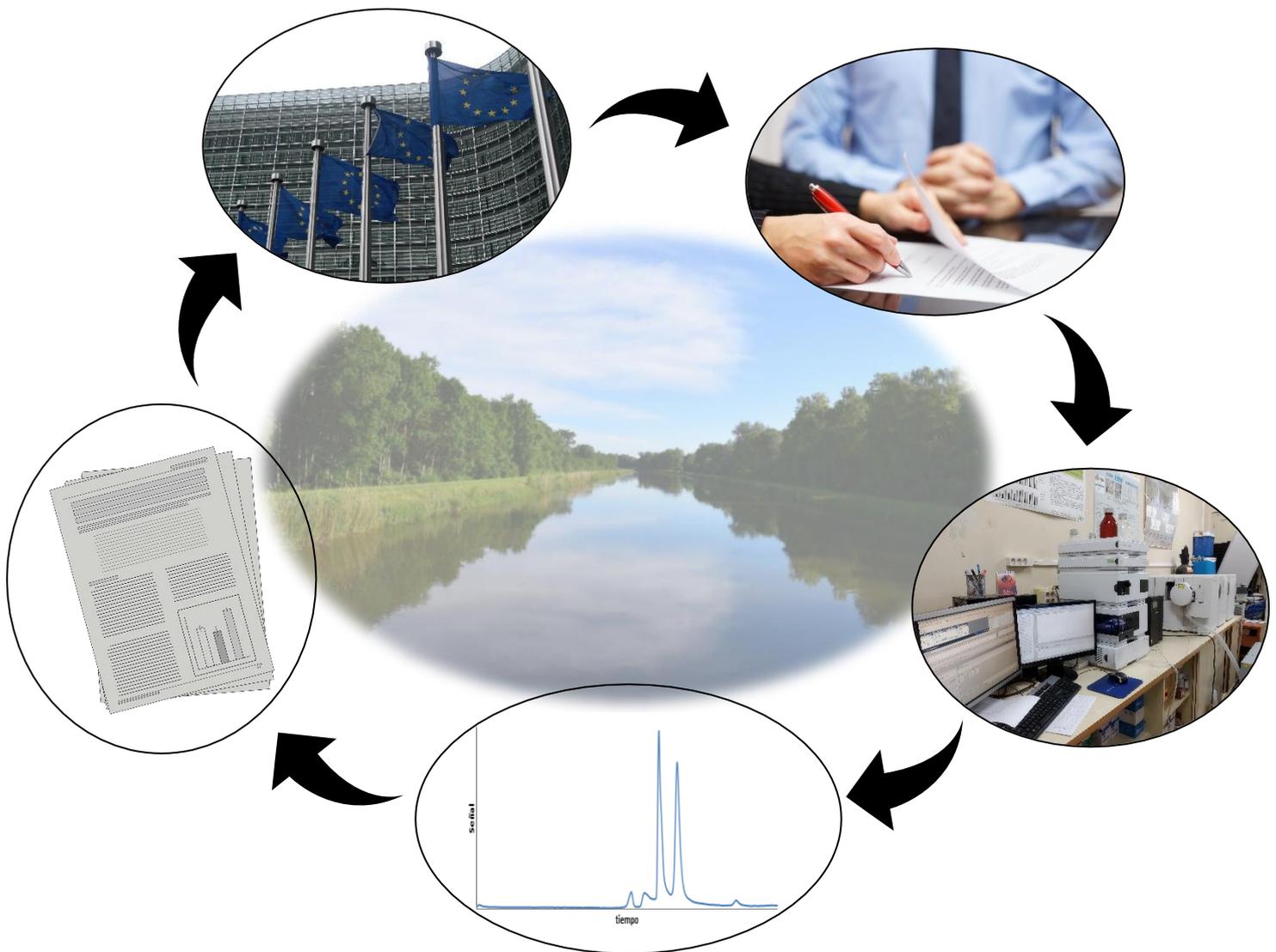




Optimización y validación de un método analítico para la determinación simultánea de los nuevos compuestos (incluidos fármacos) de



la lista de observación de la UE en aguas superficiales



Trabajo de Fin de Máster

Máster de Especialización en Farmacia (Especialidad Industria Farmacéutica)

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Pablo Serrano Giménez



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Máster

Máster en Especialización Profesional en Farmacia.

Especialidad Industria Farmacéutica

Título del trabajo: Optimización y validación de un método analítico para la determinación simultánea de los nuevos compuestos (incluidos fármacos) de la lista de observación de la UE en aguas superficiales.

Nombre del estudiante: Pablo Serrano Giménez

Lugar y fecha de presentación: Facultad de Farmacia, Sevilla.

11/12/2019

Departamento donde se ha realizado el TFM: Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla.

Nombre de los tutores del trabajo: Julia Martín Bueno e Irene Aparicio Gómez.



Julia Martín Bueno e Irene Aparicio Gómez, Profesoras del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN, que el presente trabajo titulado *Optimización y validación de un método analítico para la determinación simultánea de los nuevos compuestos (incluidos fármacos) de la lista de observación de la UE en aguas superficiales* ha sido realizado, bajo nuestra tutorización y asesoramiento, dentro del Departamento de Química Analítica durante el curso académico 2018/19, constituyendo la memoria que presenta el graduado **Pablo Serrano Giménez** como Trabajo Fin de Máster del Máster en Especialización Profesional en Farmacia, especialidad Industria Farmacéutica, y que cumple los requisitos necesarios para ser presentado como Trabajo Fin de Máster.

Y para que conste, a los efectos oportunos, se expide el presente informe en Sevilla, a 29 de octubre de 2019.

Fdo.: Julia Martín Bueno

Fdo.: Irene Aparicio Gómez

Fdo.: Fernando de Pablos Pons

Director del Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Resumen

El desarrollo de la legislación con respecto a la presencia de contaminantes en el agua en Europa ha sido constante en los últimos años. La Unión Europea publicó en el año 2000 la Directiva 2000/60/EC estableciendo un marco de acción comunitaria de regulación de la calidad del agua. A partir de ella, diversas directivas europeas han legislado sobre cuáles son los contaminantes y sus valores que no pueden ser sobrepasados en las aguas europeas. Adicionalmente, se propuso la creación de una lista de observación de una serie de contaminantes emergentes (no regulados), que posiblemente tengan un efecto medioambiental, por lo que su monitorización es necesaria. Por ello, se propuso la primera lista de observación (Decisión 2015/495) de 17 compuestos a monitorizar en las aguas superficiales. Tras investigaciones realizadas en países de la Unión Europea, la comisión de medio ambiente retiró 5 compuestos e incluyó 3 (Decisión 2018/840), de manera que en la lista de observación más reciente encontramos 15 compuestos donde se incluyen hormonas, antibióticos y pesticidas.

En este trabajo de fin de Máster se propone el desarrollo de una metodología analítica de los compuestos de la lista de 2018 para matrices acuosas ya que ninguna metodología ha sido publicada hasta el momento. El trabajo experimental estuvo basado en la extracción en fase sólida y posterior análisis cuantitativo con un equipo de cromatografía líquida acoplada un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, optimizándose los factores que afectan al proceso de extracción y a la separación cromatográfica. Se obtuvieron recuperaciones entre el 65-110 %, una precisión entre 5,3-13 % y unos límites de detección entre 0,01-5,66 ng L⁻¹, siendo iguales o inferiores a los propuestos por la Decisión 2018/840/EU, excepto para las hormonas. Aplicando esta metodología para el análisis de aguas superficiales y residuales, se encontraron mayormente antibióticos y pesticidas.

Palabras clave: Lista de observación 2018, contaminantes emergentes, análisis de aguas, cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

Abstract

The development of legislation regarding the presence of pollutants in water in Europe has been constant in recent years. In 2000, the European Union published Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action to regulate water quality. Since then, several European directives have legislated on which are the pollutants and their values that cannot be exceeded in European waters. In addition, a list of a series of emerging (unregulated) pollutants was proposed, which possibly have an environmental effect, and for that reason their monitoring is necessary. Therefore, the first Watch List (Decision 2015/495) of 17 compounds to be monitored in surface waters was proposed. After investigations carried out in European countries, the environmental commission removed 5 compounds and included 3 (Decision 2018/840), so that in the most recent Watch List we found 15 compounds where hormones, antibiotics and pesticides are included.

This Master's Dissertation work proposes the development of an analytical methodology for compounds from the 2018 list for aqueous matrices as no methodology has been published so far on this matter. The experimental work was based on the solid phase extraction and posterior quantitative analysis with a liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometer equipment, optimizing factors that affect the extraction process and the chromatographic separation. Recoveries between 65-110 %, precision between 5,3-13 % and detection limits between 0,01-5,66 ng L⁻¹ were obtained, being equal to or less than those proposed by Decision 2018/840/EU, except for hormones. Applying this methodology for the analysis of surface water and waste water, antibiotics and pesticides were mostly found.

Key words: 2018 Watch List, emerging pollutants, water analysis, liquid chromatography with mass spectrometry couple.

Índice

1. Introducción	12
1.1 Normativa en relación con el agua en la Unión Europea	12
1.2 Normativa de la lista de observación	13
1.3 Compuestos incluidos en la lista de observación 2018/840	15
1.4 Presencia e importancia de los CEPs incluidos en la lista de observación	18
1.5 Metodologías actuales para la determinación de los CEPs	20
1.6 Objetivos	21
1.7 Revisión del estado del arte y búsqueda de información científica	21
2. Materiales y métodos	22
2.1 Materiales y productos químicos	22
2.2 Muestreo	23
2.3 Tratamiento de la muestra	24
2.4 Análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	26
2.5 Validación de la metodología analítica	27
2.6 Control de calidad	28
3. Resultados y discusión	28
3.1 Optimización de la separación cromatográfica.	28
3.2 Optimización de la extracción en fase sólida	34
3.3 Validación del método	35
3.3.1 Sensibilidad	35
3.3.2 Linealidad	36
3.3.3 Efecto matriz	36
3.3.4 Exactitud	38
3.3.5 Precisión	38
3.4 Aplicación de la metodología desarrollada en muestras de agua	40
3.5 Presencia de los CEPs en otros países	42
4. Conclusiones	46
5. Bibliografía	47

Glosario de abreviaturas

UE:	Unión Europea
WTD:	Directiva Marco del Agua
CE:	Comisión Europea
UNEP:	Programa de las Naciones Unidas para el medioambiente
NCA:	Normas de calidad ambiental
CEP:	Contaminantes de emergente preocupación
BHT:	2,6-ditert-butil-4-metilfenol
EHMC:	4-metoxicinamato de 2-etilhexilo
WWTP:	Planta de tratamiento de aguas residuales
SPE:	Extracción en fase sólida
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
ESI:	Electrospray ionization
MRM:	Multiple Reaction Monitoring
LDM:	Límite de determinación del método
LCM:	Límite de cuantificación del método

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema de la evolución de las directivas de la Unión Europea en cuanto a los contaminantes medioambientales (Pietrzak et al., 2019).	15
Figure 2. Izquierda: Búsqueda en Scopus de las palabras clave: water analysis, watch list. Derecha: Búsqueda en Web of Science de las palabras clave: emerging pollutants, watch list.	22
Figura 3. Procedimiento de SPE con las fases de acondicionamiento, filtración y elución, seguido de la evaporación con corriente de nitrógeno.	25
Figura 4. El sentido de las flechas indica los pasos del procedimiento: sistema de EFS aplicado a las muestras, sistema de evaporación con corriente de nitrógeno, preparación	

de los viales tras la evaporación y equipo de LC-MS con los correspondientes viales.	25
Figura 5. Cromatograma del compuesto metaflumizona en el equipo LC-MS.	30
Figura 6. Cromatograma de una mezcla de patrones de cada compuesto a 1000 ng L ⁻¹ utilizando la columna HALO C18.	33
Figura 7. Arriba: resultado de las recuperaciones utilizando metanol y acetona como eluyentes. Abajo: resultado de las recuperaciones utilizando pH neutro o pH ácido.	35
Figura 8. Representación gráfica de las diferencias significativas entre las rectas de calibrado de tres compuestos de la lista de observación. En naranja se muestran las rectas en matriz y en azul se muestran las rectas en disolvente.	37
Tabla 1. Compuestos incluidos en la última lista de observación de la Decisión 2018/840/EC.	16
Tabla 2. Parámetros espectrométricos del análisis de los compuestos en la lista de observación.	32
Tabla 3. Resultados de los valores de exactitud y precisión del método desarrollado.	39
Tabla 4. Rango de concentraciones de los compuestos en muestras de agua.	41
Tabla 5. Distribución de los CEPs de la Decisión 2018/840 en diferentes países del mundo en distintas matrices acuosas.	43

1. Introducción

1.1 Normativa en relación con el agua en la Unión Europea

El agua es un valioso y vital recurso para la vida y actividad humana. No obstante, es también vital para los ecosistemas y los organismos que dependen de este recurso, que, en última instancia, son todos los seres vivos. Es por eso por lo que existe en la actualidad un aumento en la preocupación sobre la calidad del consumo y manipulación del agua, no solo aplicado a los seres humanos, si no también cuando es tratada en las plantas depuradoras para devolver el agua al medio natural. Esta preocupación se ha traducido en diversas normativas y regulaciones, emitidas por organizaciones de nivel internacional, como la Organización Mundial de la Salud o la Unión Europea a través de la Comisión Europea (CE).

En Europa más específicamente, las regulaciones sobre la calidad y los contaminantes en agua han sido constantes en los últimos años, empezando con la Directiva 2000/60/EC (Directiva Marco del Agua o WFD en sus siglas en inglés) (European Commission, 2000). Esta directiva es la respuesta de los países de la Unión Europea a la necesidad de aunar actuaciones y esfuerzos en materia de gestión del agua, para preservar la calidad del agua en términos cuantitativos y cualitativos, garantizar su sostenibilidad y promover un uso responsable de este recurso natural, que ya no es considerado solo como tal, sino como un factor vital que afecta a la salud pública y a los ecosistemas europeos. Por lo tanto, en esta directiva se establecen una serie de objetivos medioambientales iguales para todos los países de la Unión Europea. Esta estrategia implica, entre otras tareas, la identificación de sustancias prioritarias entre aquellas que suponen un riesgo significativo para el medio acuático o a través de este. En la Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en 2001, se establece la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas en la que se establece la primera lista de 33 sustancias o grupos de sustancias que son prioritarias en cuanto a su regulación por parte de la Unión Europea, basándose

en conocimientos anteriores sobre sus diferentes ecotoxicidades en el medio ambiente, estando incluidas en el anexo X de la Directiva 2000/60/CE.

Un poco más tarde, a nivel internacional se pacta un convenio en Estocolmo en el que se regulan lo que se denominan “contaminantes orgánicos persistentes”, entre ellos pesticidas, dioxinas y furanos. Este acuerdo fue ratificado inicialmente por 152 países, actualmente 183 (UNEP, 2004). A consecuencia de esto, la Unión Europea promulgó el Reglamento 850/2004 para el control de las sustancias reguladas en el Convenio de Estocolmo (CE (UE), 2004).

Más tarde, entre otras reglamentaciones, es en el año 2008 cuando es publicada la Directiva 2008/105/EC (European Commission, 2008), que viene a modificar la Directiva 2000/60/EC original, haciendo especial hincapié en la lista de compuestos, no siendo admisible la aparición de estos compuestos en las masas de aguas europeas a una concentración superior a la establecida en la directiva (normas de calidad ambiental NCA o EQS en sus siglas en inglés) (European Commission, 2008). Más recientemente esta lista ha sido ampliada para el control de más contaminantes en la Directiva 2013/39/EC (European Commission, 2013), hasta 45 los compuestos estudiados, entre los que se incluyen productos de desinfección, pesticidas, disolventes clorados y plastificantes entre otros.

1.2 Normativa de la lista de observación

Sin embargo, la Unión Europea también focaliza su atención y preocupación sobre sustancias que podrían ser un riesgo para la salud humana y el ecosistema europeo, a lo que hay que sumar en algunos casos, falta de información sobre el impacto químico y ecotoxicológico real de estas sustancias. Es por esta razón por la que la Comisión Europea ha publicado diversas Decisiones de ejecución, con el objeto de establecer una lista de observación de sustancias potencialmente peligrosas o como se nombran en los documentos, contaminantes de emergente preocupación (CEPs o CECs en sus siglas en inglés), los cuales, en un plazo de tiempo determinado, habría que vigilar los niveles de

concentración que se van obteniendo en los diferentes países de la Unión Europea y ver cuál es realmente su impacto medioambiental, para decidir si incluirlos o no en la lista de sustancias prioritarias. La primera Decisión de ejecución fue la Decisión 2015/495/EU (European Commission, 2015) cuya lista de observación fue la siguiente: estrona, 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol (hormonas con actividad disruptora endocrina). Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio), azitromicina, eritromicina, claritromicina (antibióticos macrólidos). 2,6-ditert-butil-4-metilfenol o BHT (aditivo alimentario), 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo o EHMC (filtro UV). Imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina, acetamiprid (pesticidas neonicotinoides), metiocarb, oxadiazon y trialato (otros pesticidas) (European Commission, 2015).

Sin embargo, esta lista es dinámica y susceptible a cambios, ya que en el 2018 la Decisión 2018/840/EU (European Commission, 2018) fue publicada, actualizando la de 2015. Dada la adquisición de datos de alta calidad sobre el BHT, diclofenaco, trialato y oxadiazón, estos compuestos fueron retirados de la lista para su estudio por parte de la comisión. En cuanto al EHMC también se retiró, ya que se concluyó que había pocos datos de concentración en los sedimentos, matriz donde se tiende a acumular dicho compuesto, de modo que a fin de garantizar que los datos de seguimiento relativos a la sustancia EHMC reflejan plenamente los riesgos que plantea, la Comisión investigó más a fondo si los Estados miembros podrían hacer un seguimiento de esta sustancia en los sedimentos de manera fiable y comparable (European Commission, 2018).

Del resto de compuesto la comisión consideraba que todavía eran necesarios datos de alta calidad para poder legislar sobre ellos. Pero no solo se retiraron compuestos, la Comisión Europea consultó a expertos de los estados miembros sobre nuevos compuestos cuya toxicidad fuese manifiesta y que existiesen métodos sensibles y fiables para su determinación. Es por ello por lo que se incluyeron al insecticida metaflumizona y a los antibióticos amoxicilina y ciprofloxacino. Precisamente la inclusión de estos antibióticos está en concordancia con el Plan de Acción Europeo frente a la resistencia antimicrobiana y de acuerdo con el propio texto de la Decisión Europea: “podría mejorar el conocimiento

de la aparición y propagación de los antimicrobianos en el medio ambiente” (European Commission, 2018).

Un esquema-resumen realizado por Pietrzak et al. (2019) ilustra cuales han sido las principales directivas en todo este sentido:

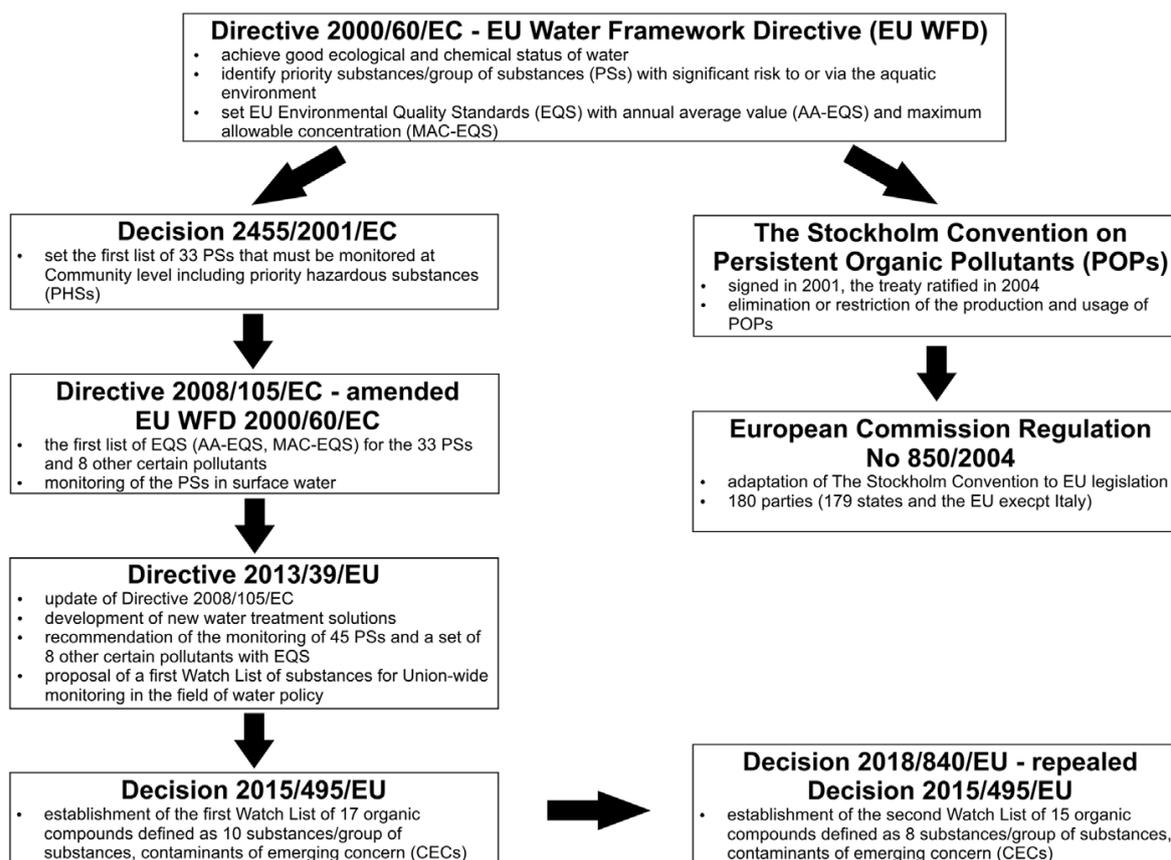
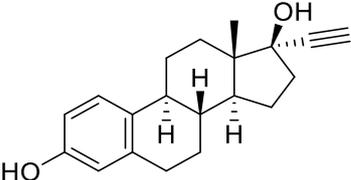
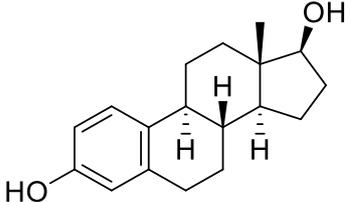
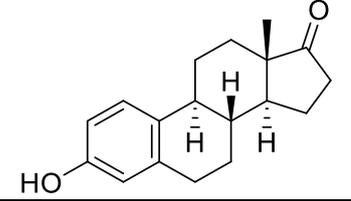
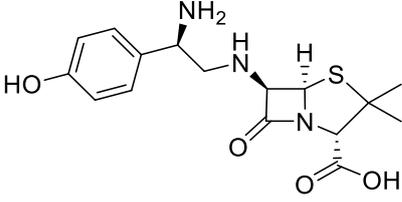
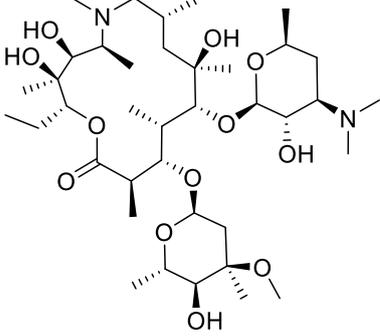
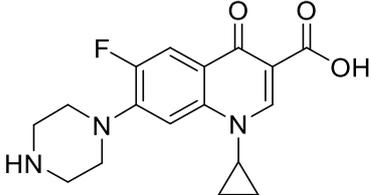


Figura 1. Esquema de la evolución de las directivas de la Unión Europea en cuanto a los contaminantes medioambientales (Pietrzak et al., 2019).

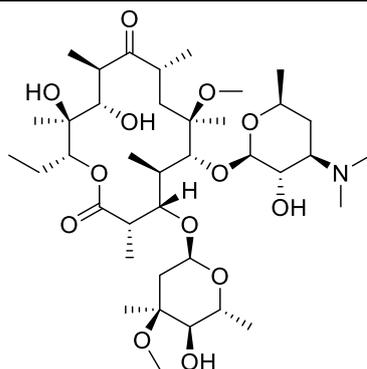
1.3 Compuestos incluidos en la lista de observación 2018/840

Los compuestos de la última lista de observación y sus estructuras se encuentran en la tabla 1:

Tabla 1. Compuestos incluidos en la última lista de observación de la Decisión 2018/840/EC.

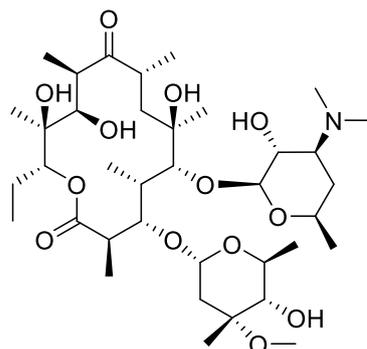
Compuesto	Estructura	Número de registro CAS
Estrógenos		
17 α -Etinilestradiol		57-63-6
17 β -Estradiol		50-28-2
Estrona		53-16-7
Compuestos farmacológicos		
Amoxicilina		26787-78-0
Azitromicina		839055-01-5
Ciprofloxacino		85721-33-1

Claritromicina



81103-11-9

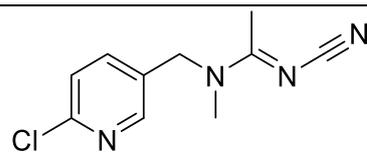
Eritromicina



114-07-8

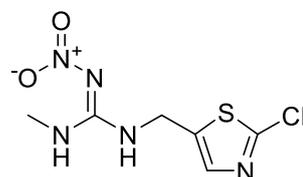
Pesticidas e insecticidas

Acetamiprid



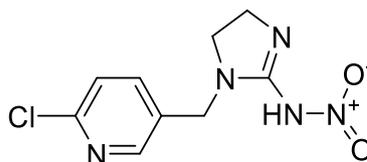
135410-20-7

Clotianidina



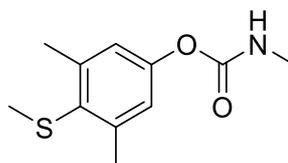
210880-92-5

Imidacloprid



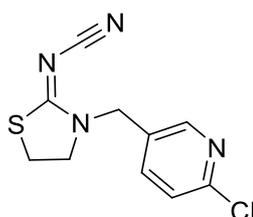
138261-41-3

Metiocarb

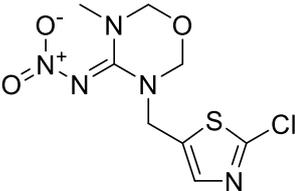
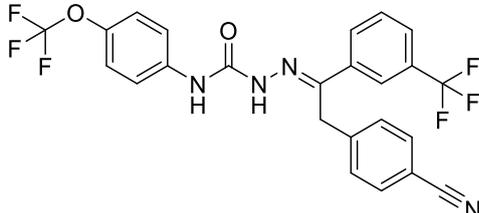


2032-65-7

Tiacloprid



111988-49-9

Tiametoxam		153719-23-4
Metaflumizona		139968-49-3

La importancia de la medida de dichos CEPs es debida a daño ecotoxicológico que producen, demostrado en diversos estudios, no solo como compuestos individuales, si no como grupos de compuestos que puedan tener una acción sinérgica o aditiva como el caso de los grupos de antibióticos macrólidos o los pesticidas neonicotinoides.

1.4 Presencia e importancia de los CEPs incluidos en la lista de observación

Todos estos compuestos pueden tener o tienen un impacto medioambiental, es por eso que muchos artículos han demostrado sus efectos y su presencia en el medio ambiente. En una revisión reciente, Morrissey et al. (2015) analizó el efecto perjudicial de los neonicotinoides en invertebrados acuáticos tanto en exposición aguda como en exposición crónica. Por otro lado, las concentraciones de estas sustancias han llegado a ser por ejemplo de $320 \mu\text{g L}^{-1}$ (Van Dijk et al., 2013) o $225 \mu\text{g L}^{-1}$ (Anderson et al., 2013) en aguas superficiales. En lo concerniente a las hormonas, está demostrado que tienen una actividad disruptora endocrina en el medio ambiente (Aris et al, 2014; De Mes et al, 2005; Vethaak et al., 2005), y potencialmente también en los seres humanos (Kabir et al., 2015), encontrándose concentraciones de en el rango de $6\text{-}102 \text{ ng L}^{-1}$ en aguas superficiales (Pailler et al, 2009) o $25\text{-}84 \text{ ng L}^{-1}$ en aguas residuales (Iparraguirre et al., 2014) entre otros. En el caso de los antibióticos, revisiones publicadas recientemente subrayan su toxicidad sobre organismos acuáticos que no son objetivos de los antibióticos y el potencial daño sobre la salud humana (Carvalho & Santos, 2016), incluso se ha

llegado a considerar a los genes de resistencia a los antibióticos, desarrollados en organismos acuáticos, también como contaminantes emergentes (Grenni et al., 2018). A pesar de que Rossmann et al. (2014) encontraron amoxicilina en aguas influentes de una planta depuradora de aguas residuales (wastewater treatment plant o WWTP en sus siglas en inglés) en Alemania a concentraciones de miles de ng L^{-1} de manera puntual, la amoxicilina es pobremente detectada en las plantas depuradoras (Carvalho & Santos, 2016). Por otro lado, Alygizakis et al. (2016) hallaron concentraciones de hasta 128 ng L^{-1} en agua de mar. En cuanto al grupo de antibióticos macrólidos, han sido cuantificados en rangos de concentraciones muy diversos como por ejemplo entre 100 ng L^{-1} hasta $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas residuales de hospitales (Gros et al., 2013), siendo estas las principales fuentes de contaminación finalmente en las aguas superficiales como el agua de río. Como resultado, han sido halladas concentraciones en río españoles de hasta incluso $17 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso de la azitromicina (Moreno-González et al., 2014) así como también en agua corriente para su uso doméstico, 17 ng L^{-1} y $3,7 \text{ ng L}^{-1}$ para azitromicina y claritromicina respectivamente (López-Serna et al., 2010). Como en los macrólidos, en el caso del ciprofloxacino también ha sido detectado en aguas residuales de hospitales, por ejemplo a $39 \mu\text{g L}^{-1}$ en Portugal (Santos et al., 2013) o $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ en un hospital español (Gros et al., 2013). El ciprofloxacino se ha cuantificado también en aguas residuales, Singh et al. (2019) analizaron diferentes aguas residuales, encontrando concentraciones de hasta $48,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Otro muchos autores también lo han encontrado, Senta et al. (2013) detectaron concentraciones de $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$, Rossmann et al. (2014) hallaron el ciprofloxacino en aguas residuales influentes de una planta depuradora a $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$, o Santos et al. (2013) quienes también cuantificaron concentraciones de hasta $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$. En agua de río, Feitosa-Felizzola & Chiron (2009) lo cuantificaron a concentraciones de $9,7 \mu\text{g L}^{-1}$ en el río Arc (Francia), pero el ciprofloxacino es usualmente detectado a menos cantidad, alrededor de cientos de ng L^{-1} o menos (Gros et al., 2013; Osorio et al. 2012; Vazquez-Roiget al., 2012).

1.5 Metodologías actuales para la determinación de los CEPs

La Unión Europea enfatiza en la detección de estos compuestos con unos límites de detección aceptables en el rango de los ng L⁻¹, de manera que métodos sensibles y robustos son necesarios para este cometido, y no solo su determinación por separado, sino también el desarrollo de metodologías que permitan la múltiple determinación de los CEPs de las Decisión 2015/495/EU (European Commission, 2015) y la Decisión 2018/840/EU (European Commission, 2018).

Ha habido diversas publicaciones en el campo de las ciencias medioambientales sobre la determinación de estos CEPs en el medio ambiente (Borrull et al., 2018; Malvar et al., 2018; Ribeiro et al., 2015; Rubirola et al., 2017; Sousa et al., 2019). Algunos de ellos incluyen algunos o todos los contaminantes de la lista de 2015, entre otros incluidos en otras directivas europeas u otros contaminantes de especial relevancia (Ribeiro et al., 2015; Rubirola et al., 2017; Sousa et al., 2019). En cambio otros autores publicaron metodologías solo para los CEPs incluidos en la Decisión 2015/495/UE (Gusmaroli et al., 2018; Malvar et al., 2018). Todos los anteriormente mencionados se basan en la extracción en fase sólida (EFS o solid-phase extraction SPE en inglés) para la preparación de las muestras y preconcentración de los analitos excepto por Borrull et al., (2019), en el que se realizó por inyección directa. Todos utilizan para la determinación un equipo de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), siendo la técnica más común para la determinación de microcontaminantes en matrices acuosas. Solo algunos utilizan sistemas de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) (Gusmaroli et al., 2018; Ribeiro et al., 2015).

Sin embargo, ningún método analítico ha sido publicado exclusivamente para los compuestos incluidos en la nueva Decisión 2018/840.

1.6 Objetivos

El objetivo general es:

- Desarrollar una metodología analítica para la determinación cuantitativa de los compuestos incluidos en la lista de observación de 2018, basándose en el procedimiento SPE-LC-MS/MS y aplicarlo en muestras de agua superficial.

Los objetivos específicos son:

- Conocer cuáles han sido las principales reglamentaciones en cuestión de contaminantes en agua en la Unión Europea y la distribución de estos CEPs en la actualidad.
- Optimizar los parámetros cromatográficos y espectrométricos de cada uno de los compuestos para su posterior determinación a concentraciones de ng L⁻¹ y optimizar el proceso de preparación de la muestra y SPE para obtener unas recuperaciones lo más adecuadas posible.
- Validar la metodología para obtener unas características analíticas de funcionamiento adecuadas.
- Aplicar la metodología analítica a muestras de agua superficial y agua residual.

1.7 Revisión del estado del arte y búsqueda de información científica

Para obtener información y hacer una revisión del estado del arte sobre los temas tratados en este trabajo se utilizaron diversas bases científicas como Scopus, Web of Science, ScienceDirect o Wiley Online Library, utilizando palabras clave como “EU decision 2015/495”, “EU decision 2018/840”, “watch list”, “Environmental analysis”, “LC-MS”, “Water analysis” o “Emergent pollutants”, y focalizando la atención en revistas de índole medioambiental, como por ejemplo *Chemosphere*, *Science of The Total Environment*, *Talanta*, *Trends in Analytical Chemistry*, *Journal of Chromatography A* o *Environment International* entre otras.

En la figura 2 se muestran el número de artículos con respecto al año sobre conceptos estudiados en este trabajo de fin de máster y como ha ido evolucionando el interés con respecto a los CEPs a lo largo del tiempo.

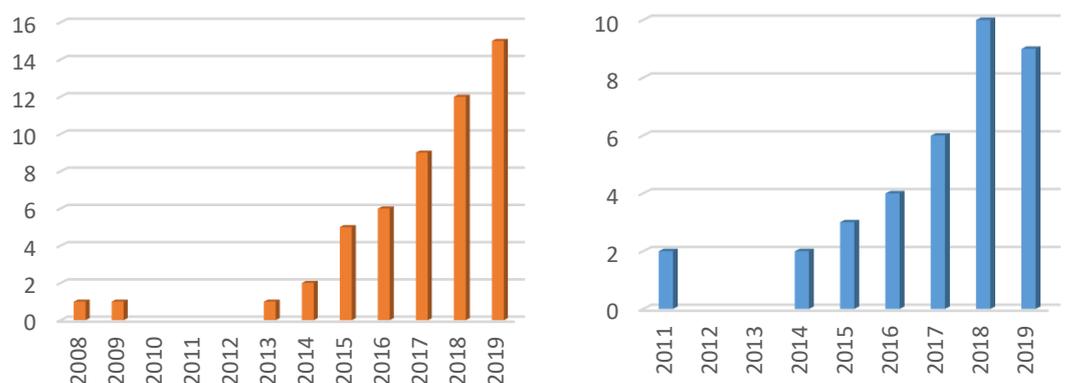


Figura 2. Izquierda: Búsqueda en Scopus de las palabras clave: water analysis, watch list. Derecha: Búsqueda en Web of Science de las palabras clave: emerging pollutants, watch list.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales y productos químicos

Los disolventes usados fueron agua, acetonitrilo, metanol, acetona y hexano, suministrados por Romil (Barcelona, España) con una pureza > 98 % y de grado HPLC. Por otro lado, las sales de acetato amónico y formiato amónico usadas fueron adquiridas a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El agua MiliQ fue usada para la limpieza del material de los experimentos.

El ácido clorhídrico (37 %) y el ácido fórmico (98 %) fueron de grado analítico y obtenidos de Panreac (Barcelona, España). Los patrones usados en la determinación fueron: 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona, tiaclopid, tiamethoxam, clotianidina, acetamiprid, imidaclopid y metiocarb fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). Los compuestos eritromicina, claritromicina, azitromicina, metaflumizona, amoxicilina y ciprofloxacino fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Todos los estándares anteriores tenían una pureza superior al 95 %. Compuestos marcados

isotópicamente fueron utilizados como patrones internos (PI). Bisphenol A- d_{16} y amoxicilina- d_4 fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Imidazolidin-4,4,5,5- d_4 (imidacloprid- d_4) y eritromicina-(N,N-dimethyl- $^{13}C_2$) (eritromicina- $^{13}C_2$) fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer GmbH.

Se prepararon las disoluciones madre de cada compuesto (1000 mg L^{-1}) en metanol, excepto por el patrón de ciprofloxacino, que se preparó con un 0.1 % de ácido fórmico para favorecer su disolución. Fueron almacenados a -20°C en congelador y en frasco de vidrio ámbar para protegerlos de la luz. La disolución patrón, de 10 mg L^{-1} de concentración fue preparada semanal mediante dilución de las disoluciones madre en metanol y almacenada también a -20°C en el mismo tipo de frasco. Soluciones mezcla conteniendo de 10 mg L^{-1} de cada compuesto fueron preparadas semanalmente para obtener los datos de optimización de la espectrometría de masas, cálculo de las recuperaciones, preparación de los patrones de la recta de calibrado y las muestras dopadas.

Para la SPE realizada fueron usados cartuchos de 3 mL con 60 mg de Oasis HLB adquiridos a Waters (Milford, MA, EEUU), utilizando una bomba de vacío y un sistema para la colocación de los cartuchos y recogida de los extractos también adquiridos a Waters (EEUU).

2.2 Muestreo

Las muestras fueron tomadas de diversos puntos de aguas superficiales de la provincia de Sevilla. Dos de ellos estaban situados en la cuenca del río Rivera de Huelva, y otro en la cuenca del río Guadiamar. Ambos puntos están afectados por la actividad humana y la agricultura mayoritariamente, asimismo cerca de puntos de descarga de plantas depuradoras de agua. Se tomaron 6 muestras de cada punto, que fueron recogidas aproximadamente en la zona medial del cauce del río y a una profundidad superficial en botellas de vidrio de 2,5 L limpiadas previamente con acetona y metanol, y transportadas a 4°C para más tarde ser almacenadas a -20°C hasta su manipulación y análisis. Las

muestras fueron tomadas desde noviembre de 2014 hasta octubre de 2015 en 3 salidas en diferentes días.

También se obtuvieron muestras de agua residual de una WWTP en Granada, una vez obtenidas, también se refrigeraron y se mantuvo la cadena de frío hasta su análisis en Sevilla. Las muestras fueron tomadas en abril de 2019.

2.3 Tratamiento de la muestra

Las muestras fueron filtradas en dos fases. Primeramente, se usó un filtro de 2 μm de tamaño de poro (Albet Labscience, Dassel, Germany) y en segundo lugar una filtración con filtros de tamaño de poro de 1,2 μm (Scharlau, Barcelona, Spain). La extracción en fase sólida se realizó a continuación (se explican brevemente las etapas en el apartado 3.2 Optimización de la extracción en fase sólida).

En la primera fase de acondicionamiento se utilizaron 3 mL de acetona, 3 mL de metanol y 3 mL de agua de grado HPLC en fases sucesivas. 250 mL de las muestras filtradas se les hizo pasar por los cartuchos usando un sistema de vacío utilizando un flujo de aproximadamente 10 ml min^{-1} . Para la fase de clean up o limpieza se usaron 3 mL de una mezcla de metanol:agua (5:95 v/v), con el objetivo de eliminar las posibles interferencias que hubiera en el cartucho. Para la fase final de elución de los analitos se usaron 3 alícuotas de 1 mL de acetona en fases sucesivas (3 mL en total) recogidos en tubos de ensayo. Estos fueron llevados a sequedad, usándose para ello una corriente de nitrógeno a 60°C (Figura 3). Los extractos fueron redissueltos en 75 μl de metanol en el mismo tubo de ensayo, estos fueron agitados en vortex durante 10-15 segundos y llevados a un sistema de ultrasonidos durante 10-15 minutos. Se repitió la misma operación añadiendo 75 μl de agua de grado HPLC, para obtener finalmente los analitos en una mezcla de 150 μl de metanol:agua (50:50 v/v). Por último, la fase final de microfiltración se llevó a cabo con filtro de 0,22 μm de diámetro de poro para introducirlos en los viales adecuados para la posterior determinación en el sistema de LC-MS/MS (Figura 4).

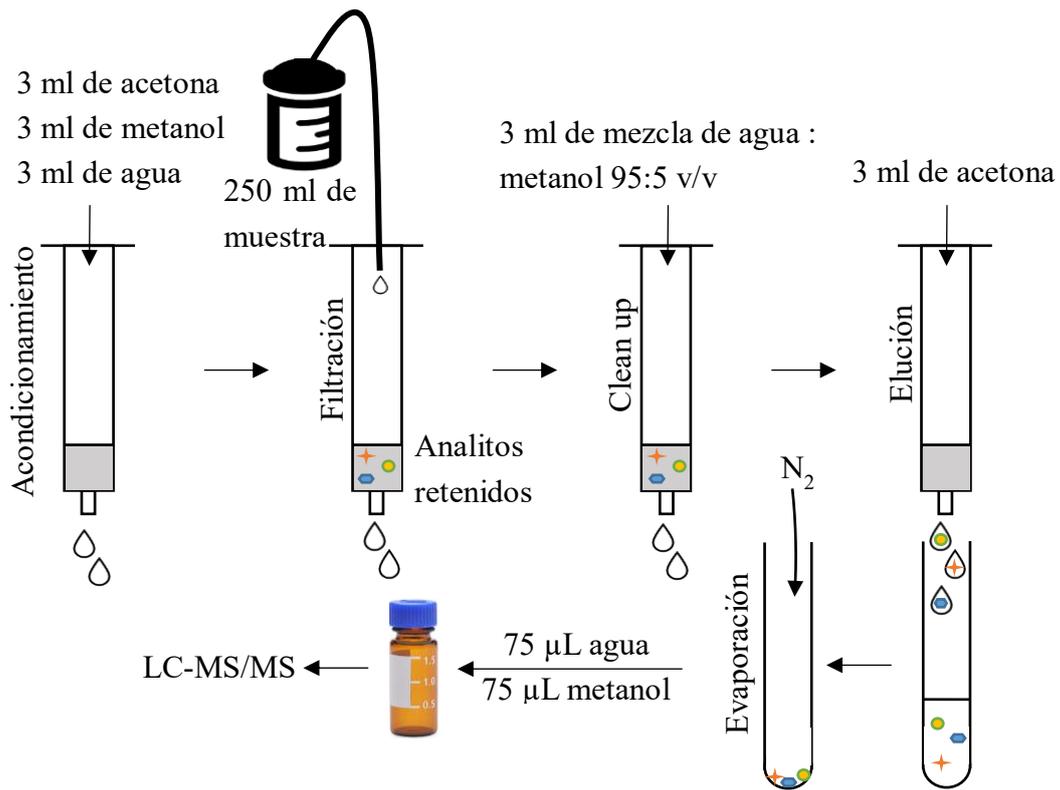


Figura 3. Procedimiento de SPE con las fases de acondicionamiento, filtración y elución, seguido de la evaporación con corriente de nitrógeno y reconstitución.

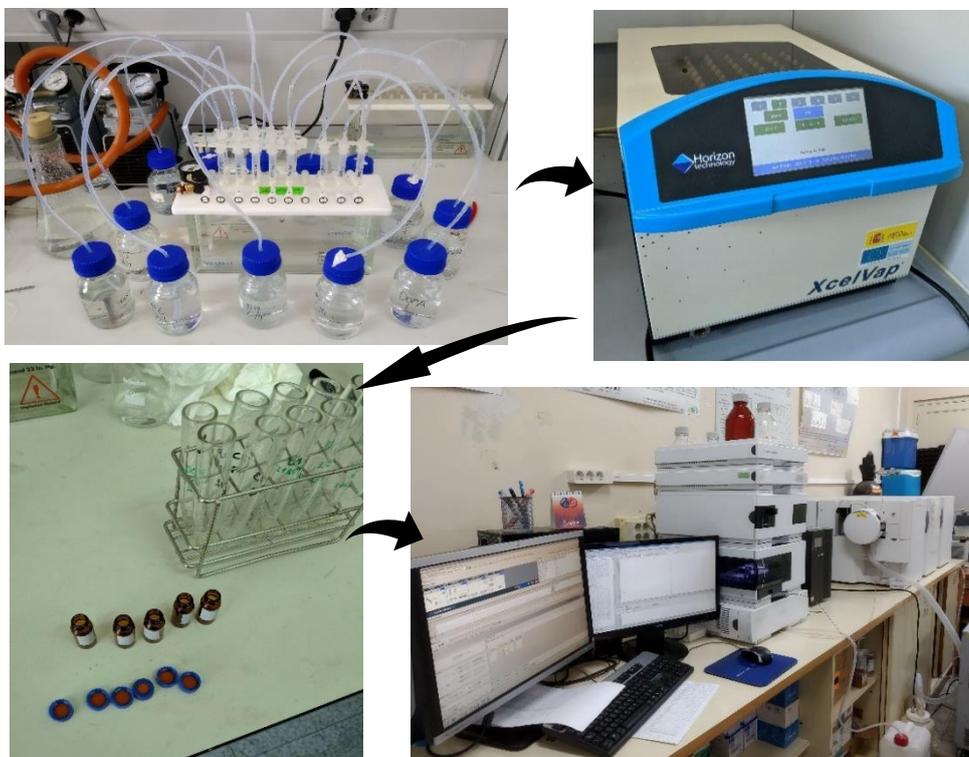


Figura 4. El sentido de las flechas indica los pasos del procedimiento: sistema de SPE aplicado a las muestras, equipo de evaporación con corriente de nitrógeno, preparación de los viales tras la evaporación y equipo de LC-MS/MS.

2.4 Análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La medida como se ha mencionado anteriormente se realizó en un sistema de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

Para la fase cromatográfica se usó un sistema Agilent 1200 series (Agilent, Santa Clara CA, USA). Este sistema cuenta con un desgasificador, para eliminar los posibles gases disueltos en la fase móvil, un sistema de bombas para controlar el flujo de fase móvil que se introduce en la columna, una bandeja con 99 posiciones para depositar los viales, cuya introducción al equipo es automática y un compartimento para la columna cuya temperatura está controlada. La columna usada en la separación de los compuestos fue una HALO C18 (50 x 4,6 mm d.i.; 2.7 μm) (Teknokroma, Barcelona, España) con una precolumna también HALO C18 (5 x 4.6 mm d.i.; 2.7 μm) (Teknokroma). El volumen de inyección fue de 20 μl y el flujo se mantuvo constante en 0,6 mL min^{-1} . La fase móvil usada para la fase orgánica (solvente A) fue metanol y para la fase acuosa (solvente B) una disolución de 10 mM de acetato amónico en agua de grado HPLC. El gradiente de elución fue el siguiente: 0,0-2,0 minutos: 15 % \rightarrow 55 % de A. 2,0-8,0 minutos: 55 % \rightarrow 90 % de A. 8,0-10,0 minutos: isocrático de A a 90 %. 10,0-13,0 minutos: 90 % \rightarrow 15 % de A. 13,0-15,0 minutos: isocrático de A a 15 %. El tiempo total de inyección fueron 15 minutos y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 35°C.

En el sistema LC-MS/MS, el equipo de espectrómetro de masas es un equipo Agilent 5410 QqQ (Agilent) con una fuente de ionización de electrospray (ESI en sus siglas en inglés), con funcionamiento tanto en el modo positivo como el modo negativo. Los parámetros de funcionamiento fueron: voltaje del capilar: 3000 V, flujo del gas de 9 L min^{-1} , temperatura del gas 350°C y presión del nebulizador 40 psi. El equipo fue utilizado en el modo de monitorización de reacción múltiple (Multiple reaction monitoring, o MRM en sus siglas en inglés), en el que se utilizan las dos transiciones más abundantes de cada ion proveniente de la molécula estudiada.

La cuantificación fue llevada a cabo gracias al uso de una recta de calibrado en matriz usando niveles de concentración esperados en las muestras. En esta recta se representa la

relación entre la señal del analito en la muestra y la señal del patrón interno frente a la concentración del analito, usando una regresión lineal.

2.5 Validación de la metodología analítica

El efecto matriz fue evaluado para ver si tenía influencia en la medida. Para ello se prepararon dos rectas de calibrado, una en disolvente (mezcla metanol:agua 50:50 v/v) y otra en matriz (preparada sobre una muestra de agua superficial independiente que no contenía los analitos). 8 niveles de concentración fueron preparados (por triplicado en la recta matriz). En el eje Y se representó la abundancia o área de los picos de los compuestos entre el área de los picos de sus correspondientes patrones internos en el caso de la recta en disolvente y matriz, mientras que en el eje X se representó la concentración del analito, salvo con la metaflumizona, que se representó la señal con respecto a la concentración, debido a que no se encontró un patrón interno adecuado. Se compararon las pendientes de las rectas utilizando herramientas estadísticas (test de *t* de Student). Los resultados están en el apartado 3.3.3 de Resultados y Discusión.

Para evaluar la linealidad y la idoneidad de dichas rectas de calibración, de 8 puntos a concentraciones de entre 0,01 y 1000 ng L⁻¹, se utilizó la regresión lineal, utilizando el coeficiente de correlación (r^2) como factor determinante para la evaluación.

La especificidad del método fue estudiada comparando los cromatogramas resultantes de muestras dopadas con sus respectivos blancos.

Para la evaluación de la exactitud se llevó a cabo evaluando las recuperaciones de las muestras dopadas, (debido a la ausencia de materiales certificados) es decir, añadir una cantidad conocida de analito a muestras con la matriz evaluada. Las muestras fueron dopadas a 3 niveles de concentración (30, 300 y 750 ng L⁻¹ para los estrógenos y 1.5, 15 y 37.5 ng L⁻¹ para el resto de los compuestos) por triplicado en la recta de calibrado en matriz. Además, se usó una muestra de agua sin dopar para actuar como blanco.

En cuanto a la evaluación de la precisión, se trabajó con los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad. Repetibilidad se refiere a que se realizaron las medidas de las muestras

dopadas por triplicado en el mismo día, con el mismo equipo y el mismo analista. Reproducibilidad se refiere a que se realizaron las medidas también durante 6 días diferentes. Los resultados se muestran en el apartado 3.3.5 de Resultados y Discusión.

La sensibilidad fue evaluada teniendo en cuenta que los picos cromatográficos con una señal/ruido por encima de 3 corresponden al límite de detección instrumental y que los picos con una señal/ruido por encima de 10 corresponden al límite de cuantificación instrumental. Aplicando los factores de preconcentración y recuperación se pudieron obtener los valores de los límites de detección y cuantificación del método.

2.6 Control de calidad

Se utilizó un protocolo interno de calidad en el que una muestra de cada tanda de muestras se dividió en 4 submuestras. 3 de ellas fueron dopadas con los CEPs correspondientes y usadas para los cálculos de las recuperaciones. De modo que cada tanda de muestras contenía las muestras, los niveles de concentración de la recta de calibrado en matriz, muestras dopadas y un blanco. Esta última siempre era medida antes y después de la recta de calibrado en matriz y cada 5 muestras de agua.

3. Resultados y discusión

La optimización de la metodología aplicada al análisis de CEPs en muestras de aguas se realizó en las dos etapas fundamentales en las que se divide el procedimiento analítico: determinación cromatográfica y tratamiento de la muestra mediante la extracción de los analitos de la matriz y preconcentración de los analitos.

3.1 Optimización de la separación cromatográfica.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas se actuó sobre las tres variables fundamentales para conseguir una buena resolución de los picos con una sensibilidad y selectividad adecuadas: la columna analítica, la composición de la fase móvil y las

condiciones de detección. La última variable se relaciona con los parámetros del espectrómetro de masas, explicados a continuación. Cuando una molécula entra en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con un ESI, lo que sucede es que esta molécula se ioniza, pasando a llamarse ion precursor, normalmente perdiendo un protón o ganándolo, adquiriendo carga negativa o positiva, en función del modo de ionización elegido, positivo o negativo.

En el primer cuadrupolo estos iones son filtrados por su masa, mejorando la sensibilidad, ya que los iones que no superen la masa límite previamente establecida son descartados. Después los iones entran en la cámara de colisión donde aplicando una serie de voltajes determinados, estos iones son fragmentados en diferentes iones productos o iones hijos o también llamados transiciones. El segundo cuadrupolo sirve también de filtro de masas de iones que no cumplen las características adecuadas, como iones hijos de muy pequeña masa. Por último, las señales de estos iones hijos son detectadas en detector, amplificadas y mostradas en el programa. Son estos parámetros (ionización, voltajes aplicados...) los que se deben de optimizar en esta etapa.

Para ello se prepararon viales conteniendo 1 mg L^{-1} de cada compuesto. A continuación, el programa Optimizer (Agilent) del propio equipo, es el que va probando automáticamente diferentes combinaciones de parámetros para obtener la mayor abundancia posible en las diferentes transiciones. Se prepararon distintas fases móviles para observar los posibles cambios en los parámetros de ionización y fragmentación de los compuestos. Las fases móviles constan de una fase acuosa y una fase orgánica, y las testadas en este experimento fueron: agua con 0,1 % de ácido fórmico y metanol con 0,1 % de ácido fórmico; agua con 10 mM de acetato amónico y metanol; agua con 10 mM de formiato amónico y con 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico. Aun probando distintas fases móviles, los resultados para muchos compuestos fueron prácticamente los mismos, ya que la manera de ionizarse y fragmentarse es similar. Pero no en todos, por ello se escogieron los datos obtenidos de la fase móvil de acetato amónico y metanol, ya que era la solución de compromiso más adecuada en la que las hormonas

tenían cierta fragmentación en el modo negativo al ser una fase móvil sin carácter ácido, al contrario de las demás testadas, donde se degradaban estos compuestos.

Los parámetros optimizados obtenidos de fragmentor y energías de colisión son los utilizados por el espectrómetro para obtener las transiciones más abundantes cada uno de compuestos (Tabla 2). De todas las transiciones que proporciona el programa, solamente se seleccionaron las dos con mayor abundancia para la posterior determinación, que son el MRM1 y el MRM 2, siendo el MRM1 normalmente la transición con más abundancia para una mayor sensibilidad en la cuantificación. La segunda transición o MRM2 es la transición que permite la confirmación de que un pico con una masa molecular determinada es realmente el compuesto que se está midiendo. En la figura 5 se presenta un ejemplo de lo anterior con la metaflumizona, uno de los compuestos a determinar.

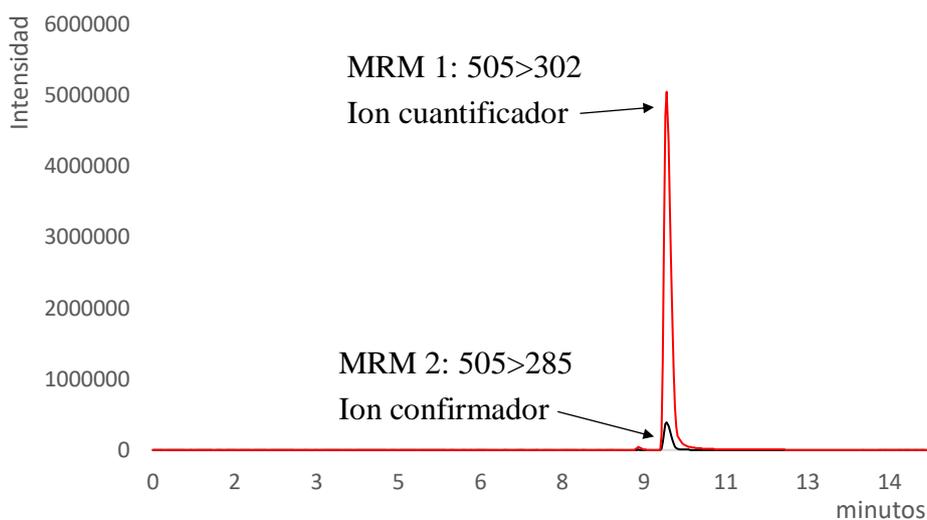


Figura 5. Cromatograma del compuesto metaflumizona en el equipo LC-MS/MS. Línea roja: MRM1 505>302, que actúa como cuantificador; línea negra: MRM2 505>285 que actúa como identificador.

Una vez tenidos en cuenta los parámetros espectrométricos, había que averiguar los factores cromatográficos, para ello 2 columnas cromatográficas fueron probadas: HALO C18 (50 x 4,6 mm de diámetro interno; 2,7 μm de tamaño de partícula) (Teknokroma) y Zobrax Eclipse XDB-C18 (50 x 4,6 mm d.i.; 1,8 μm de tamaño de partícula) (Agilent Technologies). Ambas columnas son columnas de fase reversa, siendo los analitos retenidos en el relleno de la columna hasta eluirse a un determinado tiempo de retención,

siendo este mayor para moléculas apolares, y menor para moléculas polares. Aunque ambas columnas ofrecían aproximadamente los mismos resultados, la columna HALO C18 fue elegida con respecto a la Zorbax para los experimentos siguientes por presentar una mayor capacidad de separación, permitiendo tener unos picos más resueltos para su posterior cuantificación, así como un menor tiempo de análisis.

La composición de la fase móvil fue estudiada ya que influye enormemente en el desempeño de la separación cromatográfica, en concreto en la sensibilidad y selectividad del método. En cuanto a la fase acuosa, la adición de diferentes sales y ácidos fue estudiada, con los parámetros obtenidos en la etapa de optimización espectrométrica, pero esta vez con la columna elegida. En esta etapa se tuvo que llegar a una solución desde el punto de vista práctico. La fase móvil de acetato y metanol fue la utilizada para los experimentos siguientes debido a que la sensibilidad, separación y forma de los picos eran bastante adecuadas, también en el caso de las hormonas. En contraposición, uno de los compuestos, el ciprofloxacino, no mostraba pico cromatográfico, debido a que la fragmentación de este antimicrobiano es mayor cuando la fase móvil tiene un carácter ácido marcado, como en las otras fases móviles, pero no en la de acetato. Es por ello por lo que se tuvo que llegar a una solución de compromiso, en la que se pudiesen medir la hormonas, pero a costa de no incluir al ciprofloxacino en la metodología, de manera que finalmente no se incluyó este compuesto en la determinación. Desde un punto de vista práctico, se obtenía un método en el que no se podía medir el ciprofloxacino, pero a costa de cuantificar las hormonas, que son 3 compuestos y sus riesgos ecotoxicológicos como disruptores endocrinos son bastante importantes. El gradiente de elución optimizado se encuentra descrito en el apartado 2.4 de Materiales y métodos.

También el volumen de inyección fue estudiado, de 2,5 a 20 μL , escogiéndose 20 μL como volumen de inyección al mantener un nivel adecuado de resolución y sensibilidad. Por otro lado, la temperatura de la columna fue modificada de 30°C a 50°C para estudiar su efecto. Al no suponer importantes beneficios, se decidió mantener la temperatura constante a 35°C, para evitar también los posibles efectos de la temperatura ambiente en

la determinación. La tabla 2 recoge los parámetros óptimos utilizados para la correcta separación de los analitos. La figura 6 muestra un cromatograma donde se observa la separación conseguida de los CEPs estudiados en una mezcla patrón de 1000 ng L⁻¹.

Tabla 2. Parámetros espectrométricos del análisis de los compuestos en la lista de observación. *t_R*: tiempo de retención, *MRM1* y *MRM2*: primera y segunda transición, *F*: fragmentor, *EC*: energía de colisión.

Compuesto	Patrón interno	Modo de ionización	<i>t_R</i> (min)	MRM1	MRM2	Ion ratio	F (V)	EC (V)
Estrógenos								
17 α -Ethinilestradiol	Bisfenol A-d ₁₆	Negativo	7,11	295>145	295>269	79,6	120	40/36
17 β -Estradiol	Bisfenol A-d ₁₆	Negativo	7,20	271>145	271>183	37,7	140	40/40
Estrona	Bisfenol A-d ₁₆	Negativo	7,28	269>145	269>159	56,0	140	40/36
Compuestos farmacéuticos								
Amoxicilina	Amoxicilina-d ₄	Positivo	1,50	366>114	366>349	99,0	60	16/0
Azitromicina	Eritromicina- ¹³ C ₂	Positivo	7,90	749>591	749>116	87,6	140	32/40
Claritromicina	Eritromicina- ¹³ C ₂	Positivo	7,82	748>158	748>590	45,8	140	28/16
Eritromicina	Eritromicina- ¹³ C ₂	Positivo	7,01	734>158	734/576	77,0	140	28/24
Pesticidas								
Acetamiprid	Imidacloprid-d ₄	Positivo	4,50	223>126	223>56	50,1	80	20/12
Clotianidina	Imidacloprid-d ₄	Positivo	4,26	250>169	250>132	80,3	60	12/116
Imidacloprid	Imidacloprid-d ₄	Positivo	4,21	256>209	256>175	67,9	60	12/20
Metiocarb	Imidacloprid-d ₄	Positivo	7,28	226>121	226>169	96,8	60	16/4
Tiacloprid	Imidacloprid-d ₄	Positivo	4,76	253>126	253>90	24,5	120	24/40
Tiametoxam	Imidacloprid-d ₄	Positivo	3,69	292>211	292>181	2,60	60	8/24
Metaflumizona	-	Negativo	9,90	505>302	505>285	100	100	12/40

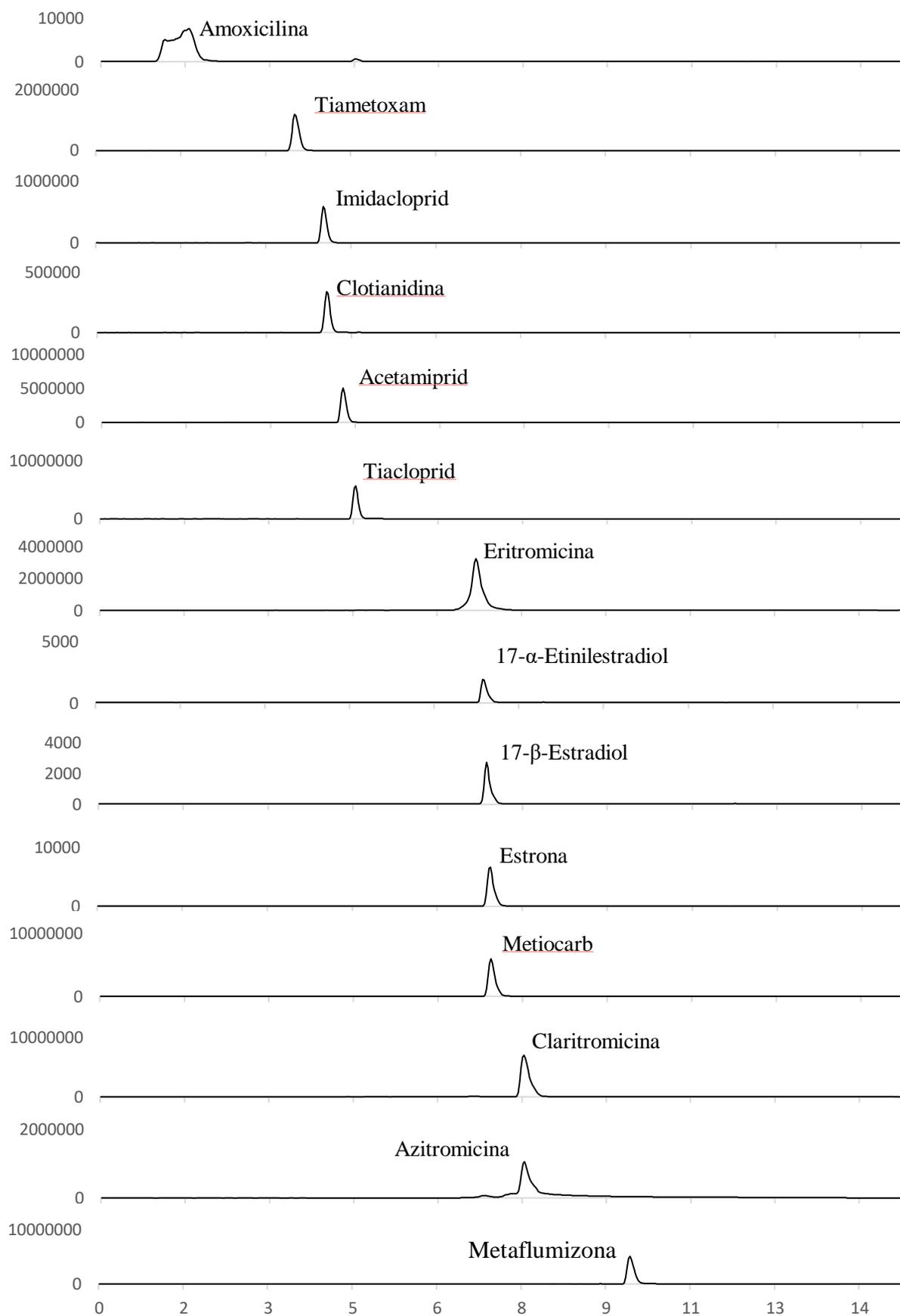


Figura 6. Cromatograma de una mezcla de patrones de cada compuesto a 1000 ng L^{-1} utilizando la columna HALO C18.

3.2 Optimización de la extracción en fase sólida

Este proceso es un proceso preparativo de muestras para su preconcentración y “limpieza”, ya que permite desechar los posibles interferentes de la muestra y tener un extracto donde solo estén presentes los analitos de interés. Tiene esa denominación por la presencia de un soporte sólido donde se encuentra en material adsorbente, en este caso C18 funcionalizado, que permite adsorber nuestros compuestos de interés. Este material se presenta normalmente en forma de cartucho, por el que se hace pasar la muestra, en este caso, acuosa. El proceso consta de cuatro etapas: acondicionamiento, en la que se activan los grupos funcionales del material adsorbente; Carga de la muestra: se hace pasar la muestra por el cartucho, quedando retenidos los analitos; Clean up o limpieza: se hace pasar un disolvente para eliminar posibles interferencias retenidas en el cartucho; Elución: con disolventes adecuados los analitos son separados de la matriz y recogidos en un tubo de ensayo.

Para la optimización de este proceso completo, 2 factores se consideraron de especial importancia, en primer lugar, el solvente utilizado para la elución y en segundo lugar el pH de la muestra. La optimización de cada parámetro se llevó a cabo variando ese parámetro, pero manteniendo los demás constantes (volumen de la muestra, flujo continuo de muestra por el cartucho, tipo de cartucho...). Para la optimización, alícuotas de 1 L de agua Milli-Q y fueron dopadas por triplicado con los compuestos objetivo a una concentración de 30 ng L⁻¹. En primer lugar, se optimizaron los solventes (se utilizaron metanol y acetona), 3 alícuotas de 1 mL del solvente en cuestión y después el pH (se estudiaron pH 2 y 7).

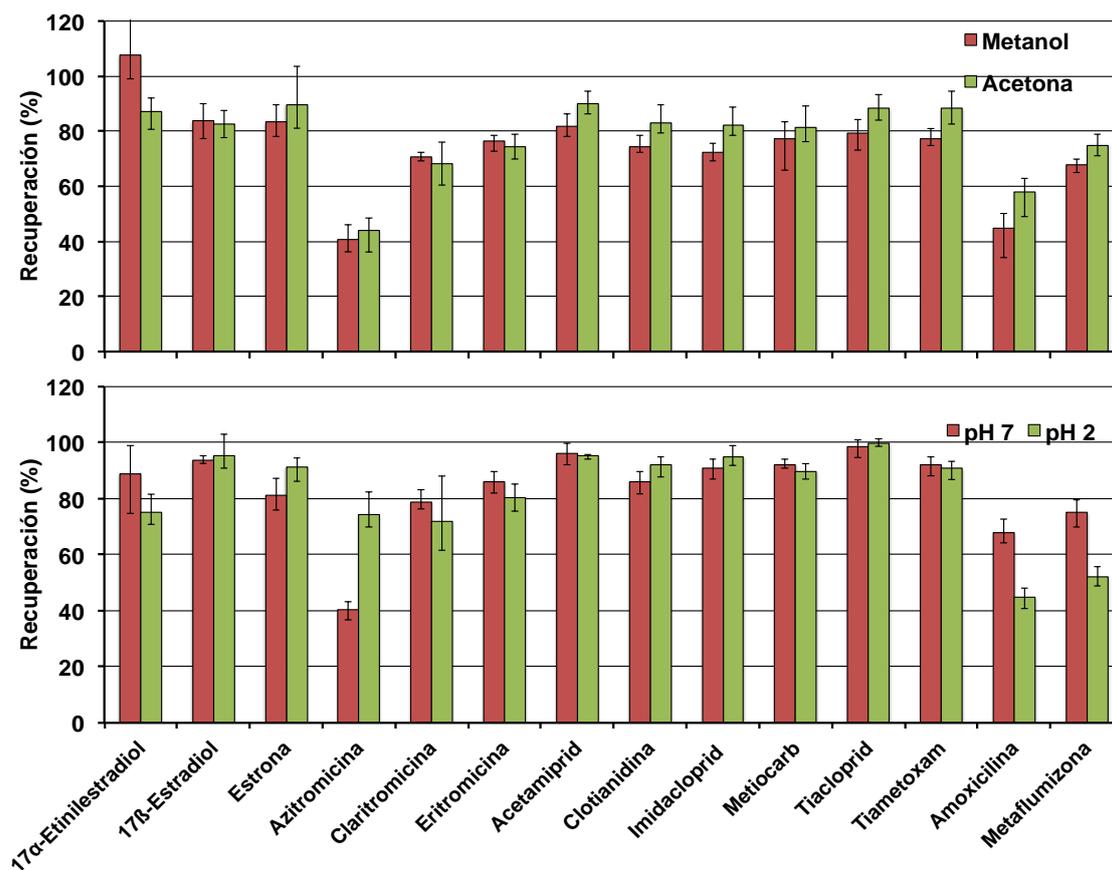


Figura 7. Arriba: resultado de las recuperaciones utilizando metanol y acetona como eluyentes. Abajo: resultado de las recuperaciones utilizando pH neutro o pH ácido.

Las recuperaciones obtenidas en los parámetros estudiados se aprecian en la figura 7, donde los resultados entre la acetona y el metanol eran similares, aunque se escogió los 3 mL de acetona debido que permitía unas recuperaciones ligeramente superiores y a su mayor volatibilidad a la hora de la evaporación, por tanto, más rapidez. Una vez escogido el disolvente de elución, los resultados en cuanto al pH se mantenían también similares, salvo en el caso de la azitromicina, de modo que finalmente en SPE se utilizarían 3 alícuotas de 1 mL de acetona como eluyente y a pH neutro. Un esquema del proceso es mostrado en la figura 3.

3.3 Validación del método

3.3.1 Sensibilidad

Se define como la capacidad de un método analítico de detectar o determinar la menor concentración posible del analito contenido en la muestra. De esta manera se habla de

límite de detección: Concentración o cantidad más pequeña del analito que el método analítico es capaz de detectar con certeza, y límite de cuantificación: Concentración o cantidad más pequeña del analito que el método analítico es capaz de determinar con una exactitud y precisión razonables.

Su determinación está descrita en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos.

Los LDM y LCM obtenidos están en concordancia con los propuestos por la Decisión 2018/840/EC (European Commission, 2018), estando por debajo de ellos, de manera que la metodología cumple con ese requisito. Pero no en todos los compuestos, las hormonas en la metodología mostrada tenían unos LDM mayores que los propuestos. Esto puede ser debido a que las hormonas en las concentraciones más bajas tienen un nivel de ruido bastante elevado lo que dificulta la identificación de los picos y, por ende, es necesario llegar a concentraciones más altas para discernir un pico con una señal/ruido mayor de 3.

3.3.2 Linealidad

Se define como la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en un intervalo determinado. Como se comentó anteriormente, para evaluar la linealidad se prepararon rectas de calibración (calibrado en matriz) de 8 puntos a concentraciones de entre 0,01 y 1000 ng L⁻¹ evaluando el parámetro de calidad en este caso, el coeficiente de correlación (r^2), obteniéndose valores igual o por encima de 0,993 en todos los CEPs, lo que indica que las rectas de calibrado utilizadas para la determinación obedecían la regresión lineal en el intervalo de concentraciones seleccionado.

3.3.3 Efecto matriz

Asimismo, se estudió el efecto matriz en el agua superficial, esto es, la capacidad que tienen los elementos de una muestra que no son el analito en interferir en la medida de este, de manera que la sensibilidad del método se verá muy afectada. Para estudiar este efecto se compararon las dos rectas de calibración mencionadas en el apartado 2.5 de

Materiales y Métodos: una recta de calibración en disolvente y una recta de calibrado en matriz.

Para comparar dichas rectas se utilizó la prueba estadística t de Student. En esta herramienta se comparan la t calculada comparando la dos rectas y la t tabulada, con unos valores de libertad y un porcentaje de nivel de confianza determinado. Usualmente en la validación de métodos analíticos se usan un valor de libertad $k=2$ y un porcentaje de nivel de confianza del 95 % (Gustavo González & Ángeles Herrador, 2007). Cuando la $t < k$ significa que las curvas son similares, no presentando diferencias significativas, al contrario de cuando la $t > k$, implicando diferencias entre las dos rectas. Aplicando este test sobre las rectas para cada compuesto, se demostraron diferencias significativas en varios compuestos, siendo necesario el uso de la recta de calibrado en matriz para la

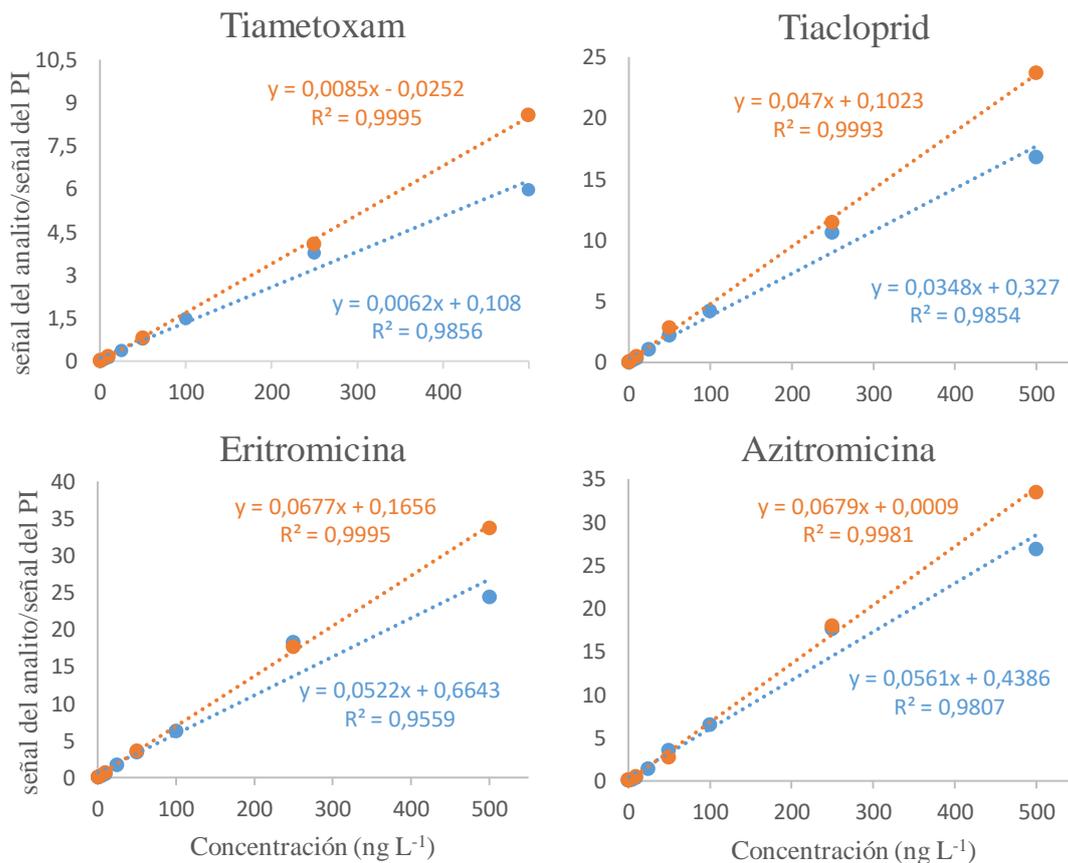


Figura 8. Representación gráfica de las diferencias significativas entre las rectas de calibrado de tres compuestos de la lista de observación. En naranja se muestran las rectas en matriz y en azul se muestran las rectas en disolvente. PI: patrón interno.

determinación, en vez de las rectas en disolvente, como se puede observar en los ejemplos de la figura 8.

3.3.4 Exactitud

La exactitud se define como la capacidad de un método analítico de expresar un valor promedio obtenido tras aplicar el análisis un número de veces y que sea lo más cercano posible al valor considerado como verdadero.

Dicho valor verdadero puede saberse a través de material de referencia certificados, por comparación con métodos analíticos de referencia o través de ensayos de recuperación. Habitualmente en química analítica la exactitud se determina de la última forma, ya que no existen materiales de referencia para todos los compuestos o son muy caros y en este caso no existe un método estandarizado para esta nueva lista de compuestos. Tras la medida de las muestras dopadas según el apartado 2.5 de Materiales y Métodos, para calcular la recuperación se utilizó una fórmula matemática que relaciona la diferencia de área entre la muestra dopada (A_{dopado}) y muestra blanco (A_{blanco}) y el área del patrón correspondiente ($A_{patrón}$):

$$\%Recuperación = \frac{A_{dopado} - A_{blanco}}{A_{patrón}} \times 100$$

Las recuperaciones representadas en la tabla 3 son las medias entre los 3 niveles de concentración para cada compuesto. Se encontraron en el rango de 65 – 110 %, valores aceptables según la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos).

3.3.5 Precisión

La precisión permite saber el grado de concordancia entre los resultados de una serie de ensayos independientes en condiciones similares para un mismo método analítico. Se expresa en desviación estándar relativa (RSD %).

La precisión fue asegurada con unos valores por debajo del 20 % en todos los niveles de concentración, valores tolerables por la AOAC, tras los ensayos descritos en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la tabla 3.

La especificidad fue confirmada comprobando que ninguna interferencia en la determinación existía mediante la comparación de los cromatogramas de las muestras blanco y las muestras dopadas.

Tabla 3. Resultados de los valores de exactitud y precisión del método desarrollado. r^2 : coeficiente de determinación LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método; LDM máximo 2018/840/EC: límite de detección máximo dictado por la Decisión 2018/840/EC.

Compuestos	Recuperación (%)	Precisión (%)	r^2	LDM (ng L⁻¹)	LCM (ng L⁻¹)	LDM máximo 2018/840/EC
Hormonas						
17 α -Ethinilestradiol	102	5,3	0,998	5,66	18,9	0,035
17 β -Estradiol	109	7,6	0,998	5,36	17,9	0,4
Estrona	98,7	10	0,995	1,92	3,85	0,4
Compuestos farmacológicamente activos						
Azitromicina	105	9,1	0,994	0,07	0,14	19
Amoxicilina	70,0	8,3	0,988	3,06	9,18	78
Claritromicina	78,3	9,2	0,993	0,12	0,43	19
Eritromicina	87,0	6,1	0,993	0,08	0,32	19
Pesticidas						
Acetamiprid	89,7	9,6	0,999	0,11	1,50	8,3
Clotianidina	103	9,1	0,997	0,08	1,49	8,3
Imidacloprid	110	13	0,998	1,28	12,8	8,3
Metaflumizona	65,0	12	0,999	0,01	0,02	65
Metiocarb	95,3	9,9	0,997	0,10	0,38	2
Tiacloprid	105	8,1	0,998	0,08	0,30	8,3
Tiametoxam	97,3	6,9	0,998	0,09	1,33	8,3

Todo ello aseguraba que el método cumplía con las principales propiedades analíticas asegurando que la sensibilidad y la selectividad de la metodología eran conseguidas gracias a que los parámetros tanto de la extracción, cromatográficos y espectrométricos fueron los más óptimos posibles.

A pesar del largo número de publicaciones que miden estos CEPs, entre otros compuestos, este parece ser el primero que determina exclusivamente los compuestos incluidos en la última normativa establecida por la Comisión Europea (European Commission, 2018),

actualizando trabajos anteriores (Malvar et al., 2018). Esta metodología permite determinar este grupo de compuestos usando un solo procedimiento de preparación para muestras de agua con buenas recuperaciones y en una inyección cromatográfica con adecuados parámetros analíticos, siendo útil en análisis rutinarios de muestras de agua superficiales.

Comparando los parámetros analíticos obtenidos con los propuestos por la Comisión en la Decisión 2018/840 (European Commission, 2018), como se comentó anteriormente, encontramos que los límites de detección son iguales o menores a los propuestos, excepto por los de las hormonas (5,66 ng L⁻¹ para el 17 α -etinilestradiol, 5,36 ng L⁻¹ para el 17 β -estradiol y 1,92 ng L⁻¹ para la estrona) siendo mayores que los límites propuestos en la lista de observación de 2018 (0.035 ng L⁻¹ para el 17 α -etinilestradiol, 0.4 ng L⁻¹ para el 17 β -estradiol y la estrona). Solamente metodologías específicas para hormonas son capaces de llegar a esos límites de detección (Arismendi et al., 2019; González et al., 2019; Gusmaroli et al., 2018; Kuch & Ballschmiter, 2001; Mnguni et al., 2018). Al tener que llegar a una solución de compromiso (método de extracción, composición de fase móvil...) y ser compuestos de distintas características, es bastante complejo el mantener un nivel de detección bajo para estas hormonas.

3.4 Aplicación de la metodología desarrollada en muestras de agua

En la siguiente tabla se exponen las concentraciones de los CEPs incluidos en la lista de observación utilizando la metodología aplicada:

Tabla 4. Rango de concentraciones de los compuestos en muestras de agua. ASp: muestras de agua superficial; AR: muestra de agua residual; LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método. Concentraciones en ng L⁻¹.

Compuesto	ASp1	ASp2	ASp3	AR1	AR2	AR3
Hormonas						
17 α -Ethinilestradiol	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	<LDM	<LDM
17 β -Estradiol	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	<LDM
Estrona	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	<LDM
Antibióticos						
Amoxicilina	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Azitromicina	<LCM-14,5	0,92-10,8	0,33-9,61	5,69	8,97	31,4
Claritromicina	<LDM-0,52	<LCM-0,55	<LCM-2,15	8,48	12,9	9,09
Eritromicina	<LDM	<LDM	<LDM	7,99	11,5	3,09
Pesticidas						
Acetamiprid	<LDM	<LDM	<LDM	1,52	8,94	2,03
Clotianidina	<LDM	<LDM-40.9	<LDM	<LDM	57,5	<LDM
Imidacloprid	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	38,6	<LCM
Metiocarb	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	0,92	<LDM
Tiacloprid	<LDM	<LDM	<LDM	0,63	11,0	0,64
Tiametoxam	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	43,8	<LCM
Metaflumizona	<LDM	<LDM	<LDM	2,22	<LCM	<LCM

Observando los datos podemos apreciar que la presencia algunos CEPs es evidente en las muestras, tanto en aguas superficiales como en aguas residuales de una planta depuradora. Llama la atención que en algunas muestras de agua superficial se llegan a cuantificar en mayor cantidad azitromicina que en las muestras de agua residual, aunque bien es cierto que no tendría que haber una relación entre ambos tipos de muestra puesto que son de sitios geográficos totalmente distintos, donde tanto el consumo de estos antibióticos como su presencia final en las masas de agua puede ser distinto entre ambas zonas. Otra explicación posible puede ser que en la WWTP se utilicen sistemas de alta tecnología de eliminación de contaminantes. Por otro lado, se puede observar también como la cuantificación de los pesticidas es mayor en las muestras de agua residual, detectándose solamente clotianidina en una de las muestras de agua superficial. Aunque no sean comparables los dos tipos de muestra, el hecho de que se detecten pesticidas en las aguas

residuales y no en las superficiales indica que en las plantas de tratamiento se elimina en cierta medida algunos compuestos neonicotinoides.

También se puede observar que ni las hormonas ni la amoxicilina se han detectado en las muestras, aun siendo fármacos y hormonas muy presentes en la población.

3.5 Presencia de los CEPs en otros países

Se realizó un estudio comparativo de la distribución de los CEPs en distintos países y distintas matrices, aguas superficiales, residuales y subterráneas. En general, estos contaminantes se podrían llegar a encontrar en cualquier matriz, aunque hay datos destacables. En el caso de los antibióticos, que como en el caso de las muestras analizadas, se encuentran en gran medida en todo tipo de matrices acuosas, llegándose a detectar a unas concentraciones bastante elevadas, del orden de miles de ng L^{-1} , de azitromicina, ciprofloxacino o claritromicina (Rossmann et al., 2014). Con respecto a las hormonas, también ha sido posible cuantificar su presencia, pero en menor medida, y como se comentó anteriormente, a menudo con metodologías desarrolladas para ese tipo de compuestos orgánicos. En lo que respecta a los pesticidas, se pueden encontrar rangos de concentración de lo más diverso, siendo el imidacloprid el más analizado si bien es el pesticida más conocido de dicho grupo. Cabe destacar que no ha sido posible encontrar en las bases de datos científicas datos de presencia de la metaflumizona en matrices acuosas, aun siendo desarrollado en 2007 (Takagi et al., 2007), hace relativamente poco tiempo, pero muy utilizado hoy en día.

Tabla 5. Distribución de los CEPs de la Decisión 2018/840 en diferentes países del mundo en distintas matrices acuosas. AR: Agua residual; ASp: Agua superficial; ASb: Agua subterránea. Concentraciones en ng L⁻¹.

Compuesto	AR	ASp	ASb	País	Referencia
Hormonas					
17 α - Ethinilestradiol	10-95 77,7 584-776	1-4 1,2-6 0,85-6,55	102-230	Polonia, Sudáfrica, Singapur, Portugal, China, EEUU	Hu, Zhang, & Yang, 2008; Karnjanapiboonwong et al., 2011; Manickum & John, 2014; Nie et al., 2012; Ribeiro et al., 2015; Woźniak et al., 2014
17 β -Estradiol	20-199 7,7	0,7-23,3 2,26	12-147	Polonia, Sudáfrica, Singapur, China, EEUU	Hu et al., 2008; Karnjanapiboonwong et al., 2011; Manickum & John, 2014; Nie et al., 2012; Woźniak et al., 2014
Estrona	13-351 51,7	0,9-5 0,32	62-79	Polonia, Sudáfrica, Singapur, China, EEUU	Hu et al., 2008; Karnjanapiboonwong et al., 2011; Manickum & John, 2014; Nie et al., 2012; Woźniak et al., 2014
Antibióticos					
Amoxicilina	2038 <LCM-1270 <LDM-258	28 <LCM-68	<LDM-5	Alemania, Egipto, Francia, España	Abou-Elwafa Abdallah et al., 2019; Gros et al., 2013; Rodríguez-Navas et al., 2013; Rossmann et al., 2014; Tuc Dinh et al., 2011
Azitromicina	50-956 343-676 <LDM-592	<LDM- 90,8	<LDM-1620	Alemania, Portugal, España, Vietnam	Gros et al., 2013; Hoa et al., 2011; López-Serna et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Rossmann et al., 2014
Ciprofloxacino	19-1570 <LDM-641 <LDM-613	<LCM-135	<LDM-443	Alemania, Portugal, Francia, República Checa, España	Gros et al., 2013; López-Serna et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Rossmann et al., 2014; Tuc Dinh et al., 2011; Tylová et al., 2013

Claritromicina	18-1800 428-872 61,0-1288 172-632	<LDM-778	1,60-20,5	Alemania, Portugal, República Checa, España, Vietnam	Gros et al., 2013; Hoa et al., 2011; López-Serna et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Rossmann et al., 2014; Tylová et al., 2013
Eritromicina	5,8-83,7 <LDM-249	<LCM-131 <LDM-2246	<LDM-41,3	Portugal, Francia, República Checa, Vietnam	Hoa et al., 2011; López-Serna et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Tuc Dinh et al., 2011; Tylová et al., 2013
Pesticidas					
Acetamiprid	<LDM-7 <LDM-8,4	20-380	<LDM-70	Australia, Alemania, España, Francia	Lopez et al., 2015; Münze et al., 2017; Rubirola et al., 2017; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014
Clotianidina	<LDM-14 <LDM-40,9	20-420 <LDM-70	<LDM-59	Australia, Alemania Canada, España	Giroux & Sarrasin, 2011; Malvar et al., 2018; Montiel-León et al., 2019; Münze et al., 2017; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014
Imidacloprid	<LDM-109 42-156	40-4560 <LDM-11 2,34-19,20	<LDM-6100	Australia, Alemania Canada, España	Giroux & Sarrasin, 2011; Masiá et al., 2013; Montiel-León et al., 2019; Münze et al., 2017; Rubirola et al., 2017; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014
Metiocarb	<LDM-0,55	<LDM-10		España	Malvar et al., 2018; Rubirola et al., 2017
Tiacloprid	<LDM-23 <LDM-6,6 <LDM-18,9	20-400		Australia, Alemania Canada, España	Malvar et al., 2018; Montiel-León et al., 2019; Münze et al., 2017; Rubirola et al., 2017; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014
Tiametoxam	<LDM-18,0	40-170 <LDM-42	<LDM-830	Australia, Alemania, Canada	Giroux & Sarrasin, 2011; Malvar et al., 2018; Montiel-León et al., 2019; Münze et al., 2017;

Metaflumizona

-

-

-

-

-

4. Conclusiones

- La reglamentación en materia de contaminantes en agua en Europa ha sido y es fundamental a través de las normativas publicadas.
- Una de ellas, la Decisión 2018/840/EC, establece una lista de observación de 15 compuestos, denominados contaminantes emergentes para su monitorización en aguas europeas por su posible riesgo ecotoxicológico.
- Se ha desarrollado un método analítico con el objetivo final de determinar esos contaminantes en matrices acuosas, basándose en un sistema de SPE-LC-MS/MS.
- En la SPE se optimizaron el pH de la muestra y el disolvente eluyente para obtener las recuperaciones más altas posibles tras el proceso.
- La determinación se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, obteniendo los mejores parámetros para la determinación de los compuestos con gran sensibilidad y selectividad.
- El compuesto ciprofloxacino no pudo ser incluido en la metodología final por su baja fragmentación cromatográfica en las condiciones seleccionadas.
- Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 65-110 % y la precisión estuvo entre 5,3-13 %, concordantes con los límites dados por los organismos internacionales.
- Los límites de detección del método estuvieron en el rango de 0,01-5,66 ng L⁻¹, todos por debajo de los límites dictados por la lista de observación excepto para el caso de las hormonas.
- En la aplicación real del método a muestras de agua superficial y muestras de agua residual se encontraron principalmente antibióticos y pesticidas a concentraciones de ng L⁻¹, siendo estos últimos más abundantes.

5. Bibliografía

- Abou-Elwafa Abdallah, M., Nguyen, K.-H., Ebele, A. J., Atia, N. N., Ali, H. R. H., & Harrad, S. A single run, rapid polarity switching method for determination of 30 pharmaceuticals and personal care products in waste water using Q-Exactive Orbitrap high resolution accurate mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2019; 1588: 68–76. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2018.12.033>
- Alygizakis, N. A., Gago-Ferrero, P., Borova, V. L., Pavlidou, A., Hatzianestis, I., & Thomaidis, N. S. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Science of The Total Environment*, 2016; 541: 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.09.145>
- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., & Smith, L. M. Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere*, 2013; 92(1): 84–90. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.02.054>
- Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*, 2014; 69: 104–119. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.04.011>
- Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Cerrato, I., & Richter, P. Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization–gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, 2019; 201: 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.120>
- Borrull, J., Colom, A., Fabregas, J., Pocurull, E., & Borrull, F. A simple, fast method for the analysis of 20 contaminants of emerging concern in river water using large-volume direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019; 411(8): 1601–1610.

<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01602-x>

Campos-Mañas, M. C., Plaza-Bolaños, P., Sánchez-Pérez, J. A., Malato, S., & Agüera, A. Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2017; 1507: 84–94.

<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.05.053>

Carvalho, I. T., & Santos, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 2016; 94: 736–757.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>

De Mes, T., Zeeman, G., & Lettinga, G. Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α - ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2005; 4(4): 275–311. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-3216-x>

European Commission. Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE. *Official Journal of the European Union*, 2004; L158: 7–49.

European Commission. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, 2000; L327: 1–73. <https://doi.org/10.1039/ap9842100196>

European Commission. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC,. *Official Journal of the European Union*, 2008; L348: 84–97.

European Commission. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the

- Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, 2013; L226: 1–17. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=ES>
- European Commission. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 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. *Official Journal of the European Union*, 2015; L78(C(2015) 1756): 40–42.
- European Commission. Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 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 and repealing Comm. *Official Journal of the European Union*, 2018; L141: 9–12.
- Feitosa-Felizzola, J., & Chiron, S. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology*, 2009; 364(1–2): 50–57. <https://doi.org/10.1016/J.JHYDROL.2008.10.006>
- Giroux, I., & Sarrasin, B. Pesticides et nitrates dans l'eau souterraine près de cultures de pommes de terre. 2011: [https://doi.org/ISBN 978-2-550-61396-1](https://doi.org/ISBN%20978-2-550-61396-1)
- González, A., Clavijo, S., & Cerdà, V. Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography. *Talanta*, 2019; 194: 852–858. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.10.105>
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 2018; 136: 25–39. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.02.006>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water

- by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013; 1292: 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>
- Gusmaroli, L., Insa, S., & Petrovic, M. Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU “Watch list.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018; 410(17): 4165–4176. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1069-8>
- Gustavo González, A., & Ángeles Herrador, M. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>
- Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., ... Suzuki, S. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*, 2011; 409(15): 2894–2901. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>
- Hu, R., Zhang, L., & Yang, Z. Picogram determination of estrogens in water using large volume injection gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008; 390(1): 349–359. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1683-3>
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Rodil, R. ., Prieto, A., Olivares, M., Etxebarria, N., & Zuloaga, O. Matrix effect during the membrane-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in wastewater. *Journal of Chromatography A*, 2014; 1356: 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.051>
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015; 40(1): 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>

- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J. G., Shah, A. A., Cai, Q., Morse, A. N., & Anderson, T. A. Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site. *Water Air Soil Pollut*, 2011; 216: 257–273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0532-8>
- Kuch, H. M., & Ballschmiter, K. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environ. Sci. Technol.*, 2001; 35: 3201–3206. <https://doi.org/10.1021/es010034m>
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., & Barceló, D. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution*, 2013; 174: 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.022>
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrović, M., & Barceló, D. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2010; 83(2): 410–424. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2010.09.046>
- Lopez, B., Ollivier, P., Togola, A., Baran, N., & Ghestem, J. P. Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 2015; 518–519: 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.110>
- Malvar, J. L., Abril, C., Basanta, A., Escot, C., Santos, J. L., Aparicio, I., ... Martín, J. Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU Watch List compounds in surface waters: a Spanish case study. *Environmental Chemistry*, 2018; 15(8): 493–505. <https://doi.org/10.1071/en18101>
- Manickum, T., & John, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). *Science of The Total Environment*, 2014; 468–469:

584–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.041>

- Masiá, A., Campo, J., Vázquez-Roig, P., Blasco, C., & Picó, Y. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 2013; 263: 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.035>
- Mnguni, S. B., Schoeman, C., Marais, S. S., Cukrowska, E., & Chimuka, L. Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South, South Africa. *Water SA*, 2018; 44(1): 111. <https://doi.org/10.4314/wsa.v44i1.13>
- Montiel-León, J. M., Muñoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M. A., Goeury, K., ... Sauvé, S. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*, 2019; 29–39: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Pérez-Cánovas, E., Barceló, D., & León, V. M. Input of pharmaceuticals through coastal surface watercourses into a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain): Sources and seasonal variations. *Science of The Total Environment*, 2014; 490: 59–72. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.04.097>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 2015; 74: 291–303. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.10.024>
- Münze, R., Hannemann, C., Orlinskiy, P., Gunold, R., Paschke, A., Foit, K., ... Liess, M. Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *Science of the Total Environment*, 2017; 599–600: 387–399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.008>

- Nie, Y., Qiang, Z., Zhang, H., & Ben, W. Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. *Separation and Purification Technology*, 2012; 84: 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.030>
- Osorio, V., Marcé, R., Pérez, S., Ginebreda, A., & Cortina, J. L. Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Science of The Total Environment*, 2012; 440: 3–13. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.08.040>
- Pailler, J.-Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., & Guignard, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of The Total Environment*, 2009; 407(16): 4736–4743. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2009.04.042>
- Pietrzak, D., Kania, J., Malina, G., Kmiecik, E., & Wątor, K. Pesticides from the EU First and Second Watch Lists in the Water Environment. *Clean - Soil, Air, Water*, 2019; 47(7). <https://doi.org/10.1002/clen.201800376>
- Ribeiro, A. R., Pedrosa, M., Moreira, N. F. F., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the Directive 2013/39/EU and Decision 2015/495/EU. *Journal of Chromatography A*, 2015; 1418: 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.057>
- Rodríguez-Navas, C., Björklund, E., Bak, S. A., Hansen, M., Krogh, K. A., Maya, F., ... Cerdà, V. Pollution pathways of pharmaceutical residues in the aquatic environment 54 on the island of Mallorca, Spain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013; 65(1): 56–66. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9880-x>
- Rossmann, J., Schubert, S., Gurke, R., Oertel, R., & Kirch, W. Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 2014; 969: 162–170.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.008>

Rubirola, A., Boleda, M. R., & Galceran, M. T. Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 2017; 1493: 64–75.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.075>

Sánchez-Bayo, F., & Hyne, R. V. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides.

Chemosphere, 2014; 99: 143–151.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.051>

Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., & Montenegro, M. C. B. S. M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 2013; 461–462: 302–316.

<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.04.077>

Senta, I., Terzic, S., & Ahel, M. Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Research*, 2013; 47(2):

705–714. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2012.10.041>

Singh, R. R., Angeles, L. F., Butryn, D. M., Metch, J. W., Garner, E., Vikesland, P. J., & Aga, D. S. Towards a harmonized method for the global reconnaissance of multi-class antimicrobials and other pharmaceuticals in wastewater and receiving surface waters. *Environment International*, 2019; 124: 361–369.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.01.025>

Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of The Total Environment*, 2019;

649: 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.309>

Takagi, K., Hamaguchi, H., Nishimatsu, T., & Konno, T. (2007). Discovery of

- metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. *Veterinary Parasitology*, 150(3), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.031>
- Tuc Dinh, Q., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuril, M., & Labadie, P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta*, 2011; 85(3): 1238–1245. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.013>
- Tylová, T., Flieger, M., & Olšovská, J. Determination of antibiotics in influents and effluents of wastewater-treatment-plants in the Czech Republic-development and application of the SPE and a UHPLC-ToFMS method. *Analytical Methods*, 2013; 5(8): 2110–2118. <https://doi.org/10.1039/c3ay00048f>
- UNEP. Stockholm Convention: Protecting human health and environment from persistent organic pollutants. 2004. <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., & Van der Sluijs, J. P. Macro-Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid. *PLoS ONE*, 2013; 8(5): e62374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C., & Picó, Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Science of the Total Environment*, 2012; 440: 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.036>
- Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B. J., Gerritsen, A., ... de Voogt, P. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 2005; 59(4): 511–524. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.12.053>
- Westlund, P., & Yargeau, V. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. *Science of The Total Environment*, 2017; 607–608: 744–751. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.032>
- Woźniak, B., Kłopot, A., Żuchowska, I. M., Sielska, K., & Żmudzki, J. Determination of

natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2014; 58: 603–611.
<https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0093>