

Université de Montréal

**Analyse simultanée des hormones stéroïdiennes et leurs  
formes chimiques dans les matrices d'eau et d'urine par  
SPE-LC-MS/MS en ligne**

par

Amanda Clemente Naldi

Département de chimie  
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en chimie

Décembre, 2015

© Amanda Clemente Naldi, 2015

## Résumé

Dans les dernières années, les perturbateurs endocriniens ont été observés dans les rivières qui reçoivent des entrées importantes d'eaux usées. Parmi les perturbateurs endocriniens, les hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques sont des composés dont le potentiel d'imiter ou d'interférer avec les fonctions hormonales normales (développement, croissance et reproduction), est reconnu même au niveau ultra-traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ). Bien que les hormones conjuguées soient moins actives que les hormones libres, elles peuvent être clivées et redevenir libres une fois exposées aux processus microbiens avant ou pendant le traitement des eaux usées. En raison de la nécessité d'identifier et de quantifier ces composés dans l'eau, une nouvelle méthode, entièrement automatisée, a été développée pour la détermination simultanée des deux formes de plusieurs hormones stéroïdiennes (conjuguées et libres) dans les matrices d'eau et dans l'urine des femmes. La méthode est basée sur l'extraction en phase solide couplée en ligne à la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem (SPE-LC-MS/MS). Plusieurs paramètres ont été évalués dans le but d'optimiser l'efficacité de la méthode, tels que le type et le débit de la phase mobile, des différentes colonnes de SPE et de chromatographie, ainsi que différentes sources et modes d'ionisation des échantillons pour la MS. La méthode démontre une bonne linéarité ( $R^2 > 0.993$ ), ainsi qu'une précision avec un coefficient de variance inférieure à 10%. Les limites de quantification varient d'un minimum de 3 à 15  $\text{ng L}^{-1}$  pour un volume d'injection entre 1 mL et 5 mL et le recouvrement des composés varie de 72 % à 117 %.

**Mots-clés :** Hormones stéroïdes conjugués, extraction en phase solide en ligne, chromatographie liquide, spectrométrie de masse en tandem, eaux usées, eau de rivière, urine.

## Abstract

In recent years, endocrine disrupting compounds (EDCs) have been found in rivers that receive significant inputs of wastewater. Among EDCs, natural and synthetic steroid hormones are recognized for their potential to mimic or interfere with normal hormonal functions (development, growth and reproduction), even at ultratrace levels ( $\text{ng L}^{-1}$ ). Although conjugated hormones are less active than free hormones, they can be cleaved and release the unconjugated estrogens through microbial processes before or during the treatment of wastewater. Due to the need to identify and quantify these compounds, a new fully automated method was developed for the simultaneous determination of the two forms of several steroid hormones (free and conjugated) in different water matrixes and in urine. The method is based on online solid phase extraction coupled with liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). Several parameters were assessed in order to optimize the efficiency of the method, such as the type and flow rate of the mobile phase, the various SPE columns, chromatography as well as different sources and ionization modes for MS. The method shows good linearity ( $R^2 > 0.993$ ) and precision with a coefficient of variance of less than 10%. The quantification limits vary from a minimum of 3 to 15  $\text{ng L}^{-1}$  for an injection volume of 1 mL and 5 mL, respectively, with the recovery values of the compounds varying from 72% to 117%.

**Keywords:** Conjugated steroid hormones, On-line solid phase extraction (SPE), Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), wastewater, river water, urine, estrogens.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des tableaux – Article.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des figures – Article.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
1. Introduction.....	1
1.1. Objectif du projet de maîtrise.....	2
2. Les contaminants stéroïdiens retrouvés dans les eaux environnementales.....	4
2.1 Les hormones stéroïdes.....	4
2.1.1 Les stéroïdes naturels.....	4
2.1.2 Les stéroïdes synthétiques.....	7
2.2. Les contaminants choisis et les critères de sélection.....	8
2.3. Description des hormones œstrogéniques ciblées pour le projet d'étude.....	11
2.3.1 Description de l'estrone (E1) et de l'estrone-3-sulfate (E1-3S).....	11
2.3.2 Description de l'estriol (E3) et de l'estriol-3-sulfate (E3-3S).....	11
2.3.3 Description de l'estradiol (E2), de l'estradiol-17-sulfate (E2-17S), de l'estradiol-3-sulfate (E2-3S) et de l'estradiol-17-glucuronide (E2-17G).....	12
2.3.4 Description du 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2).....	13
3. Les principales sources de contamination des hormones œstrogéniques dans l'environnement.....	14
4. Effets de l'exposition aux hormones œstrogéniques.....	20

5. Techniques d'extraction, d'enrichissement, de prétraitement et instruments d'analyse utilisés couramment dans la littérature pour quantifier les hormones stéroïdiennes libres et conjuguées.....	22
5.1 L'extraction sur phase solide (SPE).....	23
5.1.1 Principes et fonctionnement de l'extraction sur phase solide (SPE) .....	23
5.1.2 SPE manuelle et SPE en ligne .....	29
5.2 La chromatographie liquide accouplé à la spectrométrie de masses en « tandem » (LC-MS/MS).....	32
5.2.1 Historique de la chromatographie liquide (LC).....	32
5.2.2 Principe et fonctionnement de la chromatographie liquide (LC).....	33
5.2.3 Historique de la spectrométrie de masses (MS).....	36
5.2.4 Principe et fonctionnement de la spectrométrie de masse en tandem.....	37
5.2.5 Système LC-MS/MS utilisé dans le projet.....	40
6. Simultaneous analysis of steroid hormones and their conjugated forms in different water matrices and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry.....	45
Analysis of steroid hormones and their conjugated forms water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. ....	46
Abstract.....	47
Background.....	48
Experimental.....	51
Standards and reagents.....	51
Instrumental conditions.....	53
On-line solid phase extraction .....	53
Chromatographic conditions.....	54
Mass spectrometry .....	55
Breakthrough volume estimation.....	56
Matrix effects study .....	57
Method validation and calibration .....	57

Environmental samples / Sample collection and preservation .....	60
Results and discussion .....	61
On-line trace enrichment.....	61
Chromatographic analysis.....	64
Method validation .....	67
Method application .....	70
Analysis of drinking, river, affluent and effluent water samples using on-line SPE-LC-ESI-MS .....	70
Determination of conjugated and free estrogen levels in female urine samples using on-line SPE-LC-HESI-MS.....	75
Method conclusion.....	76
Description of additional data files.....	77
Acknowledgements.....	78
Supporting Information.....	78
Additional data file 1 .....	79
Additional data file 2 .....	80
Additional data file 3 .....	81
Additional data file 4 .....	82
Additional data file 5 .....	83
Additional data file 6 .....	84
Additional data file 7 .....	85
Additional data file 8 .....	86
Additional data file 9 .....	87
Additional data file 10 .....	88
7. Conclusion .....	89
7.1 Perspectives.....	92
Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

Tableau 1 - Nombre de fois que les hormones oestrogéniques conjuguées ont été citées dans les documents analysés.....	8
Tableau 2 - Les niveaux des hormones conjuguées trouvées dans les eaux usées <i>in natura</i> [4, 7, 31, 32]. .....	15
Tableau 3 - Les niveaux des hormones conjuguées trouvées dans les eaux usées traitées (effluents) [4, 7, 31-33]. .....	16
Tableau 4 - Les niveaux des hormones conjuguées trouvées dans l'eau de surface et dans l'eau potable [4, 33-35]. .....	16
Tableau 5 - Tableau comparatif des principales caractéristiques de la SPE manuelle et de la SPE en ligne. ....	31

## Liste des tableaux – Article

Article Table 1 - MS/MS optimized parameters for the analysis of selected estrogens hormones in negative (NI) ionization mode. ....	56
Article Table 2 - Recovery values in percentage for the selected estrogens using the SPE BetaBasic column in HPLC water samples. Recovery values were calculated comparing off-line small injection method (25 $\mu\text{L}$ ) with online 1 mL injections (same mass of analyte injected) ( $C = 500 \text{ ngL}^{-1}$ , $n = 5$ ). .....	62
Article Table 3 - Method validation results for limit of detection and limit of quantification for all waters tested. ....	69
Article Table 4 - Concentrations of the selected estrogens in the water samples analysed in $\text{ng L}^{-1}$ . Samples were collected and analyzed in July 2014. ....	71
Article Table 5 - Comparison of measured concentrations of the studied estrogens in river samples. Concentrations in $\text{ng L}^{-1}$ . .....	73
Article Table 6 - Comparison of measured concentrations of the studied estrogens in wastewater samples. Concentrations in $\text{ng L}^{-1}$ . .....	74
Article Table 7 - Concentrations of the selected estrogens in the urine samples analysed in $\mu\text{g L}^{-1}$ . Samples were collected and analyzed in September and October 2014. ....	75

Article Table 8 - S1 – Valve program, on-line SPE (loading pump) and LC (analytical pump). .....	79
Article Table 9 - S2 – Method validation results for linearity ( $R^2$ ), for all waters tested (HPLC water, drinking water, river water and wastewater).....	82
Article Table 10 - S3 – Extraction recovery results for all target compounds in river water. Extraction efficacies were tested in two different concentrations for 5 mL injections ( $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ and $100 \text{ ng L}^{-1}$ ; $n=7$ ) and one concentration for 1 mL injections ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ; $n=10$ ). .....	83
Article Table 11 - S4 – Comparison of measured detection limits (LODs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Conc. in $\text{ng L}^{-1}$ . .....	84
Article Table 12 - S5 – Comparison of measured quantification limits (LOQs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Conc. in $\text{ng L}^{-1}$ . .....	85
Article Table 13 - S6 – Accuracy for the selected estrogens for all waters tested. ....	86
Article Table 14 - S7 – Matrix Effects for the selected estrogens for all waters tested (in percentage).....	87
Article Table 15 - S8 – Calculated recovery values in percentage for the selected estrogens. BetaBasic column was used as SPE column for the on-line SPE-LC-MS/MS method. Recovery values were calculated comparing the same volume injection of those of urine samples diluted at least ten times. ( $n = 5$ )......	88



## Liste des figures

Figure 1 - La structure de quatre anneaux communs pour les œstrogènes. ....	5
Figure 2 - Le métabolisme des œstrogènes endogènes chez les humains (15).....	6
Figure 3 - Structure des contaminants sélectionnés pour le projet de maîtrise.....	10
Figure 4 - Étapes de la SPE en mode de concentration ou isolement des analytes d'intérêt (adapté de Waters [70]).....	28
Figure 5 - Schéma d'une séparation chromatographique simple en phase liquide. Copyright © 2013 by Brian M. Tissue, all rights reserved [80]. ....	34
Figure 6 - Schéma des expériences de J. J. Thomson auprès de rayons cathodiques. Le montage durant l'application du champ électrique et la déviation d'électrons avec l'application du champ [79]. ....	36
Figure 7 - Vision générale d'un spectromètre de masse [80]. ....	38
Figure 8 - Schéma de l'instrumentation utilisée dans ce projet, adapté du mémoire de F. Rabii [59]......	41
Figure 9 - Triple quadrupôle (TSQ_Quantum) (Guide de référence de Thermo). ....	43

## Liste des figures – Article

Article Figure 1 - Chemical structures of target free and conjugated estrogens.....	52
Article Figure 2 - Effect of loading speed. Percentage recovery for all analytes tested using 1500 $\mu\text{l min}^{-1}$ , 2000 $\mu\text{L min}^{-1}$ and 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow rates. A flow of 1000 $\mu\text{l min}^{-1}$ was considered as 100% ( $n = 3$ , $C = 500 \text{ ng L}^{-1}$ ). ....	63
Article Figure 3 - Breakthrough volume determination in HPLC water. Percentage recovery for 1 ml, 2 ml, 5 ml and 10 ml sample volume injections. 1 ml injection was considered as being 100% ( $n = 3$ , $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ )......	64
Article Figure 4 - Representative chromatograms of a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ standard mixture and of a 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ internal standard of the conjugated estrogens analyzed in river water. ....	66
Article Figure 5 - Representative chromatogram of a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ standard mixture and of a 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ internal standard of the free estrogens analyzed in river water.....	66

Article Figure 6 - S1 - Method validation for precision (intra-day).  $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 10$  for 1 mL sample volume and  $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 7$  for 5 mL sample volume. .... 80

Article Figure 7 - S2 - Method validation for precision (inter-day).  $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 12$  for 1 mL sample volume and  $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 15$  for 5 mL sample volume ..... 81

## Liste des sigles et abréviations

E3-3S	Estriol-3-sulfate
EDCs	Endocrine disruptive compounds / Perturbateurs endocriniens
EE2	17 $\beta$ -ethynylestradiol
EE2-3G	17 $\beta$ -ethynylestradiol-3-glucuronide
EE2-3S	17 $\beta$ -ethynylestradiol-3-sulfate
EEC	European Commission, Council Regulation
Eff	Effluent
EFS	Extraction fluide supercritique
ELISA	Méthode immuno-enzymatique
ELL	Extraction liquide-liquide
ESI	Electrospray / Nébulisation électrostatique
FAB	Bombardement d'atomes rapides
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GC	Gas chromatography / Chromatographie en phase gazeuse
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry / Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-MS/MS	Gas chromatography-mass spectrometry / Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem
H <sub>2</sub> O	Water / Eau
HESI	Heated electrospray ionization
HPLC	High performance liquid chromatography / Chromatographie liquide à haute performance
ICH	International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IS	Internal standard / Étalon interne
ISRP	Internal Surface Reversed Phase
K <sub>oc</sub>	Coefficient de partage carbone organique/eau

LC	Liquid chromatography / Chromatographie liquide
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry / Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDTD	Laser diode thermal desorption / Désorption thermique induite par diode laser
LH	Hormone lutéinisante
LH-RH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LOD	Limit of detection / Limite de détection
LOQ	Limit of quantification / Limite de quantification
m/z	Mass-to-charge ratio / Ratio masse sur charge
MALDI	Désorption laser avec matrice
MDL	Method detection limit / Limite de detection de la méthode
MeOH	Methanol / Méthanol
MEPS	Micro extraction sur phase solide
MS	Mass spectrometry / Spectrométrie de masse
MS/MS	Tandem mass spectrometry / Spectrométrie de masse en tandem
n	Number of replicates / Nombre de répliqués
NA	Not analyzed
ND	Not detected
NH <sub>4</sub> OH	Hydroxyde d'ammonium / Ammonium Hydroxide
NI	Negative ionization mode
PE	Perturbateurs endocriens
PhACs	Pharmaceuticals products / Produits pharmaceutiques
pKa	Constant d'acidité
PPCPs	Pharmaceuticals and personal care products / Produits pharmaceutiques et de soins personnels
QC	Quality control
QqQ	Triple quadripole / Triple quadripôles
R <sup>2</sup>	Determination coefficient / Coefficient de détermination

RSD	Relative standard deviation
RW	River water
S/N	Signal-to-noise ratio / Rapport signal sur bruit
SD	Standard deviation
SPE	Solid phase extraction / Extraction en phase solide
SPE-LC-MS/MS	Extraction en phase solide avec chromatographie liquide et spectrometrie de masse en tandem.
SRM	Selected Reaction Monitoring / Balayage sélectif d'ions fragments
TEA	Triethanolamine
THS	Traitement hormonal substitutif
TL	Tube Lens
USEPA	US Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolet
WW	Wastewater / eaux usées
WWTP	Wastewater treatment plant / Station de traitement des eaux usées

*À Daniel Patrick, mon mari. Ce travail te doit beaucoup. Qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension, de privations et d'efforts communs. À Pietro, Lorenzo et Giulia, nos enfants, tout étonnés que leur maman ait enfin terminé « sa mémoire » !*

## Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mon directeur de recherche, le professeur Sébastien Sauvé. Il m'a accueilli au sein de son groupe de recherche et m'a donné l'opportunité de travailler sur un projet de maîtrise passionnant et enrichissant en vue de l'obtention d'un diplôme d'études graduées. Je le remercie aussi pour m'avoir encouragé, conseillé et soutenu tout au long du projet. Je lui en suis grandement reconnaissant.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de mon jury de mémoire de maîtrise, dont particulièrement les docteurs Pierre Chaurand et Patrick Hayes. Je remercie aussi la professeure Michèle Prévost, en tant que codirectrice de mon projet de recherche, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son aide.

Je tiens à souligner l'effort exceptionnel de mon collègue Paul Fayad, je lui suis énormément reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je désire en outre remercier tous mes collègues d'équipe pour leur sympathie et leur amitié. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal. J'adresse de chaleureux remerciements à Sung Vu Doy, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette mémoire. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

Je désire en outre remercier mon mari, Daniel Patrick et mes enfants, Pietro, Lorenzo et Giulia. Leur énergie leur patience ont été des éléments moteurs pour moi. Pendant les moments plus difficiles, ils ont toujours su me faire voir le bon côté des choses et m'encourager à persévérer. Enfin, je remercie mes amis, ainsi que mes parents, Leonelo et Maria Teresa pour leur soutien au cours de ces années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui.

# 1. Introduction

Les composés appelés perturbateurs endocriniens (PEs) sont des substances exogènes qui interfèrent avec le système endocrinien pour des processus tels que dans la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action et l'élimination des hormones naturelles. Les PE perturbent la fonction physiologique des hormones dans le corps.

La recherche sur les perturbateurs endocriniens dans les dernières décennies a connu une croissance rapide [1]. Le perturbateur endocrinien le plus actif connu et qui puisse perturber les composés présents dans l'environnement appartient à la classe des stéroïdes. L'apparition de composés œstrogéniques actifs qui influencent le développement sexuel des poissons dans les rivières anglaises a été signalé pour la première fois il y a plus de 20 ans [2]. Depuis lors, la présence de ces produits chimiques a été étudiée et est devenue une préoccupation majeure dans le monde entier.

Les œstrogènes sont produits naturellement par les humains et par la faune ou encore par synthèse, tel que les contraceptifs et les médicaments pour le traitement hormonal. Leur potentiel d'imiter ou d'interférer avec les fonctions hormonales normales (développement, croissance et reproduction) est reconnu même à un niveau très bas ( $\text{ng L}^{-1}$ ). Les œstrogènes naturels sont sécrétés principalement sous la forme d'hormones conjuguées. En raison de la faible puissance œstrogénique des hormones conjuguées par rapport aux œstrogènes libres, elles ont été peu étudiées comparativement à ces dernières. Toutefois, des données provenant de quelques recherches ont suggéré qu'elles sont présentes dans les eaux usées et que certaines d'entre elles sont entrées dans des organismes recevant la décharge des effluents [3, 4]. En plus de cela, des études montrent qu'elles peuvent être clivées et être transformées en hormones libres avant ou pendant le traitement des eaux usées [5-8].

Le développement de nouvelles méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier ces composés apparaissant à l'état de traces dans l'environnement est nécessaire. La détection précise et la quantification des œstrogènes libres et conjugués dans la rivière et dans les eaux



usées sont difficiles à réaliser. La complexité de ces matrices et le facteur de concentration élevé nécessaire pour les mesurer ainsi que la très faible concentration d'œstrogènes qui peut causer des effets de perturbation endocrinienne sont les principales causes.

## **1.1.Objectif du projet de maîtrise**

La revue bibliographique effectuée sur l'identification et la quantification des hormones œstrogéniques conjuguées dans les différentes matrices a révélé que la plupart des études publiées se sont limitées à l'étude des hormones œstrogéniques libres et il ne semble pas y avoir de méthodes disponibles qui permettent la quantification simultanée des hormones libres et conjuguées en utilisant exactement la même technique. Par ailleurs, la revue de littérature a montré que plusieurs techniques ont été utilisées, étant la LC-MS/MS précédée de l'extraction sur phase solide manuelle « *Off-line* » la technique de choix pour l'analyse de ces composés.

L'objectif de cette recherche est de développer une méthode entièrement automatisée, basée sur l'extraction sur phase solide, la séparation par chromatographie liquide et la détection par spectroscopie de masse en tandem (SPE-LC-MS/MS). Cette méthode permettra la détection simultanée des deux formes d'œstrogènes (libres et conjuguées) dans des échantillons d'eau environnementale et dans l'urine. En outre, la validation de la méthode se fera en évaluant la sélectivité, la plage linéaire, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), le taux de recouvrement, les effets de matrices et la précision (« *interday* » et « *intraday* »). Afin de confirmer la présence (ou l'absence) des œstrogènes conjugués et libres et l'applicabilité de la méthode dans des échantillons environnementaux réels, la détermination des hormones œstrogènes sélectionnées sera fait, entre autres, dans des échantillons d'eau de rivière à partir de la rivière des Mille Îles au Canada.

Non seulement, le développement d'une méthode utilisant la SPE en ligne présente des avantages qui comprennent l'élimination de plusieurs étapes (entre autres, l'évaporation et la

reconstitution) ainsi que la réduction des manipulations de l'échantillon. De plus, les exigences de volume d'échantillons étant plus petites, cette méthode présente une meilleure précision et une meilleure reproductibilité, et ainsi, un débit plus élevé d'échantillons peuvent être analysés (avec des gains économiques non négligeables). La qualité des données analytiques rapportées est aussi beaucoup améliorée une fois que la somme de ces facteurs soit optimisée [9].

## **2. Les contaminants stéroïdiens retrouvés dans les eaux environnementales**

### **2.1 Les hormones stéroïdes**

Les hormones stéroïdes sexuelles sont classées comme les œstrogènes, les androgènes et la progestérone.

Bien qu'il n'y ait pas beaucoup de recherches sur les composés de progestérone et des androgènes, certaines études ont montré leur présence et leurs effets sur l'environnement [10, 11]. D'un autre côté, les hormones œstrogènes, sous leur forme libre, ont été largement étudiées et certaines études démontrent clairement leur présence et leurs effets sur l'environnement [1].

#### **2.1.1 Les stéroïdes naturels**

Les œstrogènes ont un squelette carboné appelé cyclopentanoperidro-phénanthrène en commun et qui est biosynthétisé à partir du cholestérol. Les stéroïdes sont composés d'un squelette de trois anneaux hexagonaux et d'un anneau pentagonal de carbone, généralement disposés en une structure 6-6-6-5, auxquels divers groupes fonctionnels et des chaînes latérales sont attachés. La structure de quatre anneaux communs pour les œstrogènes est présentée à la Figure 1. Les anneaux sont présentés et identifiés par les lettres A, B, C et D, commençant à partir de l'anneau aromatique (A). L'anneau aromatique appelée A est responsable de la transmission des informations biologiques à travers la réalisation de liaisons d'hydrogène avec le récepteur des œstrogènes [12].

Les trois principaux œstrogènes naturels sont l'estradiol, l'estrone et l'estriol. Ils sont des stéroïdes de 18 carbones (C18) qui diffèrent dans l'état de leurs anneaux d'oxydation. La structure des trois hormones œstrogènes naturelles, certaines dans leur forme conjuguée ainsi que la principale hormone œstrogène synthétique (éthynylestradiol) est présentée plus tard dans la figure 3.

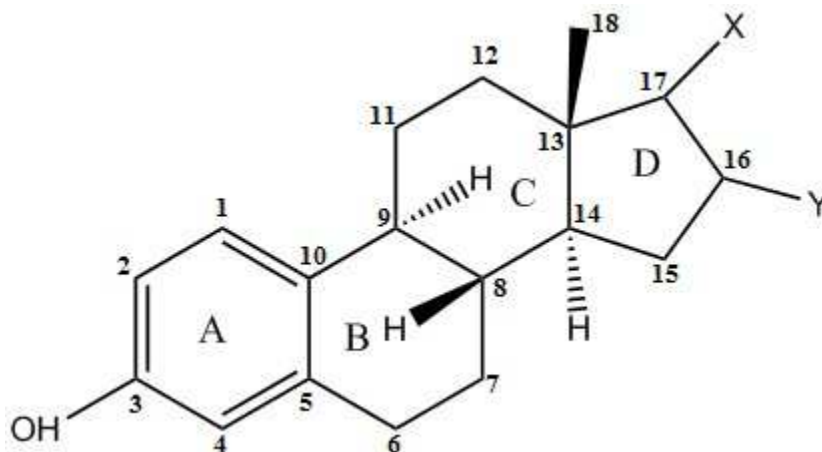


Figure 1 - La structure de quatre anneaux communs pour les œstrogènes.

Les hormones œstrogènes sont principalement produites par les ovaires sous la commande des hormones protéinoïdes libérées par l'hypophyse dans la circulation sanguine [13]. Elles sont responsables du développement de traits féminins et l'apparition de la puberté et elles ont un rôle important dans la différenciation sexuelle et dans le développement pré et postnatal. La figure 2 montre le métabolisme des œstrogènes endogènes chez les humains [3, 4, 14].

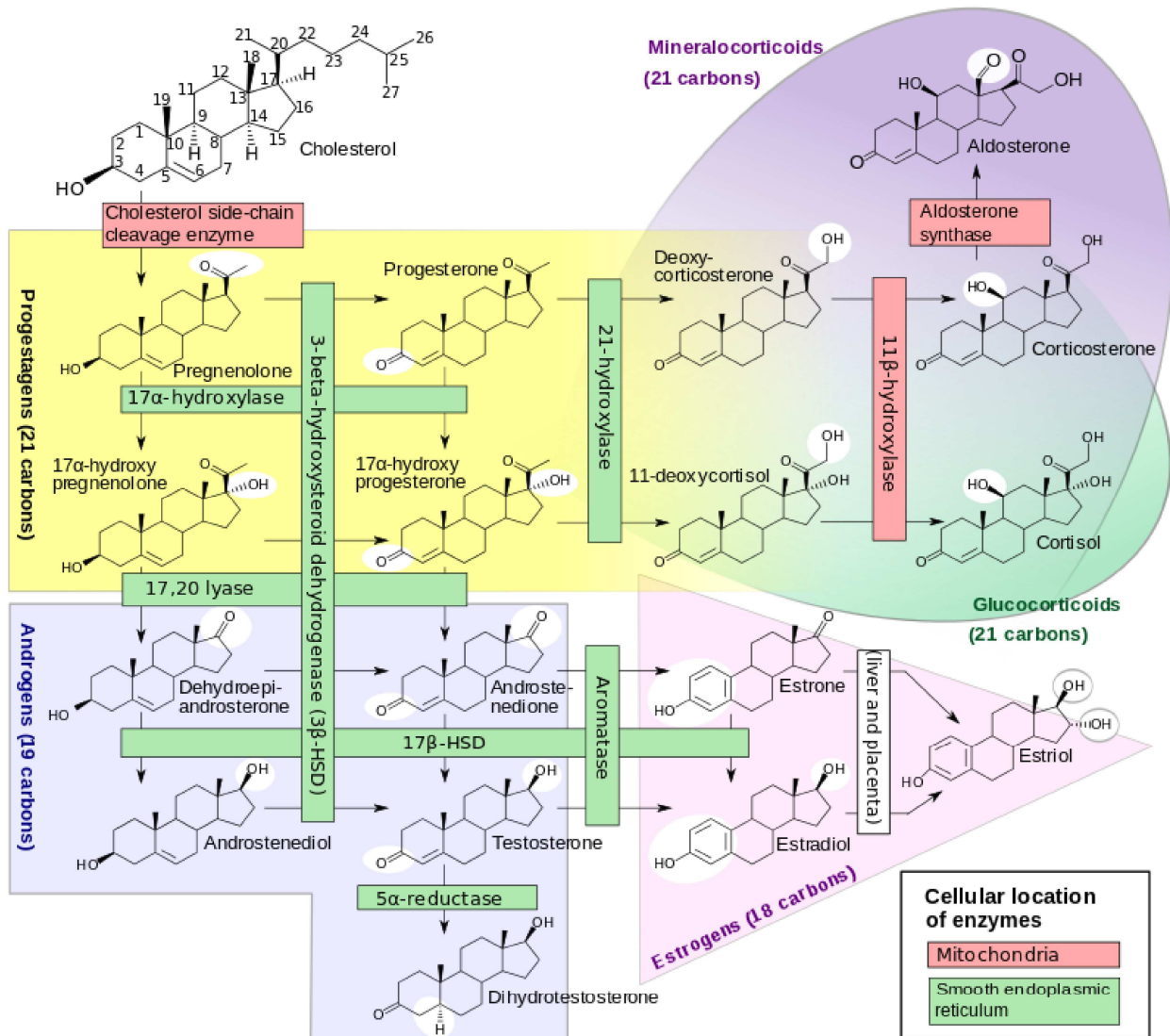


Figure 2 - Le métabolisme des œstrogènes endogènes chez les humains (15)

Les voies de synthèse des stéroïdes sont très complexes et impliquent de multiples enzymes menant à la synthèse de progestérone, cortisol, testostérone et d'œstradiol. Les œstrogènes sont principalement produits au niveau des ovaires par la transformation du cholestérol.

Régie par un cycle ovarien, la production d'œstrogènes chez la femme est en constante modulation. Au début du cycle, il y a sécrétion de « *Luteinizing Hormone Releasing Hormone* » (LH-RH) par l'hypothalamus qui stimule la libération de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) par l'adénohypophyse. La FSH et la LH stimulent la croissance du follicule et c'est celui-ci qui produira la majorité des œstrogènes chez les femmes. Les cellules de la granulosa utilisent le cholestérol et le transforment en progestérone par l'intermédiaire du cytochrome P450 « *side chain cleavage* » (P450scc) et de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase/Δ5-Δ4 isomérase (3β-HSD). La progestérone est ensuite transformée par le cytochrome P450c17 et par la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17β-HSD) en testostérone par les cellules de la thèque. Finalement la testostérone est transformée par le cytochrome P450 aromatasase en estradiol par les cellules de la granulosa. Chez la femme enceinte, le placenta est également un site important de production d'œstrogènes. Chez la femme ménopausée ainsi que chez l'homme, le tissu adipeux et la peau sont d'importants sites de production périphérique des œstrogènes par l'aromatase des androgènes. Les surrénales sécrètent de grandes quantités de précurseurs stéroïdiens tels la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione, qui seront convertis en hormones actives dans les tissus périphériques. Chez l'homme, les testicules sont une source significative d'estradiol [15].

Les hormones sont excrétées sous la forme de conjugués. La glucuronidation, la conversion de composés chimiques en glucuronides, est une méthode qu'utilisent les animaux pour aider à l'excrétion de substances toxiques, médicaments, drogues, ou toute autre substance ne pouvant servir de source d'énergie. De plus, les glucuronides sont plus solubles dans l'eau que les hormones d'origine et sont donc plus facilement excrétées par les reins.

### **2.1.2 Les stéroïdes synthétiques**

Tout comme les œstrogènes naturels, les œstrogènes synthétiques jouent une influence importante sur l'environnement. Il y a une augmentation considérable de la consommation d'œstrogènes en médecine humaine. Les œstrogènes synthétiques sont dérivés principalement

de l'estradiol, bien que d'autres soient connus. Des exemples sont le diéthylstilbestrol, le valérate d'estradiol, le sulfate d'estrone, le mestranol, le dienœstrol et, notamment, l'éthinylestradiol [16]. Les principales applications des œstrogènes synthétiques sont la thérapie hormonale de remplacement, le traitement du cancer de la prostate, l'élevage d'animaux de ferme (des facteurs de croissance et des développeurs des populations de poissons unisexués en aquaculture) et surtout la contraception [17-21].

## 2.2. Les contaminants choisis et les critères de sélection

Le choix des contaminants de cette étude a été basé sur leur popularité d'après certains articles scientifiques, sur leur présence dans l'environnement et sur leur pouvoir de provoquer des changements dans les fonctions ostrogéniques des animaux.

Environ 200 articles ont été analysés. Le tableau suivant indique combien de fois chacune des hormones ostrogéniques conjuguées ont été citées dans les documents analysés.

Tableau 1 - Nombre de fois que les hormones ostrogéniques conjuguées ont été citées dans les documents analysés. La structure des composés est donnée dans la figure 3.

<b>Hormone Conjuguée</b>		<b>Références - Total</b>
E3-3G	Estriol-3-glucuronide	5
E3-16G	Estriol-16-glucuronide	7
E3-3S	Estriol-3-sulfate	9
E2-3G	Estradiol-3-glucuronide	7
E2-17G	Estradiol-17-glucuronide	12
E2-3S	Estradiol-17-sulfate	9
E2-17S	Estradiol-17-sulfate	0
E1-3G	Estrone-3-glucuronide	11
E1-3S	Estrone-3-sulfate	14
E2-3G17S	Estradiol-3-glucuronide-17-sulfate	1
E2-3S17G	Estradiol-3-sulfate-17-glucuronide	2

Continuation du tableau 1 – Nombre de fois que les hormones ostrogéniques conjuguées ont été citées dans les documents analysés.

<b>Hormone Conjuguée</b>		<b>Références - Total</b>
E2-3,17DiS	Estradiol-3,17-Disulfate	3
E3-17G	Estrone-17-glucuronide	1
EE2-3S	Éthinylestradiol-3-sulfate	1
EE2-3G	Ethinylestradiol-3-glucuronide	1

Parmi les trois œstrogènes naturels de plus grande occurrence chez les femmes (l'estrone (E1), l'estradiol (E2), et l'estriol (E3)), l'estradiol (E2) est celui qui a un plus grand pouvoir d'interférer avec le système endocrinien [3]. Même si, entre les trois hormones naturelles, l'estrone (E1) est la moins fréquente, des études montrent la conversion de l'estriol (E3) en estrone (E1) [3, 22, 23].

Toujours la revue de littérature, les hormones conjuguées avec des molécules de sulfates présentent une demi-vie plus stable, tandis que les conjuguées sous la forme de sucre (des glucuronides) semblent être instables une fois excrétées par les organismes vivants et se déconjuguent rapidement [3, 8, 22, 23].

Pour cette raison, au moins une forme de chaque hormone conjuguée sous la forme de sulfate a été choisie dans cette étude (E1-3S, E2-3S et E3-3S E2-17S), en plus des mêmes hormones libres. En outre, une seule des hormones conjuguées sous la forme de glucuronide (E2-17G) a été retenue pour l'étude, soit l'estradiol (E2) en raison de son pouvoir ostrogénique supérieure et sa présence dans plusieurs articles cités.

L'hormone synthétique éthinylestradiol (EE2) a également été analysée. Elle a été choisie pour être l'hormone synthétique les plus couramment utilisée dans les contraceptifs et dans les méthodes de remplacement hormonal.



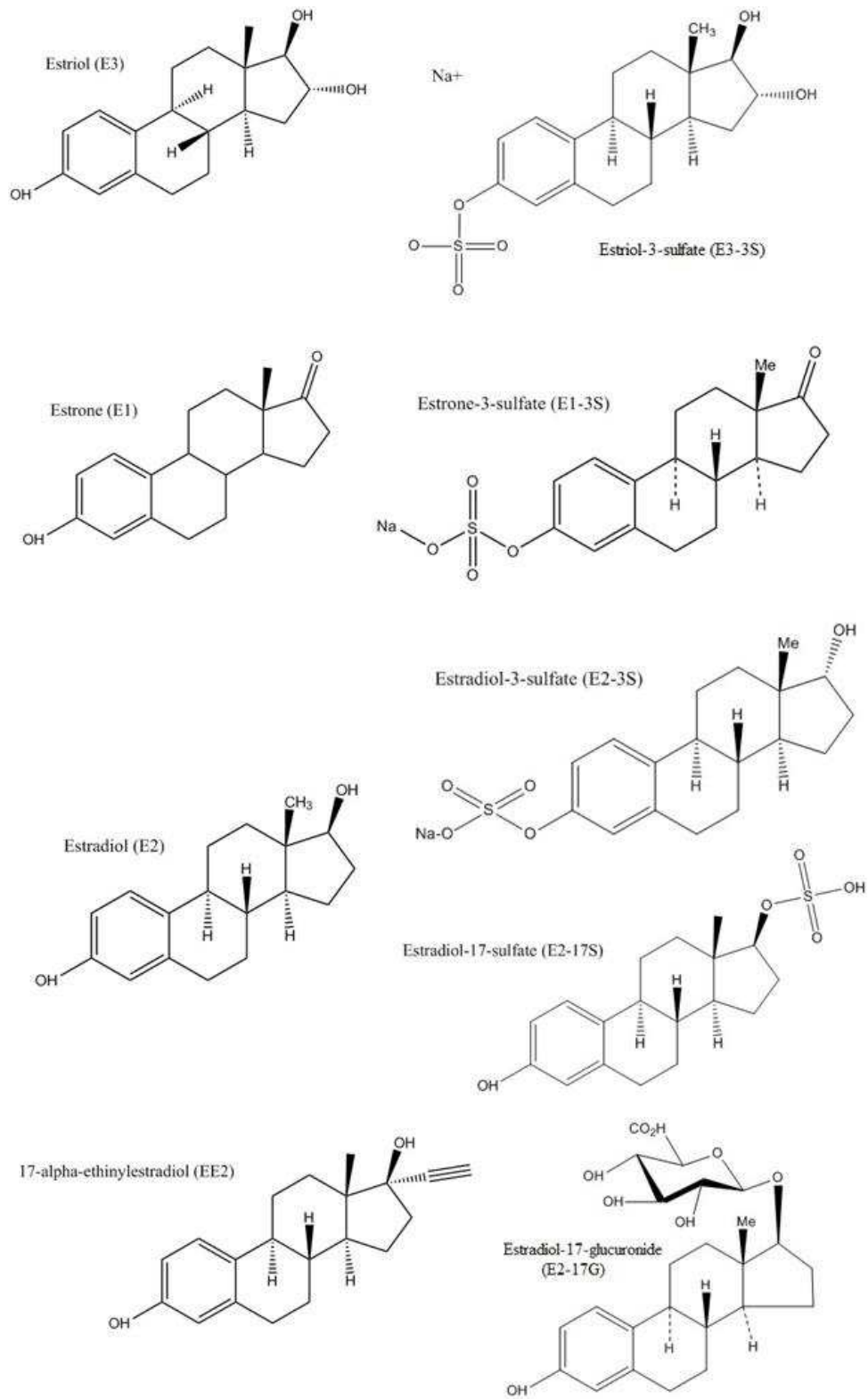


Figure 3 - Structure des contaminants sélectionnés pour le projet de maîtrise.

## **2.3. Description des hormones œstrogéniques ciblées pour le projet d'étude**

### **2.3.1 Description de l'estrone (E1) et de l'estrone-3-sulfate (E1-3S)**

L'estrone (E1) est une hormone œstrogène sécrétée par l'ovaire ainsi que par les tissus adipeux et sa formule chimique est  $C_{18}H_{22}O_2$ . Elle est la moins abondante des œstrogènes naturels. L'estrone est une poudre solide cristalline et inodore, de couleur blanche avec un point de fusion de 254,5 °C [24, 25].

Elle est connue pour être cancérigène pour les femmes et est aussi une des causes de la sensibilité des seins ou de douleurs, de nausées, de maux de tête, de l'hypertension et de crampes dans les jambes [24]. Chez les hommes, l'estrone est connue pour causer l'anorexie, des nausées, des vomissements, et la dysfonction érectile [25]. Elle est l'œstrogène prédominant chez les femmes ménopausées [26].

L'estrone-3-sulfate (E1-3S) est la même hormone, mais sous forme conjuguée avec un sulfate. Elle peut ainsi agir comme un réservoir et contribuer à augmenter les concentrations d'estrone au fur et à mesure de la déconjugaison. L'estrone est transformée en estradiol par l'enzyme 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase. Ces enzymes sont présentes dans les tissus adipeux, hépatiques et musculaires.

### **2.3.2 Description de l'estriol (E3) et de l'estriol-3-sulfate (E3-3S)**

L'estriol (E3) est un des trois principaux œstrogènes produits dans le corps humain pendant que l'estriol-3-sulfate (E3-3S) est la forme conjuguée de la même hormone. L'estriol est produit dans des quantités importantes seulement pendant la grossesse. Le principal site de la synthèse de l'estriol est le placenta qui convertit le 16-hydroxydéhydroépiandrosterone sulfate (16-OH DHEAS) en estriol [27], Le 16-OH DHEA-S est un stéroïde androgène qui se

trouve dans le foie fœtal et dans les glandes surrénales. Il est formé à partir du prégnénolone et de progestérone qui viennent du cholestérol circulant et est ensuite converti et sulfoné pour former le DHEAS. Les taux d'estriol dans les femmes non enceintes ne changent pas beaucoup après la ménopause. Aussi, les taux d'estriol ne sont pas très différents de ceux qui sont observés chez les hommes.

### **2.3.3 Description de l'estradiol (E2), de l'estradiol-17-sulfate (E2-17S), de l'estradiol-3-sulfate (E2-3S) et de l'estradiol-17-glucuronide (E2-17G)**

L'estradiol (E2) est produit en majeure partie par les follicules ovariens depuis l'apparition des premières règles jusqu'à la ménopause et est le type d'œstrogène endogène le plus actif. L'estradiol est un dérivé naturel du métabolisme du cholestérol (via la testostérone) qui est nécessaire au maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires chez la femme [28].

L'estradiol-17-sulfate (E2-17S), l'estradiol-3-sulfate (E2-3S) et l'estradiol-17-glucuronide (E2-17G) sont des formes conjuguées de la même hormone.

Chez les humains, les fonctions et effets de l'E2 surviennent entre autres dans les phénomènes suivants :

- Influence de la distribution des cellules adipeuses sur le corps chez la femme.
- Développement et maintien du sein.
- Apport de lipides aux seins, hanches, cuisses lors de la puberté.
- Amélioration de la force et de la densité osseuses.
- Aide à la croissance par accélération de la maturation osseuse et clôture des épiphyses.
- Croissance de l'utérus.
- Développement de l'endomètre jusqu'à l'épaisseur compatible avec la grossesse et aux règles.

- Développement et maintien de l'épaisseur de la muqueuse et des sécrétions vaginales.
- Chez les deux sexes : rétroaction primaire dans le cerveau en ce qui concerne les taux d'hormones sexuelles.

Après la ménopause, lorsque les ovaires ont cessé de fonctionner, l'organisme ne produit plus que de faibles quantités d'estradiol. La manque de l'E2 après la ménopause peut provoquer les phénomènes connus par les femmes dans cette situation, tels que l'instabilité de la régulation thermique (des bouffées de chaleur et de sudation excessive), une perte accélérée de la matrice osseuse et de la substance minérale de l'os menant à l'ostéoporose, des troubles du sommeil, une modification du métabolisme des lipides et une atrophie génito-urinaire à l'origine de la dyspareunie et de l'incontinence urinaire.

Dans l'industrie animale, l'estradiol est utilisé pour favoriser la croissance des animaux d'élevage.

#### **2.3.4 Description du 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2)**

Le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol [28] est un dérivé de synthèse de l'estradiol. C'est l'estrogène actif le plus utilisé au monde. On le trouve dans presque toutes les formulations modernes des pilules contraceptives combinées, où elle est habituellement administrée en association avec un progestatif de synthèse.

Sa métabolisation se fait par hydroxylation du noyau aromatique et est excrété à la fois dans les fèces et dans les urines sous forme de glucuronide et de sulfate conjugués.

En plus des contraceptifs oraux, le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol est utilisé dans le traitement de l'acné vulgaire d'intensité modérée et dans le soulagement des symptômes de ménopause et de post-ménopause.

### **3. Les principales sources de contamination des hormones œstrogéniques dans l'environnement**

L'augmentation de la population mondiale accompagnée d'un besoin accru de la production alimentaire favorise une augmentation de la production animale, ce qui augmente le potentiel de contribuer à la contamination de l'environnement par les œstrogènes. De plus, un des graves problèmes causés par la thérapie avec les hormones implique la pollution de l'environnement mondial.

Étant donné que ces hormones sont soit produites naturellement ou synthétiquement pour usage comme médicaments, elles sont éliminées par des différentes voies et transmises à l'environnement [29].

Dans de nombreux cas, les eaux usées sont libérées après un traitement plus ou moins élaboré, directement dans les cours d'eau. Les résultats expérimentaux [1] suggèrent la possible présence de certains œstrogènes conjugués pendant tout le processus de traitement des eaux dans les stations d'épuration, parce que le temps requis pour traiter l'eau dans la plupart des usines municipales est inférieur aux demi-vies de déconjugaison des hormones conjuguées aux sulfates. Une étude aux Pays-Bas en 1999 a montré que, dans deux effluents de station d'épuration municipale, les niveaux d'estrone dans des échantillons traités avec enzymes étaient deux fois plus élevés que ceux des échantillons non traités. De façon indirecte, cette étude démontrait l'existence des œstrogènes conjugués dans les stations d'épuration [30]. Pour l'excrétion animale, les hormones se retrouveront dans les fumiers qui seront épandus en milieu agricole et donc, les hormones se retrouveront dans les champs agricoles. Une fois dans les sols, les hormones peuvent atteindre l'eau de surface par l'écoulement et l'érosion ou s'infiltrer dans le sol, et atteindre les eaux souterraines.

D'Ascenzo et al, [8] ont montré que, après moins d'un jour, les œstrogènes sous la forme de glucuronides ne sont plus détectés dans l'échantillon, que le rapport de la déconjugaison des œstrogènes sous la forme de sulfate était beaucoup plus lente et qu'il a fallu plus de 5 à 8 jours avant qu'elles disparaissent dans l'échantillon.

Les tableaux 2, 3 et 4 illustrent, respectivement, les niveaux des hormones conjuguées trouvées dans les eaux usées *in natura* (affluent), dans les eaux usées traitées (effluents), dans l'eau de surface et dans l'eau potable présentés dans la littérature analysée [4, 7, 31-35]. Selon le tableau 1, il est noté que, bien que de telles substances soient présentes dans les eaux usées à des niveaux faibles, elles peuvent arriver aux sources d'eau potable à des concentrations supérieures à 1 ng L<sup>-1</sup>, soit la dose minimale capable de causer un effet biologique comme décrit par Okho et al., 2002 [12].

Tableau 2 - Niveaux des hormones conjuguées trouvées dans les eaux usées *in natura* [4, 7, 31, 32].

Article (Réf.)	Type d'échantillon	Hormones conjuguées (ngL <sup>-1</sup> )											
		E3-3G	E3-16G	E3-3S	E2-3G	E2-17G	E2-3S	E1-3G	E1-3S	E2-3G17S	E2-3S17G	E2-3,17DiS	E3-17G
Gentili, 2002	Entrée	< 15	< 10	< 1.6	< 2.1	< 1.7	< 1.1	6	8	-	-	-	-
Gentili, 2002	Affluent - Station d'épuration	< 15	< 10	< 1.6	< 2.1	< 1.7	< 1.1	3.1	3.9	-	-	-	-
Koh, 2007	Égout	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
Baronti, 2000	Entrée station d'épuration	ND	19	14	5.2	< 3	3.3	4.3	25	-	-	-	-
Baronti, 2000	Réservoir	ND	39	47	9	< 6	9	10	27	-	-	-	-
Liu, 2009	Affluent	4,1 - 73	-	14	5.2	ND	3.3	6	8	-	-	21 - 670	30
		54	-	6,5 - 79	5,3 - 100	-	26 - 410	4.3	25	-	-	289 - 306	-
		ND - 22	-	24.7	0.3	-	3.2	ND - 88	12 - 170	-	-	-	-
		-	-	300 - 333	13.2	-	66.7	0.4	34.1	-	-	-	-
		-	-	-	42 - 52	-	6.4	20 - 26	1.2	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	419 - 957	-	2.9	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	98 - 145	-	-	-	-	

Tableau 3 - Niveaux des hormones conjuguées trouvées dans les eaux usées traitées (effluents) [4, 7, 31-33].

Article (Réf.)	Type d'échantillon	Hormones conjuguées (ngL <sup>-1</sup> )											
		E3-3G	E3-16G	E3-3S	E2-3G	E2-17G	E2-3S	E1-3G	E1-3S	E2-3G17S	E2-3S17G	E2-3,17DiS	E3-17G
Gentili, 2002	Sortie station d'épuration	< 6.00	< 2.00	< 0.42	< 0.60	< 0.52	< 0.22	2.5	2.9	-	-	-	-
Isobe, 2003	Sortie station d'épuration	< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	1.0	< 0.4	2.2	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
	Entrée station d'épuration	< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	< 0.2	< 0.4	0.3	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
Koh, 2007	final effluent final	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-
Baronti, 2000	STP in	ND	19	14	5.2	< 3	3.3	4.3	25	-	-	-	-
Liu, 2009	Effluent	37 - 150	-	2.2	ND	ND	ND	3	3	-	-	160 - 1500	ND
		ND	-	37 - 160	47 - 210	-	27 - 94	0.7	9	-	-	328 - 428	-
		17 - 29	-	0.6	ND	-	ND	34 - 140	7,5 - 34	-	-	-	-
		-	-	50 - 76	ND	-	1.8	ND	0.29	-	-	-	-
		-	-	-	34 - 49	-	3.3	13 - 30	ND	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	57 - 77	-	2.1	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	32 - 42	-	-	-	-

Tableau 4 - Niveaux des hormones conjuguées trouvées dans l'eau de surface et dans l'eau potable [4, 33-35].

Article (Réf.)	Type d'échantillon	Hormones conjuguées (ngL <sup>-1</sup> )											
		E3-3G	E3-16G	E3-3S	E2-3G	E2-17G	E2-3S	E1-3G	E1-3S	E2-3G17S	E2-3S17G	E2-3,17DiS	E3-17G
Isobe, 2003	Rivière	< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.2	< 0.4	0.3	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.7	< 0.4	0.9	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.8	< 0.4	0.8	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
Isobe, 2003	Lac	< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	< 0.2	< 0.4	0.3	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	< 0.2	< 0.4	0.3	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.3	< 0.4	0.4	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.2	< 0.4	0.8	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
		< 2.7	-	< 0.3	< 0.5	< 3.1	0.4	< 0.4	0.8	< 1.6	< 0.3	< 0.7	-
Mozaz, 2004	rivière - février	-	-	-	-	< 2,24	-	-	7	-	-	-	-
	rivière - avril	-	-	-	-	< 2,24	-	-	< 0.53	-	-	-	-
	rivière - mai	-	-	-	-	< 2,24	-	-	4	-	-	-	-
	rivière - juin	-	-	-	-	< 2,24	-	-	6	-	-	-	-
	rivière - juillet	-	-	-	-	< 2,24	-	-	NA	-	-	-	-
	rivière - août	-	-	-	-	< 2,24	-	-	7	-	-	-	-
Liu, 2009	l'eau de surface	NA	-	NA	NA	NA	0,2 - 0,4	NA	0,3 - 0,8	-	-	NA	NA
		-	-	-	-	-	-	-	ND - 7	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	ND - 6,4	-	-	-	-
Kuster, 2009	rivière - gamme	-	0,34 - 2,67	< 0,07	-	1,10 - 7,34	0,59 - 0,85	< 0,28	< 0,16	-	-	-	-
	rivière - concentration moyenne	-	1.97	< 0.07	-	3.5	0.72	< 0.28	< 0.16	-	-	-	-

Ces études montrent que les substances ne sont pas toutes éliminées dans les processus de traitement des eaux et, donc, soient ingérées par le public.

La connaissance des caractéristiques physicochimiques des œstrogènes et de leurs formes conjuguées est d'une importance fondamentale pour que l'on puisse prédire l'avenir de ce groupe de substances dans l'environnement et les meilleures technologies de traitement de l'eau et des eaux usées qui seront utilisées pour les enlever. Étant donné l'importance du squelette pour la diffusion de l'effet biologique, les technologies de traitement des eaux usées et des eaux potables doivent éliminer complètement ces substances ou de promouvoir la destruction de cet anneau par des réactions chimiques [36].

Par ailleurs, certains mécanismes sont impliqués dans l'élimination de ces substances, lorsqu'elles sont dispersées dans l'environnement.

La dégradation est un mécanisme efficace pour éliminer l'adsorption de l'œstrogène dans l'environnement. Des études antérieures ont montré que, dans un jour, environ 88% de l'œstradiol (E2) peut être dégradé en aérobiose et que en cinq jours, 50% est dégradé par voie anaérobie. Toutefois, cette dégradation de l'œstradiol (E2) est accompagnée d'une augmentation de la concentration de l'œstrone (E1) et, par la suite, de la concentration d'autres produits ayant un potentiel œstrogénique [37].

Des études sur la photolyse montrent qu'elle contribue à la dégradation des œstrogènes dans l'eau et présente une demi-vie de 10 jours pour l'œstradiol (E2) et l'œthinylestradiol (EE2) [38].

L'adsorption des sédiments dans le lit d'un cours d'eau est un de ces mécanismes et a lieu principalement dans les 24 premières heures de contact, étant plus rapide pour les hormones avec un plus grand coefficient octanol/eau ( $K_{oc}$ ) et pour des particules de plus petites tailles [38]. Ainsi, une fois que les sédiments ou que la matrice soient saturés (en hormones ou autres), le potentiel d'adsorption est réduit, voir nul. L'augmentation de la salinité favorise également l'adsorption accrue des hormones et des particules de sédiments [39], probablement



en raison de la solubilité réduite des hormones. Un faible taux d'adsorption peut contribuer à l'accès des œstrogènes dans des réserves d'eau souterraines et peut permettre la mobilité de ces hormones dans les couches de sédiments de sources d'eau qui reçoivent une décharge des déchets.

Même s'il existe de nombreuses matières qui présentent une capacité d'adsorption des œstrogènes lorsqu'ils sont présents dans l'eau et peuvent être utilisés dans le traitement conventionnel [40], dans la plupart des cas, l'eau ne reste pas assez de temps à la station d'épuration afin que le processus d'adsorption puisse être utilisé efficacement.

En plus des techniques conventionnelles de traitement des eaux, il y a de nouvelles approches technologiques qui peuvent être utilisées lorsque les techniques conventionnelles ne sont pas applicables.

L'utilisation de membranes pour l'élimination des composés organiques de bas poids moléculaire a été proposée comme une alternative [41]. La nanofiltration présente une capacité d'extraction entre 95 et 99% dans la plage de concentration de 1 à 1000 ng L<sup>-1</sup>.

En relation à la procédure d'osmose inverse, Nghiem et al., 2002 [42] a constaté que la rétention est maintenue au-dessus de 95% et les hormones sont réduites jusqu'à 10% de la concentration initiale en solutions avec un pH supérieur au pK<sub>a</sub> de l'estrone (10.5), à cause d'un désengagement de la formation de liaisons d'hydrogène.

Une autre technique de traitement alternatif qui peut être utilisé est la dégradation par photocatalyse avec oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) [12], ce qui a montré une dégradation de plus de 99% en 30 minutes pour l'EE2 en solution avec une concentration de 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Cependant, le choix du processus de traitement de l'eau est une tâche complexe qui comporte l'examen de plusieurs facteurs. Lors de la définition d'un processus, on doit tenir compte de son efficacité dans l'élimination des contaminants, la zone disponible pour son

installation, les coûts d'exploitation, en particulier l'électricité, et la quantité de déchets générés.

Donc, même si théoriquement est possible d'éliminer un taux élevé d'hormones dans l'eau, dans la pratique, cela est souvent impossible. De plus, économiquement, les couts pour le traitement de l'eau potable permettent des options que l'eau usée ne peut pas se permettre.

## 4. Effets de l'exposition aux hormones œstrogéniques

Parmi les effets potentiellement associés aux perturbateurs endocriniens chez les humains, les références bibliographiques mentionnent principalement les problèmes de fertilité, le développement sexuel précoce ou incomplet, le déficit d'attention ou hyperactivité, l'altération de la fonction corticale de la glande thyroïde et des glandes surrénales et les malformations congénitales [43, 44].

Les données sur la toxicité aiguë du diéthylstilbestrol, qui ont été utilisées pour le maintien de la grossesse chez les patients ayant des antécédents de fausses couches entre les années 1940 et 1960, sont claires. Deux décennies plus tard, il a été découvert que l'exposition néonatale produit un adénocarcinome du vagin chez les jeunes femmes adultes. Au moment de la découverte, le diéthylstilbestrol autant que estradiol (E2) et l'éthinylestradiol (EE2) ont stimulé des changements similaires dans l'appareil reproducteur des animaux de laboratoire [45].

Considérant l'exposition chronique, il y a des évidences que l'augmentation de l'incidence accrue du cancer du testicule et d'autres maladies liées aux pertes de fertilité masculine peut être liée à l'ingestion des œstrogènes dans les aliments ou de l'eau [46].

Une exposition prolongée aux œstrogènes a également été associée à une incidence accrue de cancer du sein chez les femmes [45].

En relation aux autres organismes, la première observation pertinente a été faite en 1994 en Angleterre. À l'époque, il a été observé que les effluents des stations d'épuration sont œstrogéniques pour les poissons. Par la suite, ils ont été séparés et testés dans des essais biologiques en utilisant des levures. Les fractions qui ont montré un potentiel œstrogénique ont été identifiées comme étant le estradiol (E2) et l'estrone (E1) [5]. Ce fait a été confirmé par le constat d'une incidence élevée de l'intersexualité dans les populations de poissons sauvages (carpes, *Rutilus rutilus*) au Royaume-Uni dans les zones exposées au effluents en aval de la station d'épuration des eaux usées [47].

Compte tenu de la sensibilité des organismes aquatiques à ces substances, il y a encore beaucoup de questions sur l'impact des perturbateurs endocriniens présents dans la chaîne alimentaire. Pour les huîtres *Crassostrea gigas*, il a été constaté qu'après 48 heures en contact avec l'hormone (estradiol (E2)) dissous dans l'eau de mer, la concentration dans les tissus mous du mécanisme d'alimentation a augmenté de 31 fois [48].

Les impacts de contamination de l'eau avec l'œstrogène pour la flore n'ont pas encore été totalement clarifiés. Le peu d'informations disponibles montre que, dans la plage de concentrations présente dans les eaux usées ( $0.3 \text{ ug L}^{-1}$  des œstrogènes), la croissance végétative de la luzerne peut être affectée [6].

## **5. Techniques d'extraction, d'enrichissement, de prétraitement et instruments d'analyse utilisés couramment dans la littérature pour quantifier les hormones stéroïdiennes libres et conjuguées**

Une revue de la littérature (environ 200 articles) a indiqué que les œstrogènes ont déjà été analysés par diverses techniques, entre autres GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS, ELISA, LTDT-APCI-MS/MS et des méthodes théoriques [49]. Dans des travaux antérieurs, les œstrogènes et leurs conjugués ont été déterminés en utilisant une technique de dosage radio-immunologique [6, 8] ou encore en utilisant des techniques plus sensibles et sélectives, telles que la chromatographie gazeuse (GC) - spectrométrie de masse (MS), GC-MS/MS ou l'extraction sur phase solide (SPE) suivie par la chromatographie liquide (LC) - MS, SPE-LC-MS/MS [7, 8, 50].

Pour la préparation des échantillons, presque toutes les méthodes reportées utilisent la technique d'extraction sur phase solide (SPE). La technique, les cartouches, les procédures et les solvants varient beaucoup d'une méthode à l'autre, mais, à ce jour, l'extraction manuelle sur phase solide (SPE) est une des méthodes les plus couramment utilisées pour concentrer les analytes et éliminer les interférences de matrice pour atteindre les niveaux de sensibilité analytique souhaités [51-53].

La SPE-LC-MS/MS semble être la technique la plus prometteuse pour effectuer la détection et la quantification des œstrogènes. Il faut considérer que les méthodologies analytiques basées sur la technique de dosage radio-immunologique pourraient surestimer les concentrations d'œstrogènes et que les techniques de GC sont des grandes consommatrices de temps et de main-d'œuvre. De plus, elles nécessitent souvent une préparation d'échantillons supplémentaire (par dérivation) et de l'hydrolyse enzymatique.

Les techniques plus utilisées quand on parle des œstrogènes libres, sont LC-MS ou LC-MS/MS et GC-MS ou GC-MS/MS respectivement. La technique de LC-MS ou LC-MS/MS a été utilisée pour au moins 44 articles répertoriés pendant que la technique de GC-MS ou GC-MS/MS a été utilisée dans environ 35 articles. Par contre, les œstrogènes conjugués, en plus d'être beaucoup moins discutés, ont été analysés par moins de techniques à cause de leurs propriétés chimiques (l'instabilité des composés et la nécessité d'une source d'ionisation négative sont deux des principales raisons).

La revue de la littérature a montré que cinq articles présentent des méthodes en ligne pour l'analyse des œstrogènes libres [54-58]. Cependant, aucune méthode d'extraction SPE couplée à LC-MS/MS en ligne publiée pour la quantification des œstrogènes conjugués n'a été répertoriée.

## **5.1 L'extraction sur phase solide (SPE)**

### **5.1.1 Principes et fonctionnement de l'extraction sur phase solide (SPE)**

#### *a) Historique et développement de la SPE*

Malgré les grands progrès accomplis en matière d'instrumentation analytique, les matrices environnementales dans lesquelles sont recherchés les contaminants organiques restent complexes et présentent des défis substantiels. Souvent, ces contaminants se retrouvent à l'état de traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ) avec plusieurs autres composés interférents. Le besoin d'éliminer ces interférents et de pré-concentrer s'impose donc, afin de détecter et quantifier ces contaminants. Il est estimé que le prétraitement des échantillons constitue les deux tiers du temps total du processus analytique et est souvent considéré comme la première source d'erreurs dans les résultats [59].

Parmi les techniques d'extraction couramment utilisées pour concentrer les analytes, l'extraction liquide-liquide (ELL), l'extraction par fluide supercritique (EFS), l'extraction sur phase solide (SPE) et, plus récemment, la micro extraction sur phase solide (MEPS) sont les plus connues.

L'extraction sur phase solide (SPE) a été introduite en 1976 pour répondre aux inconvénients présentés par l'extraction liquide-liquide, et est aujourd'hui la méthode la plus populaire pour la préparation d'échantillons. La technique de SPE permet l'extraction et/ou la concentration des échantillons complexes où les analytes sont présents à de très faibles concentrations [60, 61].

Les avantages présentés par la SPE en comparaison avec l'extraction liquide-liquide classique sont la consommation inférieure de solvants organiques, l'évitement des émulsions, la facilité d'automatisation, des pourcentages élevés de récupération, la réduction des volumes de déchets toxiques, la capacité d'augmenter sélectivement la concentration de l'analyte et la disponibilité commerciale de nombreux équipements et de sorbants pour la SPE [62]. La SPE présente des inconvénients tels que le temps de préparation, le coût élevé des cartouches et des appareils commerciaux, incluant les collecteurs et, éventuellement, la difficulté dans le choix des absorbants les plus appropriés pour l'application souhaitée. En outre, les cartouches SPE ne sont utilisées qu'une seule fois.

*b) But : concentration, purification, échange de solvants*

Les principaux objectifs de la SPE sont la suppression des interférents de matrice, la concentration, l'isolement des analytes et l'échange de solvants.

L'élimination des interférents est primordiale parce que les analytes d'intérêt sont contenus dans des matrices complexes contenant plusieurs interférents. La purification est réalisée par la rétention des analytes sur la phase solide et rinçage des interférents ou encore, le procédé inverse.

Concernant l'échange de solvants, la plus part du temps, il est nécessaire d'extraire les analytes de la matrice où ils se trouvent, pour les mettre dans une matrice qui est plus compatible avec l'instrument à utiliser.

Comme, normalement, les contaminants se retrouvent à l'état de traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ), pour obtenir une réponse adéquat de l'appareil, il est nécessaire de les isoler et de les concentrer le plus possible. Ceci permettra donc de minimiser les erreurs de précision engendrées par le bruit de fond.

### *c) Fonctionnement et l'optimisation des paramètres SPE*

La SPE est une technique de séparation solide-liquide couramment utilisée pour extraire des analytes semi-volatils et non volatils des échantillons liquides et les mécanismes de rétention sont identiques à ceux que l'on retrouve en chromatographie liquide sur colonne [63].

En général, les procédures d'extraction en phase solide concernent cinq étapes :

- 1) le conditionnement du sorbant avec un solvant approprié pour activer la surface du sorbant et favoriser l'interaction entre le sorbant et les analytes d'intérêts;
- 2) le rééquilibre du sorbant avec le même solvant que celui de l'analyte;
- 2) l'introduction de l'échantillon qui se produit lors de la rétention de l'analyte et parfois de certains interférents;
- 3) le nettoyage de la colonne pour éliminer les interférents, cette étape dite de lavage avec un solvant ou de nettoyage;
- 4) l'élution de l'analyte [64].



Pour optimiser l'extraction on fait varier divers paramètres (phase solide SPE, solvant d'élution, pH d'extraction) pour étudier leur influence sur le rendement d'extraction afin de déterminer le facteur optimal.

### *1) Le choix du sorbant et du solvant*

Les phases solides ou sorbants employés dans la SPE sont similaires à ceux utilisés dans les colonnes de la chromatographie liquide, ainsi, les mécanismes de séparation sont également similaires. Les principaux mécanismes sont les suivants: adsorption, partition (en phase normale et en phase inverse), échange d'ions et exclusion. Ces mécanismes sont associés à des processus chimiques, physiques et mécaniques lors de la séparation. Parmi les principales forces physicochimiques agissant entre les molécules de l'analyte et de l'agent de sorption, il y a des interactions hydrophobiques, les liaisons hydrogène, les interactions dipôle-dipôle, les interactions dipôle induit - dipôle induit et les interactions ioniques.

Le choix du solvant est fait en tenant compte des informations sur l'analyte d'intérêt, la nature de la matrice et les impuretés à être [65]. Les phases solides telles que C8, C18, carbone graphité, résine échangeuse d'ions et des matériaux polymériques tels que styrène divinylbenzène, vendues dans des cartouches et des disques sont les sorbants les plus couramment utilisés pour la SPE [66, 67] dans les analyses environnementales, en particulier dans la pré concentration et l'isolement de pesticides dans l'eau, l'utilisation d'absorbants hydrophobes non sélectifs tels que C18 styrène et de divinylbenzène sont les plus employés. Ces phases servent à isoler l'analyte d'intérêt pour ainsi éliminer les composés qui interfèrent dans la matrice avant l'analyse par chromatographie liquide [68]. Le solvant utilisé dans le conditionnement dépend du sorbant à être activé et de la matrice à traiter. Le choix d'un solvant ayant des caractéristiques similaires à celles du solvant dans lequel est dissous l'échantillon est préféré.

## 2) *L'introduction de l'échantillon*

Le volume de l'échantillon utilisé peut varier de  $\mu\text{l}$  à mL. Afin d'obtenir une efficacité d'extraction maximale, il est nécessaire de déterminer le volume de fuite, qui correspond au volume maximal d'échantillon qui peut être traité pour obtenir le plus grand recouvrement possible de la substance à analyser. La vitesse d'introduction d'un échantillon peut être critique dans certains cas, et est déterminée par la vitesse souhaitée pour analyse.

## 3) *Le nettoyage de la colonne*

Dans la phase de nettoyage (*clean-up*), un solvant ayant une force suffisante pour extraire les interférents, mais pas les analytes d'intérêt, doit être utilisé. Habituellement, le solvant idéal est une solution contenant le même solvant organique de l'extraction de l'échantillon, mais avec un pourcentage plus faible, car il doit décrocher les interférents, mais pas les analytes d'intérêt.

## 4) *L'élution des analytes*

Pour éluer l'analyte d'intérêt, un petit volume d'éluant doit être utilisé, de sorte que la solution éluee soit déjà dans la concentration appropriée pour l'analyse. Si cela n'est pas possible, un solvant volatil doit être utilisé pour l'élution, de sorte qu'il puisse par la suite être facilement évaporé de l'extrait et remis en suspension dans un petit volume de phase mobile. L'éluant doit être capable d'éluer tous les analytes d'intérêt, mais il ne doit pas permettre l'élution des interférences qui n'ont pas été éliminées à l'étape précédente. Le solvant d'élution doit avoir un plus grand pouvoir d'élution que le solvant utilisé dans l'étape précédente, de nettoyage. Il est possible d'obtenir ces caractéristiques en augmentant la quantité ou la concentration du solvant organique ou d'un sel ou encore, en modifiant le pH de la solution d'élution.

Dans la pratique, on constate que, de manière similaire à l'extraction liquide-liquide, l'utilisation de deux aliquotes de l'éluant, au lieu d'un seul plus grand en volume, augmente l'efficacité de l'extraction [69].

Le facteur de pré-concentration ou d'enrichissement en SPE indique l'augmentation de la concentration d'un analyte donné A, dans la solution finale par rapport à sa concentration dans la solution initiale (matrice), il est défini selon l'équation suivante :

$$FP = \frac{[A]_f}{[A]_i} = \frac{v_i}{v_f}$$

FP : facteur de pré concentration

[A]<sub>f</sub>: concentration finale de A

[A]<sub>i</sub>: concentration initiale de A

V<sub>i</sub>: volume initiale

V<sub>f</sub>: volume finale

Dans la figure 4, les principales étapes de la SPE lorsque l'objectif est d'isoler et/ou de concentrer le(s) analyte(s) d'intérêt.

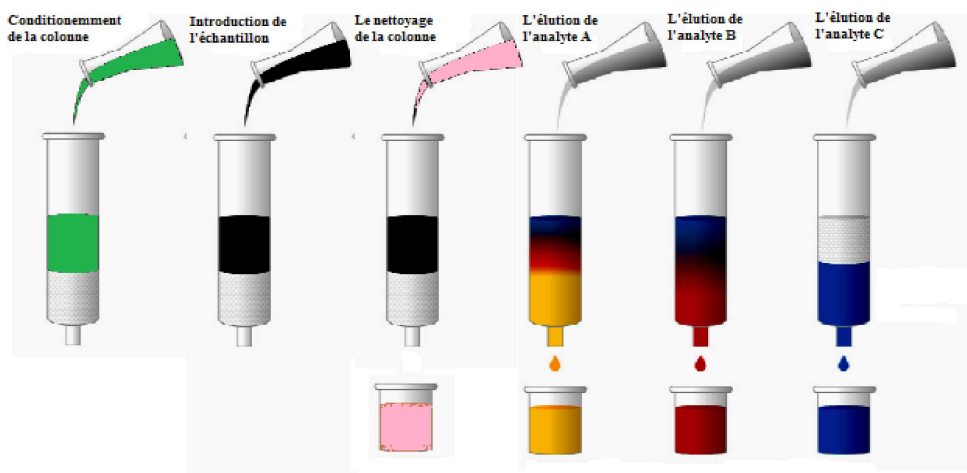


Figure 4 - Étapes de la SPE en mode de concentration ou isolement des analytes d'intérêt (adapté de Waters [70]).

Pour une bonne sensibilité de la méthode, la SPE doit permettre d'extraire et de concentrer le maximum des analytes ainsi que d'éliminer les interférents potentiels. Les travaux récents pour améliorer les performances de la technique de SPE visent la réduction des réactifs, des solvants, et minimiser le volume d'échantillons requis et les temps d'analyse. Dans ce contexte, l'extraction sur phase solide en ligne automatisée permet des gains significatifs.

Un certain nombre de techniques peuvent être considérés comme des formes de SPE en ligne. Celles-ci comprennent la permutation de colonnes, les « *double phase columns* » et les instruments. Les matières ISRP (« *Internal Surface Reversed Phase* ») ont été utilisées avec succès en tant que colonne d'extraction dans divers dispositifs de permutation de colonne.

Bien que les « *double phase columns* » puissent être utilisées pour l'injection directe d'échantillons (mode mono-colonne), elles sont surtout appliquées comme un dispositif d'extraction suivie d'une séparation par chromatographie liquide d'haute efficacité (HPLC) classique. L'objectif est d'utiliser une petite colonne de SPE garnie d'une phase stationnaire spéciale retenant sélectivement les analytes cibles à partir de la matrice de l'échantillon. Les analytes ainsi piégés et enrichis sont ensuite transférés dans un mode de rétro-lavage à une colonne analytique HPLC classique pour la séparation et la détection. Les deux colonnes sont commandées par une soupape de permutation multi-positions. Cette technique est couramment appelée SPE-LC en ligne, c'est la technique sélectionnée pour ce projet [70].

### **5.1.2 SPE manuelle et SPE en ligne**

Normalement, le système d'extraction en phase solide (SPE) est couplé à une technique analytique après l'étape l'élution des analytes. Dans la SPE hors ligne, le procédé est manuel et consiste en une étape complètement indépendante de l'analyse, alors que dans la SPE en ligne, après l'extraction, les analytes sont automatiquement dirigés vers la technique analytique. Les deux procédés suivent les mêmes étapes et sont régis par la même théorie.

Dans la technique en ligne, les étapes d'extraction, d'enrichissement, de nettoyage (« *clean-up* ») et d'analyse des composés d'intérêt peuvent être réalisées en ligne (« *on-line* »), sans que l'extrait doive être transféré manuellement à partir de la cartouche SPE à la colonne analytique.

L'automatisation de la préparation de l'échantillon a plusieurs avantages. La SPE manuelle reste une procédure longue, laborieuse à réaliser et qui comporte beaucoup d'étapes. Ce qui peut induire à une éventuelle contamination et à des erreurs dans les résultats. Le débit est difficile à contrôler ce qui affecte la reproductibilité. Le nombre d'échantillons est aussi limité [59, 71]. Seule une petite fraction de l'extrait peut être utilisée dans l'analyse. Une éventuelle perte des analytes peut également se produire lors de l'étape d'évaporation. Le temps nécessaire pour traiter un seul échantillon par SPE en ligne est beaucoup plus petit que le temps d'extraction avec les cartouches. En plus, le système en ligne peut fonctionner en continu et effectuer l'extraction et l'analyse successif des échantillons [71]. Dans le tableau 5, les caractéristiques de la SPE en ligne sont comparées à la SPE manuelle.

D'autre part, la technique SPE manuelle requiert des investissements d'équipements moins dispendieux que sa version en ligne et possède un plus grand éventail de sorbants (la phase stationnaire). La procédure SPE manuelle permet aussi l'utilisation d'une plus grande variété de solvants, étant donné que le procédé est complètement indépendant de l'analyse. De plus, le volume d'échantillon analysable peut varier de millilitres (mL) aux litres (L). Les limites de détection sont habituellement plus grandes (moins performantes) que celles de la SPE manuelle. Une sérieuse limitation posée par les volumes de fuite (« *breakthrough volumes* ») empêchent d'utiliser de grands volumes pour pré concentrer en SPE en ligne.

Dans la configuration en ligne, le système d'extraction en phase solide est partie intégrante d'un système chromatographique. L'échantillon est introduit dans la boucle d'échantillons et, après le prélèvement, il est directement relié à la ligne de la phase mobile qui agit comme un éluant. Dans la plupart des systèmes d'extraction en ligne, la technique appelée permutation de colonne est utilisée. Cette technique comprend tous les procédés dans lesquels la direction d'écoulement de la phase mobile est modifiée par l'action d'une vanne rotative où

l'effluent provenant d'une colonne est déplacé vers une autre colonne après un certain intervalle de temps. La première colonne est souvent de basse efficacité et permet le pré-enrichissement ou la concentration de l'échantillon. La fraction contenant les analytes d'intérêt est transférée à une seconde colonne qui a une haute efficacité et sépare les analytes [72].

Bien que l'utilisation de l'automatisation dans l'extraction par phase solide (SPE en ligne) soit en augmentation, la technique n'a pas encore été largement utilisée. En 2000, il n'y avait encore que quelques publications d'articles où la SPE en ligne est utilisée [71]. Aujourd'hui, il est plus fréquent de trouver des publications utilisant la technique de la SPE automatisée dans divers domaines, en particulier pour l'analyse des pesticides [73-75].

Tableau 5 - Tableau comparatif des principales caractéristiques de la SPE manuelle et de la SPE en ligne.

<b>SPE manuelle</b>	<b>SPE en ligne</b>
Deux étapes distinctes pour avoir le résultat analytique : extraction et analyse.	Analyse de l'échantillon au complet (extraction est incluse dans le même « système »).
Un grand volume d'échantillon est nécessaire.	Un petit volume d'échantillon est suffisant pour une bonne sensibilité.
Cartouches jetables.	Colonnes réutilisables.
Extraction en séquence et la possibilité d'utiliser différents combinaisons de cartouches en série.	Moins de flexibilité.
Manipulation de l'échantillon. Possibilité de contamination. Moins de précision et exactitude dans les résultats.	Automatisation et besoin d'un minimum de volume d'échantillon. Résultats avec une meilleure précision et une meilleure exactitude.
Risque de dégradation de quelques composés (temps d'analyse plus long).	Élution rapide de l'échantillon après pré-concentration. Dégradation minimale.

Continuation du tableau 5 – Tableau comparatif des principales caractéristiques de la SPE manuelle et de la SPE en ligne.

<b>SPE manuelle</b>	<b>SPE en ligne</b>
Nécessite beaucoup de solvants organiques.	Minimum de solvants nécessaires. Éluion avec la phase mobile.
Possibilité de perte d'analytes par évaporation.	Il n'y a pas d'étape d'évaporation.
Possibilité de réanalyser le même extrait SPE.	Possibilité de refaire les analyses en utilisant exactement les mêmes échantillons.
Temps de préparation long.	Peu de préparation d'échantillon nécessaire.
Disponibilité de kits SPE pour réalisation des extractions « in situ » (dans le terrain).	Grande capacité de traitement (extraction et analyse en séquence de plusieurs échantillons).
Système moins coûteux.	Nécessite plus d'investissement en équipement.

## **5.2 La chromatographie liquide accouplé à la spectrométrie de masses en « tandem » (LC-MS/MS)**

### **5.2.1 Historique de la chromatographie liquide (LC)**

Chromatographie vient du grec (« *chroma* », couleur et « *graphein* », graphie). La chromatographie est une technique de séparation analytique répandue et beaucoup utilisée aujourd'hui en raison de sa facilité, sa fiabilité et sa capacité de séparation d'un mélange. La mise en place de cette technique est attribuée au botaniste russe Mikhail S. Tswett au début du XXe siècle. Il a étudié les pigments des feuilles extraites de plantes et son premier travail de chromatographie a été présenté à la Société de Scientifiques Naturelles de Varsovie en 1903.

Tswett a souligné que les substances séparées par chromatographie sont au moins aussi pures que celles obtenues par des moyens traditionnels, par exemple par des réactions chimiques, la distillation et la recristallisation. En fait, aujourd'hui encore, la préparation de substances pures par chromatographie est encore utilisée, soit pour des caractérisations chimiques ou pour l'utilisation en tant qu'étalons analytiques [76].

Le premier chromatographe en phase liquide automatique avec un gradient d'élution et un système de dérivation post-colonne a été conçu par Moore et Stein, avec la collaboration de Darrel H. Spackman, pour analyse d'acides aminés. Le contexte et les découvertes qui ont mené à la publication en 1958 [77] avec la description de cet équipement est un autre jalon important dans l'histoire de la chromatographie en phase liquide.

L'ingéniosité des scientifiques Stein et Moore, incluant le choix du sujet, acides aminés, a conduit à une meilleure séparation chromatographique et à l'automatisation de l'ensemble du processus. Cette automatisation a permis de concevoir et de construire le premier système chromatographique. Entièrement adapté aux besoins et sans aucune protection de la propriété intellectuelle, ce système est le modèle le plus complet, développé et a certainement inspiré de nombreux chercheurs et les entreprises de l'instrumentation scientifique.

Le développement de l'industrie pharmaceutique, de la médecine et de la chimie, en particulier la chimie des produits naturels, en plus de la surveillance de l'environnement, serait pratiquement impossible sans l'utilisation de plusieurs techniques chromatographiques disponibles [78].

### **5.2.2 Principe et fonctionnement de la chromatographie liquide (LC)**

La chromatographie liquide est une méthode physicochimique de séparation à partir de la migration différentielle des composants d'un mélange suite aux différentes interactions entre deux phases non miscibles : phase mobile et phase stationnaire. La séparation des composés est faite par l'affinité de ces composés présents dans la phase mobile (liquide) avec la phase



stationnaire (colonne), en produisant de temps de rétention différents. Elle est utile pour séparer des ions ou des molécules qui sont dissous dans un solvant. Quand l'échantillon est en contact avec une phase solide ou une phase liquide, les ions et/ou molécules présents vont interagir entre eux à des degrés distincts en conséquence de différences dans l'adsorption, dans l'échange d'ions, dans la répartition ou dans la taille. Ces différences vont permettre la séparation des analytes.

Les phases stationnaires typiques (et leurs interactions avec les solutés) sont: solides (adsorption), groupes ioniques sur une résine (échange d'ions), liquides sur un appui solide inerte (partitionnement), et des particules inertes poreux (taille-exclusion). Le mélange à séparer est chargé sur le sommet de la colonne, suivi par l'addition de solvant. Les différents composants dans le mélange de l'échantillon passent à travers la colonne à des vitesses différentes en raison des différences dans leur comportement de partitionnement entre la phase liquide mobile et la phase stationnaire. Les composés sont séparés par la collecte des aliquotes de l'effluent de la colonne en fonction du temps.

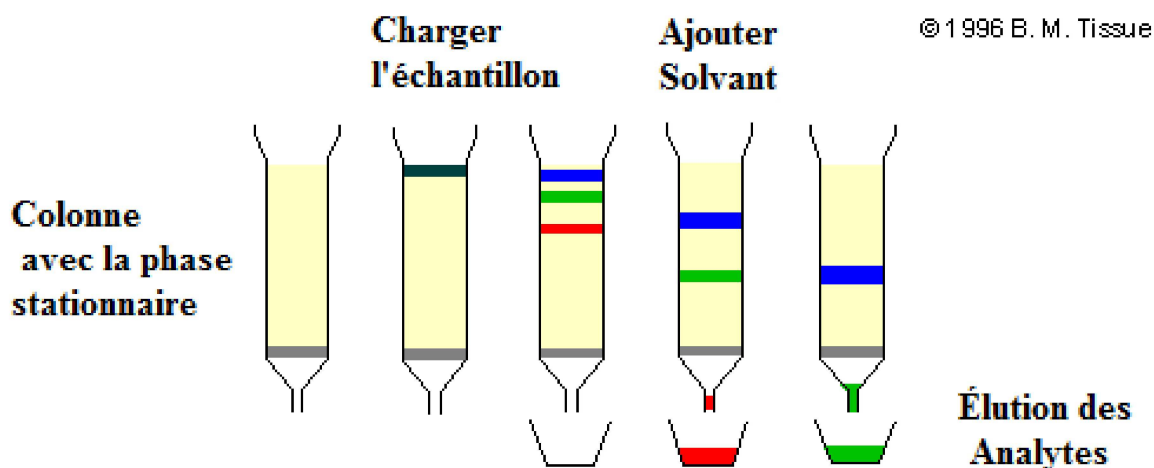


Figure 5 - Schéma d'une séparation chromatographique simple en phase liquide. Copyright © 2013 by Brian M. Tissue, all rights reserved [80].

La chromatographie peut être utilisée pour l'identification de composés par comparaison avec des étalons, des substances déjà connues, et pour la purification des composés en utilisant la séparation de composants d'un mélange. Elle est également utilisée dans les séparations en ultra-traces où de petites colonnes jetables sont utilisées une fois et jetées ensuite. La séparation analytique de solutions pour la détection ou/et la quantification des composantes utilisent généralement des instruments plus sophistiqués de chromatographie liquide de haute performance. Les instruments HPLC utilisent une pompe pour pousser la phase mobile, offrent une résolution plus élevée et sont un équipement plus rapide d'analyse.

En LC, trois critères contradictoires sont exigés pour mener à bien une analyse chromatographique: la résolution (pics étroits et bien séparés), le temps d'analyse (critère de rapidité) et la quantité minimale à injecter (critère de sensibilité). Si on porte l'accent sur un critère, les 2 autres sont automatiquement défavorisés, ainsi :

- Si on privilégie la sensibilité pour quantifier les composés présents à basse concentration, il faut souvent injecter une grande quantité d'échantillon. Dans ce cas, la colonne peut se saturer (des autres composés présents en concentrations beaucoup plus élevés) et la résolution diminue ;

- Si le temps d'analyse est privilégié, on utilise des colonnes courtes et la résolution chute.

- Si on favorise la résolution, on utilise une colonne plus longue et de plus faible diamètre intérieur, mais on doit, probablement, pour ne pas saturer la colonne, injecter moins d'échantillon ce qui fait diminuer la sensibilité. C'est le contraire du cas antérieur. De plus, cela augmente le temps d'analyse.

Les trois paramètres sont donc à optimiser et un compromis doit être fait pour obtenir les résultats souhaités.

Pour optimiser la séparation, on fait varier divers paramètres (colonne, phase mobile, volume d'injection,...) pour étudier leur influence sur la résolution afin de déterminer la combinaison la plus optimale.

Bien qu'une excellente technique de séparation, l'HPLC nécessite une technique de confirmation lors d'une analyse quantitative (confirmation de l'identité chimique). Parmi les diverses options, la spectrométrie de masse (MS) est la technique qui fournit les meilleures informations structurales. Le couplage entre ces deux techniques donne un outil analytique polyvalent avec un grand potentiel dans l'analyse qualitative et quantitative: LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse).

### 5.2.3 Historique de la spectrométrie de masses (MS)

L'histoire de la spectrométrie de masse moderne est généralement considérée comme ayant débuté avec des expériences de J.J. Thomson sur les rayons cathodiques. En appliquant un champ électrique dans le tube, Thomson, en 1897, a observé une déviation d'électrons à l'intérieur du même tube (figure 6), ce qui est considéré comme l'une des premières déterminations du rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Thomson a remporté le prix Nobel de physique en 1906 pour ces études.

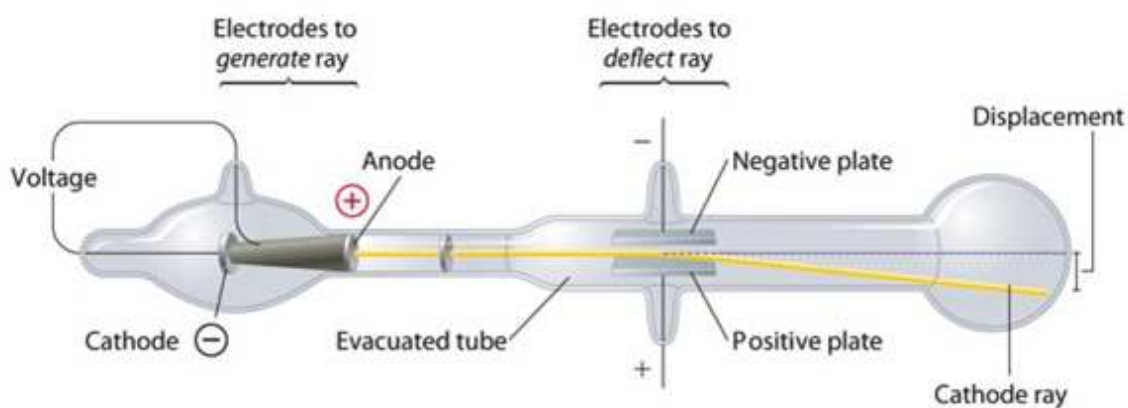


Figure 6 - Schéma des expériences de J.J. Thomson auprès de rayons cathodiques. Le montage durant l'application du champ électrique et la déviation d'électrons avec l'application du champ [79].

Tableau 6 - Principales améliorations dans le développement de la spectrométrie de masse et les progrès de la technique.

<b>Date</b>	<b>Contribution</b>
1897	J.J. Thomson réalise des expériences avec tubes des rayons cathodiques, lesquels sont considérés comme le début de la spectrométrie de masses en Manchester, Angleterre.
1953	W. Paul invente le quadropôle et la trappe ionique en Allemagne.
1968	M. Dole développe l'électrospray aux États-Unis.
1974	Horming développe l'APCI aux États-Unis.
1983	Vestal développe le thermospray aux États-Unis.
1984	J. Fenn démontre l'applicabilité pratique de la technique d'électrospray.
1987	K. Tanaka découvre la désorption laser et M. Karas, D. Bachman, U. Bahr, F. Hillenkamp améliore cette technique avec l'utilisation d'une matrice. Tanaka obtient le Prix Nobel de chimie en 2002.
1988	J. Fenn développe la méthode d'ionisation par nébulisation électrostatique (electrospray) d'après un concept proposé par M. Dole en 1968. Fenn obtient le prix Nobel de chimie en 2002
1999	A.A. Makarov présente un nouveau type d'analyseur Orbitrap basé sur un champ électrostatique quadrolarithmique.

## 5.2.4 Principe et fonctionnement de la spectrométrie de masse en tandem

Le principe de base de la spectrométrie de masse est de générer des ions à partir soit des composés inorganiques ou organiques par tout procédé approprié, de séparer ces ions par leur rapport  $m/z$  et de les détecter qualitativement et quantitativement selon leur rapport  $m/z$  et leur abondance [1]. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour permettre l'ionisation, la séparation et la détection des ions dans la phase gazeuse pour la spectrométrie de masse.

Un spectromètre de masse est constitué d'une source d'ions, d'un analyseur de masse et d'un détecteur qui sont exploités dans des conditions de vide. Des systèmes plus récents ont aussi un système de données utilisé pour collecter et traiter des données provenant du détecteur.

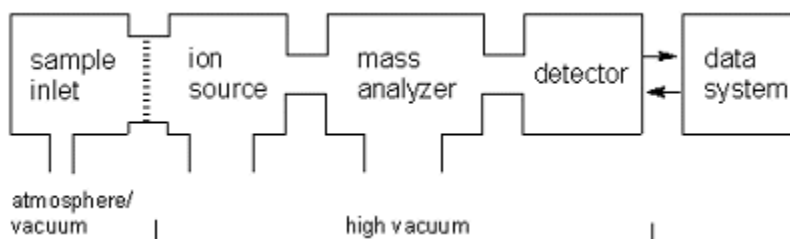


Figure 7 - Vision générale d'un spectromètre de masse [80].

En Spectrométrie de masses en tandem (MS/MS), il est essentiel de produire des ions précurseurs facilement identifiables de l'analyte d'intérêt (ions moléculaires, pseudo moléculaires, adduits,...) ainsi que des ions fragments issus de la dissociation par collision de ceux-ci. Les ions peuvent être obtenus en utilisant différentes techniques d'ionisations : impact électronique, ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), désorption laser avec matrice (MALDI), bombardement d'atomes rapides (FAB), photoionisation à pression atmosphérique (APPI) et nébulisation électrostatique (ESI).

Dans la nébulisation électrostatique (ESI), technique utilisée pour l'ionisation dans ce projet, les analytes avec les solvants provenant du système analytique sont nébulisés dans une

chambre à pression atmosphérique. Une différence de potentiel élevée de l'ordre de  $\pm 2$  kV à  $\pm 5$  kV [79] est appliquée à l'extrémité de l'émetteur, qui est un fin tube capillaire en acier inoxydable.

Lors de l'électro nébulisation, le mélange contenant les analytes d'intérêt est alors transformé en un nuage de fines gouttelettes chargées (« *spray* ») qui se forment à l'extrémité du capillaire. Ces gouttelettes chargées sont rapidement dispersées suite à l'évaporation du solvant et accélérées (augmentation du débit) par l'utilisation d'un courant d'air co-axial et par la collision avec les molécules environnantes à pression atmosphérique. Ceci conduit à la réduction de la taille des gouttelettes. Ces gouttelettes, devenant trop petites, sont sujettes à une explosion coulombienne, lorsque la limite de Rayleigh est atteinte où le champ électrostatique devient plus grand que la tension de surface qui maintient l'intégrité de ces microgouttelettes. À ce moment, des microgouttelettes constituées de molécules protonnées  $[M+nH]^{n+}$  ou déprotonnées  $[M-nH]^{n-}$  (le cas de ce projet) et porteuses de charges simples ou multiples sont libérées. Les ions gazeux, ainsi produits, sont ensuite transférés de la chambre d'ionisation à pression atmosphérique vers l'analyseur de masse où la pression est basse et est de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  Torr (vide secondaire).

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'émission des gouttelettes et donc, ces paramètres doivent être optimisés pour permettre la meilleure ionisation des analytes et donc l'obtention d'un meilleur signal.

Pour optimiser la détection MS/MS, il faut varier les paramètres MS de la source d'ionisation (courant de décharge, température du tube de transfert...) et les paramètres de MS/MS spécifiques à l'analyte (énergie de collision, tube lens...) pour étudier leur influence sur l'abondance ionique.

En outre, plus le débit de l'échantillon est grand, plus la désolvatation devient difficile ce qui va directement influencer le signal. Également, le pourcentage eau/solvant organique constituant la phase mobile est un paramètre important, car le pourcentage d'eau élevé au départ du gradient influence l'ionisation des analytes qui sont élués en premier sur la colonne

analytique. Tous ces paramètres ont été optimisés et les valeurs ont été choisies en faisant un compromis pour obtenir les meilleurs résultats pour l'ensemble des composées à être analysés.

### **5.2.5 Système LC-MS/MS utilisé dans le projet**

Le système LC-MS/MS utilisé pour la réalisation de ce projet est composé d'un système chromatographique en phase liquide couplé à un spectromètre du type triple quadripôle placé en série (tandem) et doté d'une source d'ionisation à électro nébulisation (« *electrospray* »). La figure 8 montre un schéma de l'instrumentation utilisée.

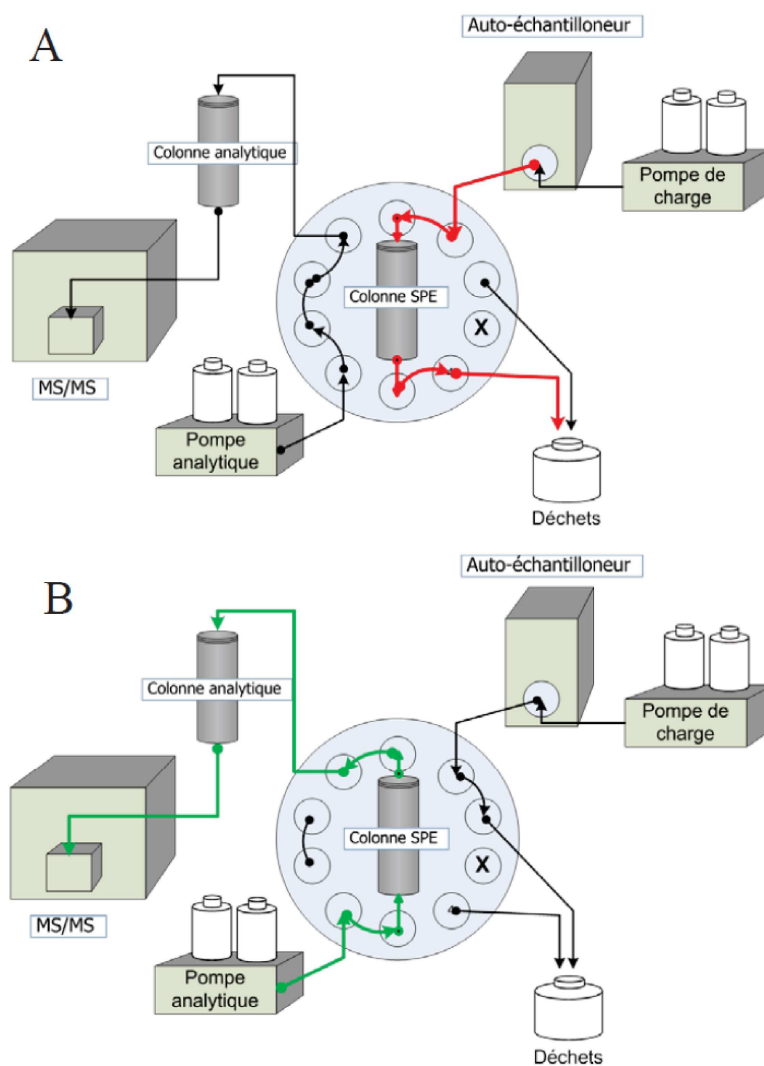


Figure 8 - Schéma de l'instrumentation utilisée dans ce projet, adapté du mémoire de F. Rabii [59]. A - Injection de l'échantillon et rétention des analytes dans la colonne de charge (SPE). B - Séparation analytique et envoi des analytes vers le système MS/MS.

Le système chromatographique en phase liquide a été composé des boucles de 1 mL, 2 mL et 5 mL (dépendant du volume d'échantillon à être injecté), deux valves, une seringue d'injection en verre de 2.5 mL et deux pompes: une sur la colonne d'extraction pour le chargement de l'échantillon (SPE) et l'autre sur la colonne d'élution pour faire l'élution et la séparation des analytes.



Après le choix du volume à être analysé (boucles de 1 mL, 2 mL et 5 mL), l'injection de l'échantillon est faite en utilisant la seringue de 2.5 mL à partir de la première valve avec l'aide de la première pompe vers la colonne de charge en utilisant la deuxième valve. Le volume d'injection est toujours plus grand que le volume désiré pour garantir que la boucle soit bien remplie. Quand le volume à être analysé est plus grand que le volume de la seringue, plus d'une injection est réalisée. Le volume excédant est rejeté. L'utilisation d'un solvant à base de l'eau HPLC avec 0.1% de NH<sub>4</sub>OH pour compléter le processus de « *switch valve* » (ou changement de valve) est fait jusqu'au moment où les analytes sont retenus dans la colonne de charge en fonction de l'affinité avec la phase stationnaire.

Après que les analytes soient capturés par la colonne de charge, une deuxième pompe, en mode « *back-flush* » (rétrolavage), rentre en fonction pour envoyer les analytes vers la colonne analytique, où la séparation sera effectuée. L'élution des analytes est réalisée dans un temps optimal de 15 minutes, soit 10 minutes pour la séparation et 5 minutes de pour la stabilisation du système. La phase mobile est constituée des mêmes solvants utilisés dans l'extraction. Un solvant A, l'eau grade HPLC avec 0.1% NH<sub>4</sub>OH, et un solvant organique B, MeOH avec 0.1% NH<sub>4</sub>OH, ont été utilisés. En plus, le lavage de la seringue d'injection, de la boucle et de la première valve moyennant un mélange de solvants organiques (isopropanol/méthanol/ACN) dans un premier temps et puis de l'eau HPLC dans un deuxième temps est réalisé dans le but d'éviter une éventuelle contamination que certains composés peuvent causer (« *carry-over* »).

Le système MS/MS utilisé dans ce projet est un spectromètre de masse du type triple quadripôle placé en série (« *tandem* »), QqQ. Ce système est composé d'une source d'ionisation du type électro-nébulisation (« *electro-spray* ») et de deux analyseurs de masses séparés par une cellule de collision. Pour l'ionisation des stéroïdes conjugués, on a utilisé une ionisation de type électro-nébulisation en mode négatif en utilisant un potentiel de l'ordre de 3500 V. Un schéma du triple quadripôle QqQ utilisé (Thermo) peut être visualisé dans la figure 9.

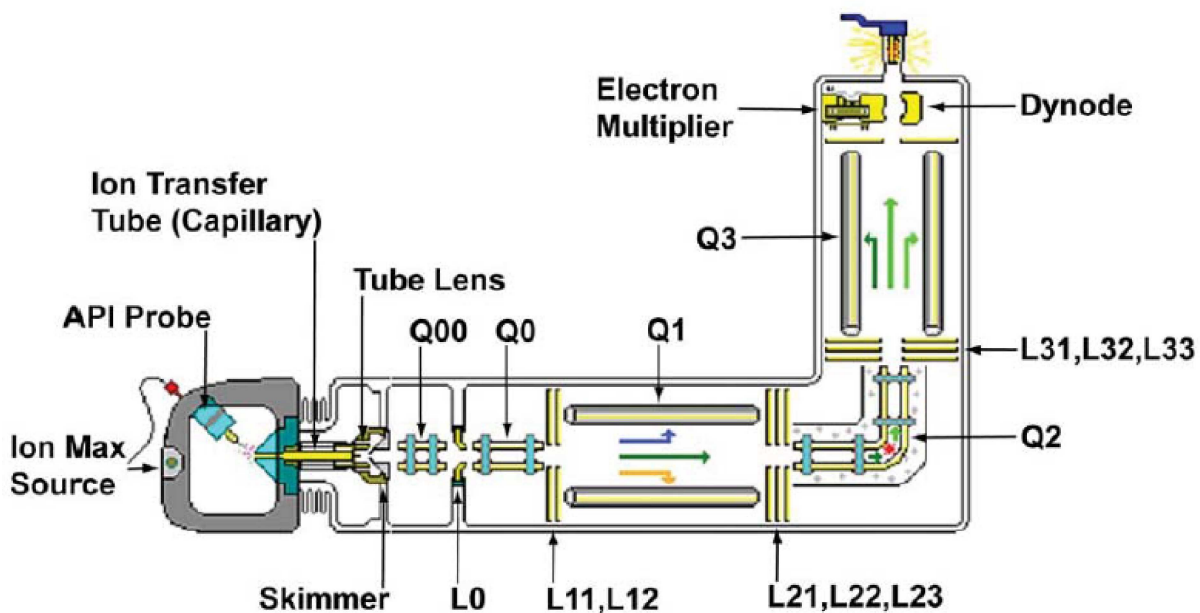


Figure 9 - Triple quadrupôle (TSQ\_Quantum) (Guide de référence de Thermo).

Le balayage d'ions fragments sélectionnés (SRM – « *Selected Reaction Monitoring* ») est l'un des différents types d'acquisition des ions possible par le triple quadripôle [80]. Ce mode a été utilisé pour l'analyse quantitative des molécules dans le cadre de ce projet.

Les ions provenant de la source entrent dans Q1, où les analytes d'intérêt appelés ions parents ou ions précurseurs sont sélectionnés selon la valeur de leurs rapports  $m/z$ . Ensuite, ils sont ensuite envoyés vers q2 (cellule de collision) où ils sont fragmentés par dissociation de collision induite (CID) à l'aide d'un gaz inerte, l'argon. En effet, à l'intérieur de q2, les ions sont accélérés suite à l'application d'une différence de potentiel qui va induire des collisions entre les ions et le gaz; les ions fragments appelés ions fils sont alors générés.

Les ions « fils » sont filtrés à leur tour par l'analyseur Q3 selon leurs  $m/z$  et détectés par un électron multiplicateur. Une cascade d'électrons est produite pour chaque ion qui frappe le détecteur induisant ainsi un courant qui est traduit par un signal d'intensité variable.

Deux SRM ont été choisies par composé étudié. Il s'agit des fragments les plus intenses, donc la première SRM qui constitue le fragment le plus abondant a été utilisée pour la quantification et la deuxième SRM pour la confirmation.

## **6. Simultaneous analysis of steroid hormones and their conjugated forms in different water matrices and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry.**

**Avant-propos:** L'article présenté ci-dessous décrit le développement d'une méthode pour l'analyse simultanée des hormones stéroïdiennes libres et conjuguées. La technique consiste d'une extraction en phase solide en ligne (SPE) couplée à la chromatographie liquide (LC) avec détection par spectrométrie de masse en tandem. (MS/MS). Ce système a été utilisé pour la détection et quantification de neuf hormones stéroïdes dans des échantillons d'eaux usées, d'effluents, d'eau potable et d'urine.

La revue bibliographique pertinente, la préparation des échantillons, les analyses ainsi que toutes les manipulations en laboratoire ont été effectuées par l'auteure de ce mémoire (1<sup>ère</sup> auteure de l'article). La totalité des compilations de résultats et de leur interprétation a aussi été effectuée par l'auteure de ce mémoire. Les coauteurs ont été des conseillers scientifiques pour la rédaction et la correction de cet article. Dr. Paul Fayad (coauteur) m'a enseigné, m'a assisté et m'a conseillé dans l'utilisation des instruments analytiques et occasionnellement pour l'interprétation des résultats et des idées d'amélioration du projet.

Il est à noter que les références associées à cet article ont été intégrées, sous un format uniforme, à la bibliographie située à la fin du mémoire. À titre d'information, l'article qui suit a été soumis au journal scientifique *Chemistry Central Journal*.

# **Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry.**

A. Clemente Naldi<sup>1</sup>, P. Fayad<sup>1</sup>, M. Prévost<sup>2</sup>, S. Sauvé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Université de Montréal, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Civil, Geological and Mining Engineering, Polytechnique Montréal, Montreal, QC, Canada

## **Abstract**

### Background:

In recent years, endocrine disrupting compounds (EDCs) have been found in rivers that receive significant inputs of wastewater. Among EDCs, natural and synthetic steroid hormones are recognized for their potential to mimic or interfere with normal hormonal functions (development, growth and reproduction), even at ultratrace levels ( $\text{ng L}^{-1}$ ). Although conjugated hormones are less active than free hormones, they can be cleaved and release the unconjugated estrogens through microbial processes before or during the treatment of wastewater. Due to the need to identify and quantify these compounds, a new fully automated method was developed for the simultaneous determination of the two forms of several steroid hormones (free and conjugated) in different water matrixes and in urine.

### Results:

The method is based on online solid phase extraction coupled with liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). Several parameters were assessed in order to optimize the efficiency of the method, such as the type and flow rate of the mobile phase, the various SPE columns, chromatography as well as different sources and ionization modes for MS. The method shows good linearity ( $R^2 > 0.993$ ) and precision with a coefficient of variance of less than 10%. The quantification limits vary from a minimum of 3 to 15  $\text{ng L}^{-1}$  for an injection volume of 1 mL and 5 mL, respectively, with the recovery values of the compounds varying from 72% to 117%.

### Conclusion:

The suggested method was validated and successfully applied for the simultaneous analysis of several steroid hormones in different water matrixes and in urine.

**Keywords:** Conjugated steroid hormones, solid phase extraction (SPE), Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), wastewater, river water, urine, estrogens.

## Background

In the past decades, endocrine disrupting compounds (EDCs) have been observed in rivers that receive significant inputs of wastewater effluents. EDCs are chemicals with the potential to cause negative effects on the hormonal functions of humans and other animals with potentially harmful consequences, such as development and growth problems, hermaphroditism, decreased fertility and feminization [3, 81]. Among the large number of chemicals potentially responsible for endocrine disruption in wildlife, natural and synthetic estrogenic hormones are considered as a matter of concern by scientists, water quality regulators and the general public [5]. Estrogens are known EDCs at the sub ng L<sup>-1</sup> level [2, 5], while most of the other chemicals having an estrogenic effect are usually biologically active around the mg L<sup>-1</sup> level [82, 83].

Humans produce and excrete large quantities of endogenous estrogenic hormones. These natural hormones are excreted as sulfate or glucuronide conjugates mainly in urine [84, 85]. Synthetic estrogens are also of great interest due to their high estrogenic potency and the extent of their use. They are used not only as contraceptives, but also for therapeutic purposes, in the management of hormone replacement therapy for menopausal women or in the treatment of various cancers, such as prostatic and breast cancer [81].

The contamination of the environment by estrogens can take place through the application of biosolids from municipal WWTP (wastewater treatment plant) on agricultural fields. However, the main pathway is usually through wastewater effluents, which after incomplete removal of these compounds in the municipal WWTP, are released into the receiving waters [86, 87].

Although the conjugated estrogens are recognized to be less active than free (non-conjugated) estrogens, they can be cleaved to free estrogens. The presence of free estrogens in WWTP effluents and rivers [5-7, 30, 50, 86, 87] indicates that estrogen metabolites could be

converted back into active form before being released into the rivers. The cleavage of conjugated to free estrogens in the environment has not yet been well documented. Different hypotheses are suggested in the literature and microbial processes before or during sewage treatment is the most accepted hypothesis [47, 88]. *Escherichia coli* is known to be able to synthesize large amounts of the  $\beta$ -glucuronidase enzymes [89], and this has been suggested as the most probable mechanism responsible for the transformation.

Accurate detection and quantification of free and conjugated estrogens in rivers and wastewater is difficult to perform. Indeed, the matrix complexity, the need to concentrate the samples due to the low concentration of the compounds, and the importance of sample integrity to avoid compound degradation have to be considered. Previously, estrogens and their conjugates were determined by using a radioimmunoassay technique [6] or even by using more sensitive and selective techniques, such as gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) [90, 91], or solid phase extraction (SPE) coupled to liquid chromatography and tandem mass spectrometry, SPE-LC-MS/MS [7, 50].

SPE-LC-MS/MS seems to be the most promising currently available analytical technique to perform the detection and quantification of estrogens, since analytical methodologies based on radioimmunoassay techniques might overestimate estrogen concentrations and the GC techniques can be time-consuming and labor-intensive, often requiring derivatization and enzymatic hydrolysis prior to analysis.

To date, off-line SPE is one of the most common methods used to concentrate analytes and remove matrix interferences to achieve the desired levels of analytical sensitivity [51, 52]. However, this process can be labor-intensive, often requires many steps and normally necessitates a large sample volume. The development of on-line SPE methods, by coupling SPE to the LC system using a column-switching technique, is an important step for the study of conjugated and free estrogens in the environment, considering the advantages compared to traditional off-line SPE methods. It eliminates several required steps (namely evaporation and reconstitution), reduces sample manipulation as well as preparation time in comparison to off-line SPE. The automation aspect of on-line SPE results in better repeatability and



reproducibility, which helps to improve the quality of the analytical data reported. Higher sample throughput increases the number of samples that can be analyzed in a single day. In addition, smaller sample volume and solvent requirements reduce the costs of consumables and the environmental footprint [9, 92].

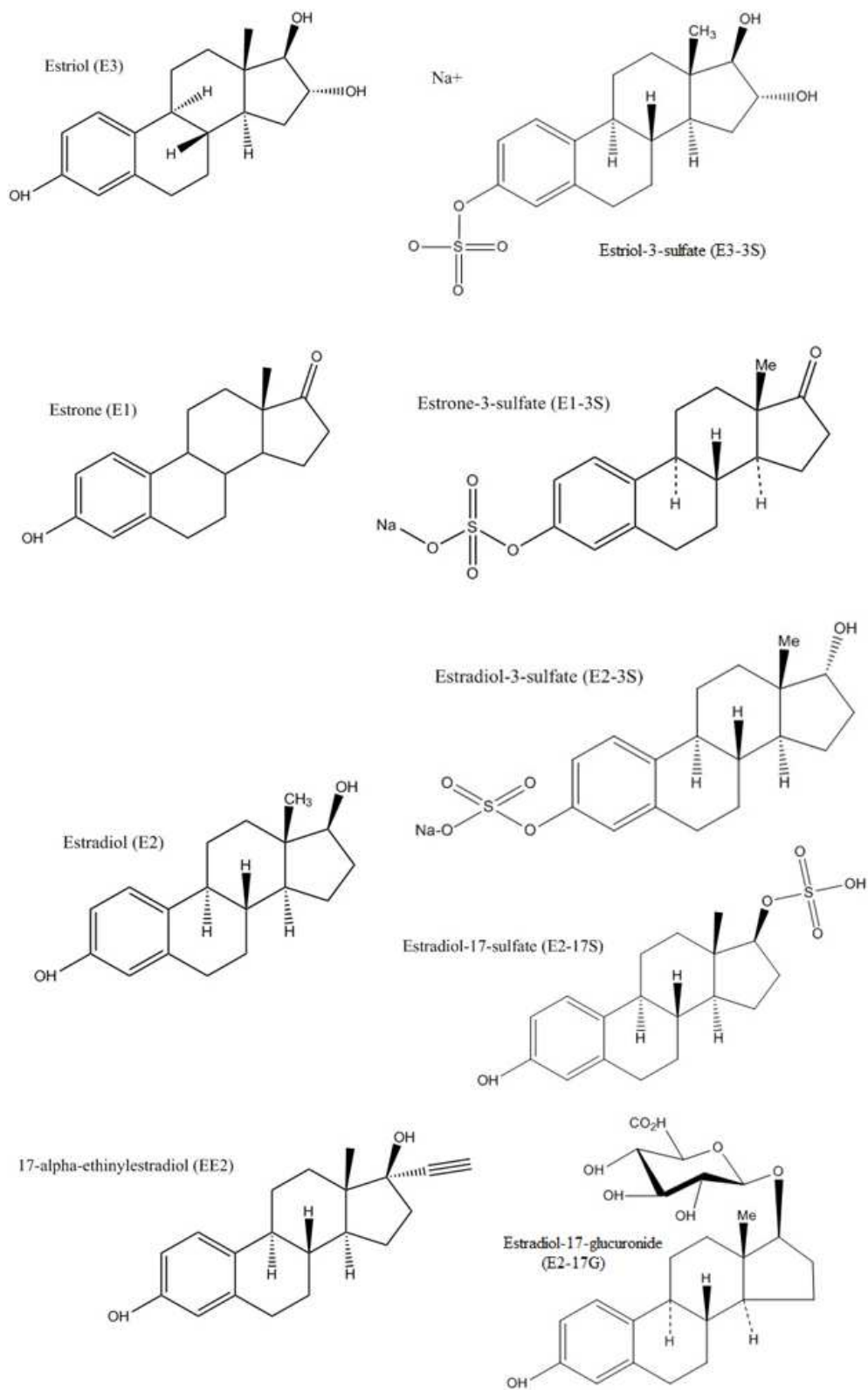
Although automated on-line methods have clear advantages over off-line SPE [93], the development of on-line methods can be challenging. The transfer of off-line methods to on-line mode may lead to an incompatibility between SPE sorbents and analytical columns, adjustment of mobile phases, pH incompatibility and peak broadening [94]. In addition, to achieve comparable pre-concentration factors to off-line SPE, it is possible to increase the on-line injection volumes. In this case, breakthrough volume estimation is necessary to guarantee that the compounds are fully retained during the loading of the SPE the column and that there are no losses of analytes [95, 96].

In this study, a fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectroscopy detection (SPE–LC–MS/MS) is presented. It allows for the simultaneous detection of both estrogens forms (conjugated and free) in urine and water samples. In order to confirm the presence (or absence) of conjugated and free estrogens and the applicability of the method in urine and real environmental samples, the determination of the selected conjugated and free estrogens hormones at low-nanogram per liter levels was done. Urine samples from pregnant women and women of reproductive age were analyzed. We analyzed affluent and effluent samples from the Repentigny wastewater treatment facility (north-east of Montreal, QC, Canada) and river samples from four different locations: Thousand Islands River, Saint Lawrence River (at Delson), Des Prairies River and Saint Lawrence River (at Repentigny), all in the province of Quebec, Canada. The method was validated by evaluating the linear range, accuracy and precision (intra-day and inter-day).

# Experimental

## Standards and reagents

Standards for conjugated estrogens (Estriol-3-sulfate (E3-3S), Estradiol-3-sulfate (E2-3S), Estrone-3-sulfate (E1-3S), Estradiol-17-sulfate (E2-17S), Estradiol-17-glucuronide (E2-17G)), and internal standard (Estradiol-d4-3-sulfate (E2-d4-3S)) were obtained from Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). Standards for free estrogens (Estriol (E3), Estrone (E1), Estradiol (E2) and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2)), and internal standard [ $^{13}\text{C}_6$ ]-estradiol were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The chemical structures of the studied estrogens are shown in Figure 1. Other solvents and reagents (trace analysis grade), methanol (MeOH), ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) and HPLC-grade water were purchased from Fisher Scientific Inc (Whitby, ON, Canada). Individual stock solutions for all compounds were prepared by dissolving accurately-weighed samples in HPLC-grade methanol to obtain a final concentration of  $1000 \text{ mg mL}^{-1}$ . These solutions were kept at  $-20^\circ\text{C}$ . Standard solutions containing all compounds were mixed and diluted with methanol. Standard working solutions of all compounds and calibration concentrations were prepared daily by serial dilution with HPLC-grade water (95%  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% MeOH maximum v/v).



Article Figure 1 - Chemical structures of target free and conjugated estrogens.

## **Instrumental conditions**

Sample pre-concentration and separation was performed using the EQUAN™ system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) combined with detection using a Quantum Ultra AM tandem triple quadrupole mass spectrometer fitted with an HESI source. The instrument was operated in negative ionization mode for the selected compounds of interest and is directly coupled to the HPLC system. A column switching technique was used to perform the on-line SPE-LC-MS/MS analysis. Sample analysis was performed in the selected reaction monitoring mode (SRM). System control and data acquisition was performed using the Analyst Xcalibur software (rev. 2.0 SP2, Thermo Fisher Scientific, USA).

## **On-line solid phase extraction**

The column switching system combines a six-port and a ten-port valve (VICI® Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, USA). This technique allows the injection and pre-concentration of samples using a high-pressure pump, a low-pressure pump, a load column and an analytical column.

The samples were injected using a HTC thermopal autosampler (CTC analytics AG, Zwingen, Switzerland). Two different sample volumes were injected in the system (1 mL and 5 mL). In the first case, the instrument was programmed to draw 1.2 mL of the sample from the vial and inject it in the 1 mL injection loop. In the second case, it was programmed to draw three times 2.5 mL (total of 7.5 mL) of the sample from the vial and inject it in the 5 mL injection loop. The excess of sample was injected to guarantee that the loop is completely filled and to reduce the sample dilution effect inside the loop during the injection process [95].

The samples were then pre-concentrated on the loading column (BetaBasic 20 \* 2.1 mm, 5 µm particle size in DASH, Thermo Fisher Scientific, USA) with 60% of solvent A (0.1% NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>O) and 40% of solvent B (0.1% NH<sub>4</sub>OH, MeOH) using the load pump (low-pressure quaternary pump Accela 600, from Thermo Fisher Scientific, USA) at a flow rate of

1000  $\mu\text{L min}^{-1}$ . The valve position was then switched to allow the bound material to be eluted from the extraction cartridge in back flush mode directly onto the analytical column (Betabasic 18, 100 \* 2.1 mm, 3.0  $\mu\text{m}$  particle size, Thermo Fisher Scientific, USA) coupled with a guard column (2.1 mm/0.2  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific, USA). A high-pressure quaternary pump Accela 1250, from Thermo Fisher Scientific, USA was used for liquid chromatography (analytical pump).

Optimization of the on-line sample pre-concentration was done by a series of tests to study the behaviour of the system to variations of key parameters such as column type, sample load flow rate, volume of the load column wash and organic solvent content of the load column wash.

## **Chromatographic conditions**

Once the analytes retained by the load column (SPE) were gradually eluted by back flushing and then introduced in the LC system: guard column and analytical column, where chromatographic separation took place. The analytical pump gradient was composed of solvent A: 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and solvent B: 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , MeOH. The gradient elution program is shown in Additional data file 1 (for a 1.0 mL and 5.0 mL loop, respectively). Column temperature was set to 30°C. Separated compounds were then introduced to the MS inlet for analysis.

All the operations are fully automated with a separation time of 10 minutes and a total run time of 20 minutes. To avoid sample cross contamination, the syringe and the injection valve were washed twice with 5 mL of a mix of ACN/iso-Propanol/MeOH (1/1/1; v/v/v) and  $\text{H}_2\text{O}$  after each injection.

## Mass spectrometry

In order to achieve the highest sensitivity, optimization of the mass spectrometry (MS) was done by a series of tests to study the behaviour of the system to variations of key parameters such as ionization source (HESI and APCI), negative and positive modes, spray voltage, sheath gas pressure, auxiliary gas pressure and capillary temperature. Best conditions of ionization of analytes were obtained using heated electrospray ionization in negative mode (HESI-).

Ion source parameters were optimized for each compound using the Quantum Tune application of Xcalibur software (rev. 2.0 SP2, Thermo Fisher Scientific, USA) which was also used to control the instrument and for data acquisition. Individual standard solutions (10 mg L<sup>-1</sup>) were infused with the syringe pump and mixed using a tee with the LC flow, mobile phase solvent A: 0.1% NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>O and solvent B: 0.1% NH<sub>4</sub>OH, MeOH (50:50), (300 μL min<sup>-1</sup>), before being introduced into the HESI source. The full-scan mass spectra and the MS/MS spectra of the selected compounds were obtained for all analytes.

The selected reaction-monitoring mode (SRM) was performed for the detection of the two most intense transitions at their respective m/z ratios. The most intense SRM transition (SRM#1) was selected for quantitation and the second most intense (SRM#2) was used for confirmation. SRM transitions, collision energy and skimmer offset were compound-dependent and appear in Table 1. The identification of analytes was confirmed by the LC retention time [54, 97, 98].

Article Table 1 - MS/MS optimized parameters for the analysis of selected estrogens hormones in negative (NI) ionization mode.

Hormone	Ion	SRM#1	Collision Energy (V)	SRM#2	Collision Energy (V)	Tube Lens (V)
<b>E3-3S</b>	367	287	38	80	33	-98
<b>E2-17G</b>	447	271	31	325	28	-94
<b>E2-3S</b>	351	271	37	145	48	-93
<b>E1-3S</b>	349	269	36	145	53	-90
<b>E2-17S</b>	351	97	41	80	42	-96
<b>E2-d4-3S</b>	355	275	40	-	-	-91
<b>E1</b>	269	145	41	159	41	-94
<b>E2</b>	271	145	47	183	44	-95
<b>EE2</b>	295	145	48	159	38	-100
<b>E3</b>	287	145	44	171	37	-98
<b>13C6-E2</b>	277	145	48	-	-	-101

For the compound E1-3S only one transition was used in water matrix as the second transition is not intense enough for the identification and quantification of this compound in the desired concentration range. The second transition for this compound showed satisfactory results only for concentrations of at least 200 ng L<sup>-1</sup> and was used in urine samples.

A basic additive, ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH), was added to the mobile phase to improve dissociation of the phenol group and improve the sensitivity [31, 32].

## Breakthrough volume estimation

Breakthrough volume estimation experiments are normally done using the graphical extrapolation method [98]. However, they can also be done experimentally; optimizing the SPE loading speed and the sample volume that can be charged in the column without loss of analytes [57].

The breakthrough volume for the selected estrogens was established by injecting different volumes (1 mL, 2 mL, 5 mL and 10 mL) of a sample and comparing absolute areas and signal-to-noise values. Tests were done in duplicate, with triplicate samples each time.

Samples were prepared daily at the same concentration (500 ng L<sup>-1</sup>) in analyte-free water, using 1 mL, 2 mL, 5 mL and 10 mL loops. Results were analysed using linear regression to determine the maximum injection volume.

## Matrix effects study

Matrix effects are very important for method development since they can affect reproducibility and accuracy [54, 55, 97, 99-101]. Matrix effects were evaluated by comparing the results of spiked (50 to 200 ng L<sup>-1</sup>) HPLC water samples with those measured in tap water, river water and wastewater spiked with the same amounts of analytes. The absolute matrix effect was calculated as:

$$\text{Matrix Effect (\%)} = (C_{\text{matrix}}/C_{\text{HPLC}}) * 100$$

Where:

$C_{\text{matrix}}$  = measured concentration in the tap water, river water and wastewater sample

$C_{\text{HPLC}}$  = measured concentration in HPLC water

A value of 100% indicates that there is no absolute matrix effect. If the value is >100%, there is a signal enhancement while a signal suppression is observed if the value is <100%. These experiments were performed with five replicates.

## Method validation and calibration

The performance of the method was evaluated through estimation of the recovery, linearity, repeatability (intra-day precision), intermediate precision (inter-day precision), accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

The recovery for the online SPE method was evaluated at two different concentrations (500 ng L<sup>-1</sup> and 1000 ng L<sup>-1</sup>, n = 5). The mean peak areas (20 µg L<sup>-1</sup> and 40 µg L<sup>-1</sup>, n=5) of the



selected estrogens of a direct injection (25 µL) were compared with those of the on-line 1 mL volume injection. The same mass of analyte was injected in both cases [57].

Calibration curves were established in urine, HPLC-grade water, tap water, river water and wastewater in order to avoid the influence of matrix effects on linearity. At least five-point calibration curves were established for the analytes in aqueous samples (5 to 5000 ng L<sup>-1</sup> injected in duplicate or triplicate). The calibration range was chosen based on the method analytical performance and the concentrations found for these compounds in the literature [3, 4, 7, 31, 33-35, 102]. Quantification for all compounds was performed using a standard addition calibration with linear regression and isotopically-labelled internal standards between 0.25-1 µg L<sup>-1</sup>. Calibration curves were built with the response ratio (area of the analyte standard divided by area of the internal standard) as a function of the analyte concentration. A linear regression model was applied, with coefficients of determination (R<sup>2</sup>) greater than 0.993 for all analytes.

Accuracy was evaluated by comparing the results of spiked tap water, river water, wastewater and urine samples (50 to 200 ng L<sup>-1</sup> for water samples and 500 to 5000 ng L<sup>-1</sup> for urine samples) with the nominal spike concentration. The accuracy was calculated as:

$$Accuracy (\%) = 100 - [(C_e - C_m) / (C_e) * 100]$$

Where:

C<sub>m</sub> = measured concentration

C<sub>e</sub> = expected concentration

The method repeatability (intra-day precision) and reproducibility (inter-day precision) were evaluated from the analysis of replicates of urine, HPLC-grade water, tap water, river water and wastewater spiked with a standard mixture of the analytes between 50 and 200 ng L<sup>-1</sup>. The repeatability and reproducibility were defined as the relative standard deviation (%) of the response ratio.

Five samples (n = 5) were used to estimate repeatability while twelve samples (n = 12) were used to estimate reproducibility. Samples were prepared daily and analyzed in the analytical sequence.

Seven to ten samples (n = 7 to 10) were spiked with all the analytes of interest at a concentration from two to five times the estimated detection limit and carried through the analytical process and analyzed. The limit of detection (LOD) was determined by multiplying the appropriate statistical Student's t-value (3.143 for seven replicates) by the standard deviations of the analyzed replicate samples. To be considered acceptable, the level of analyte in the sample must be above the determined LOD and not exceed 10 times the LOD of the analyte in reagent [103].

Quantification limit (LOQ) was estimated from LOQ from the equation:

$$LOQ = LOD \times 3$$

Sample carryover was evaluated by injecting a series of blanks (n = 4) after a high concentration standard (2000 ng L<sup>-1</sup>) in every sequence.

$$Carryover (\%) = C_{blank} / C_{standard} \times 100$$

Where:

C<sub>blank</sub> = concentration in the blank sample

C<sub>standard</sub> = concentration of the 2000 ng L<sup>-1</sup> spiked sample

Establish an appropriate retention time window for each analyte to identify them in quality control sample (QC) and field sample chromatograms was done. Based on this assignment, measurements of the actual retention time variation for each compound in standard solutions over the course of time were possible. The positive identification of the estrogens was confirmed by matching chromatographic retention times with those from spiked samples in HPLC water (analyte-free matrix). The suggested variation is plus or minus three

times the standard deviation of the retention time for each compound for a series of injections[104]. In addition, at least two SRM transitions were selected for each target compound and their relative intensities were compared. In accordance with the European Commission, Council Regulation (EEC), [105] the selected reaction monitoring (SRM) transitions ratios were considered acceptable if the error was within  $\pm 50\%$  since their relative intensities were inferior to 10%.

## **Environmental samples / Sample collection and preservation**

Water samples from a variety of sources in the Montreal area, including raw sewage wastewater effluent, drinking and river water, were collected. They were used for testing and to establish the method validation.

Sewage and effluent samples were collected from the Repentigny wastewater treatment plant facility (WWTP). Samples were collected on July 18<sup>th</sup>, 2014, around 11 a.m. In the wastewater treatment plant in Lebel Island, the wastewater treatment involves physical and chemical processes, as well as a biological sludge process. This WWTP is part of the short list of plants in Quebec to produce its own biogas. The biogas is produced by the anaerobic digestion of the sludge and it is recovered for several uses, including heating the facility.

River water were collected, at a depth of about 0.5 m, in Saint-Lawrence River (near Delson (45.397010, -73.534980) and Repentigny (45.737434,-73.446149), in the Des Prairies River (45.546793, -73.707615) and in the Milles Iles River (45.617870, -73.795486). Samples from Saint-Lawrence River (near Delson) and Des Prairies River were collected on July, 17<sup>th</sup>, 2014, around 5 p.m.. Saint-Lawrence River samples in Repentigny were collected on July 18<sup>th</sup>, 2014, around 12h p.m. and Milles Iles River samples were collected on July, 19<sup>th</sup>, 2014, around 7 a.m. They were selected due to the documented discharges of urban and agricultural wastes [54, 55]. Drinking water samples were collected directly from the Université de Montréal's tap water (Montreal's aqueduct) on July, 8<sup>th</sup>, 2014.

Urine samples were kindly obtained from 6 different women (three pregnant women and three women of reproductive age). Pregnant women were in the third trimester of their pregnancy (between 28 and 40 weeks).

All samples were collected in clean glass bottles and then immediately transported to the laboratory. The samples were filtered using 1.2 mm pore size glass fiber filters (Millipore, MA, USA) followed by 0.3 mm pore size glass fiber membranes filters (Sterlitech Corporation, Kent, WA), stored in the dark at 4°C and analyzed within 48 h. A previous study showed that this filtration step did not cause analyte losses [57]. Aliquots of 10 to 30 mL of the water and urine samples were transferred to volumetric flasks and spiked with the IS for a final concentration of 200 ng L<sup>-1</sup> to 500 ng L<sup>-1</sup>. The samples were then transferred to 10 mL amber glass vials for on-line SPE-LC-MS/MS analysis.

## **Results and discussion**

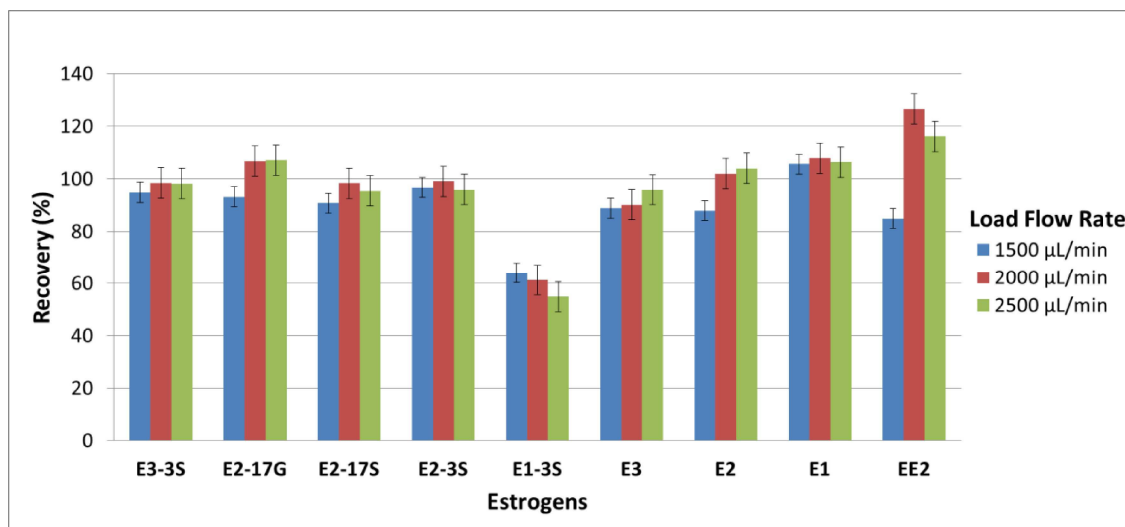
### **On-line trace enrichment**

Three different SPE columns were tested: Hypersil Gold aQ. column, 20 mm × 2.1 mm, 12 µm, Thermo, USA; Hypercarb column, 20 mm × 2.1 mm, 7 µm, Thermo, USA) and BetaBasic, 20 x 2.1 mm, 5 µm, in DASH, Thermo Fisher Scientific, USA (data not shown). The best recovery values were found using a BetaBasic (Table 2). Important on-line SPE parameters such as sample loading flow rate, wash volume and organic modifier in the wash volume were optimized to give optimal results in relation to system stability and run time using the BetaBasic.

Article Table 2 - Recovery values in percentage for the selected estrogens using the SPE BetaBasic column in HPLC water samples. Recovery values were calculated comparing off-line small injection method (25  $\mu\text{L}$ ) with online 1 mL injections (same mass of analyte injected) ( $C = 500 \text{ ngL}^{-1}$ ,  $n = 5$ ).

<i>Estrogens</i>	<i>Recovery (%)</i>
E3-3S	117
E2-17G	98
E2-17S	96
E1-3S	88
E2-3S	103
E3	95
E2	96
E1	94
EE2	72

While performing solid-phase extraction, flow rates from 500 to 2500  $\mu\text{L min}^{-1}$  were tested to evaluate the effect of loading speed. Load or elute flow rates that are too fast may not allow enough time for the analytes of interest to be bound or removed from the sorbent [93]. Absolute areas (without internal standard addition) for all target compounds were compared after analysis of a mix of compounds at 500  $\text{ng L}^{-1}$ . Although we did not observe significant analyte losses even with a 2500  $\mu\text{l min}^{-1}$  flow rate, ( $n = 3$ ,  $C = 500 \text{ ng L}^{-1}$ , Figure 2), very high flow rates could not be used because of measured backpressures of the load column. Therefore a loading flow rate of 1000  $\mu\text{L min}^{-1}$  was chosen.

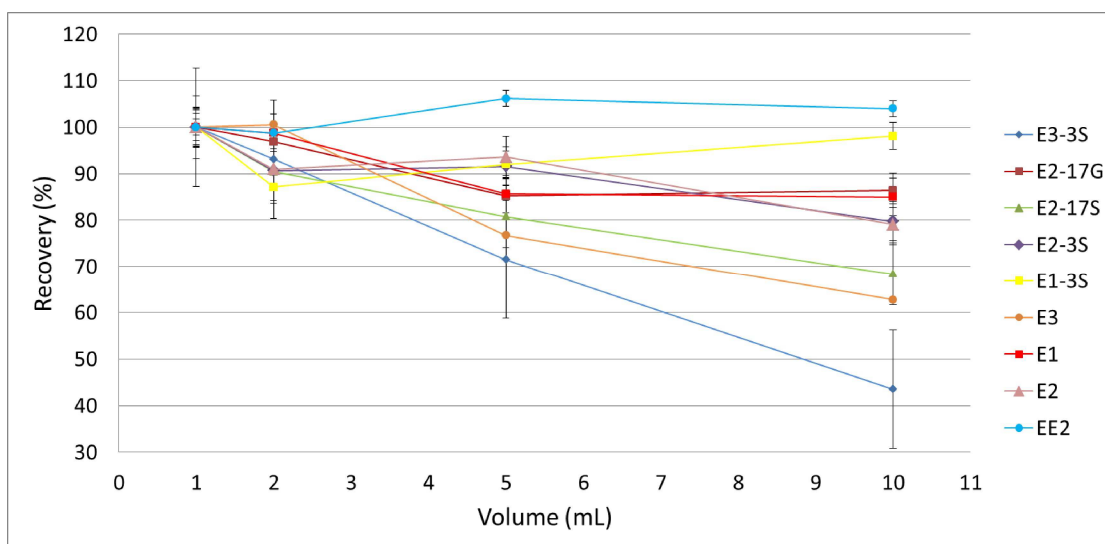


Article Figure 2 - Effect of loading speed. Percentage recovery for all analytes tested using  $1500 \mu\text{L min}^{-1}$ ,  $2000 \mu\text{L min}^{-1}$  and  $2500 \mu\text{L min}^{-1}$  flow rates. A flow of  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  was considered as 100% ( $n = 3$ ,  $C = 500 \text{ ng L}^{-1}$ ).

In an effort to improve MDLs and signal intensities, the injection volume was evaluated. A previous study showed that a pre-concentration of 10 mL sample could improve the method detection limits (MDLs) by a factor of 1.7 - 20 times compared to the same method using 1 mL injections [95]. To evaluate the breakthrough volumes, injections of 1 mL, 2 mL, 5 mL and 10 mL were tested ( $n = 3$ ,  $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Figure 3). Results show that it is possible to use 5 mL sample injections without significant loss to almost all of the studied compounds while limiting the total analysis time. E3-3S and E3 compounds presented a little higher loss of signal at 5 mL (22 and 24%, respectively), but since E3-3S is the compound that yields the best response to the method, the loss of the signal presented at 5 mL does not impair the results. In the case of E3, a compromise was done once there was no significant loss to all other compounds analyzed. Higher injection volumes resulted in loss of analytes possibly due to the presence of co-extracted substances during the loading step that may differentially affect the signal variability of each analyte. MDLs were obtained in the low  $\text{ng L}^{-1}$  range for all compounds which allowed the detection of trace amounts of the selected contaminants in all water matrices. Results obtained with 5 mL injections were lower by a factor of 0.8-10 times in HPLC water and 0.5 to 2.7 times in river water compared to 1 mL injections using exactly

the same method. The presence of excessive matrix interference prevented us from using a 5 mL sample size for wastewater, thus, for these samples; a 1 mL injection volume was used.

Urine samples presented high concentrations for most of the studied conjugated estrogens. A dilution factor of 10 was applied to urine sample before injecting a 1 mL aliquot. Thus, no other injection volume was tested for this matrix.



Article Figure 3 - Breakthrough volume determination in HPLC water. Percentage recovery for 1 ml, 2 ml, 5 ml and 10 ml sample volume injections. 1 ml injection was considered as being 100% (n = 3, C = 200 ng L<sup>-1</sup>).

## Chromatographic analysis

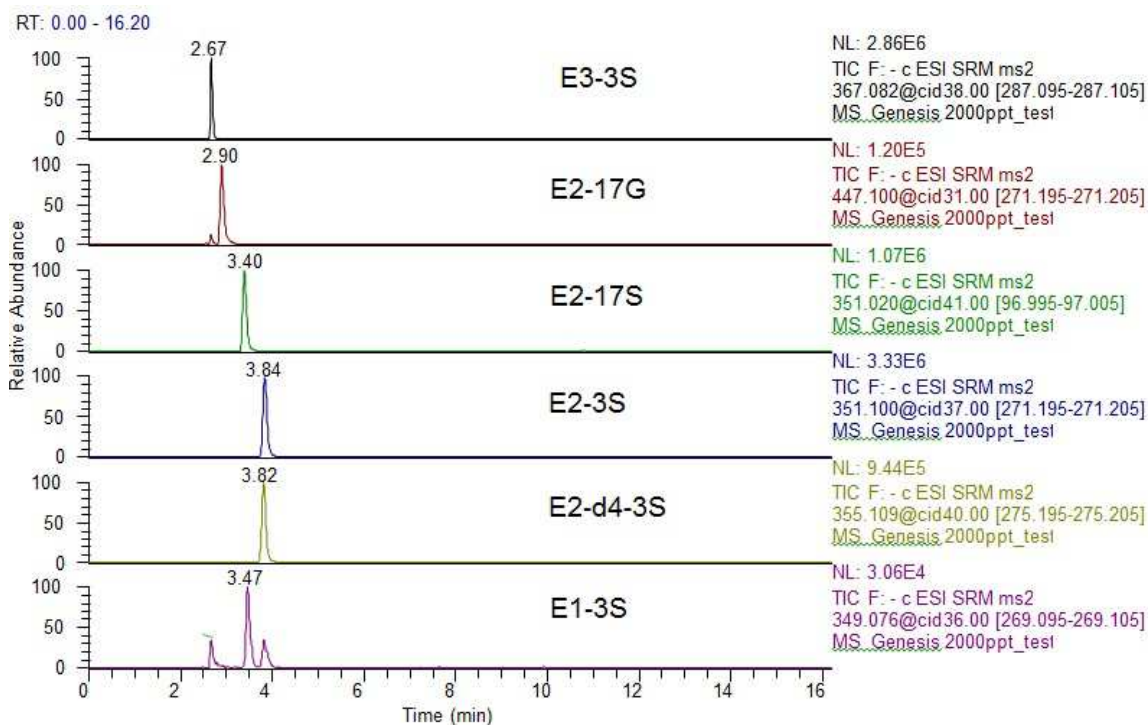
Optimization of the chromatographic separation was done by a series of tests to study the behaviour of the system to variations of key parameters such as column type, solvent load flow rate, organic solvent type and column temperature.

Several mobile phase compositions were tested: acetonitrile (ACN) and water (H<sub>2</sub>O); ACN and H<sub>2</sub>O with 100mM triethanolamine (TEA); ACN and H<sub>2</sub>O with 10 mM ammonium acetate; ACN and H<sub>2</sub>O with bicarbonate 10 mM [1]; methanol (MeOH) and H<sub>2</sub>O with 0.1% NH<sub>4</sub>OH; MeOH and H<sub>2</sub>O with ethyl acetate 2, 5 and 10%, 0.1% NH<sub>4</sub>OH; MeOH and H<sub>2</sub>O. The optimal separation of the nine estrogens, presenting the best peak shape and separation was achieved using a binary mobile phase composed of 0.1% NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>O in combination with an organic mobile phase of 0.1% NH<sub>4</sub>OH, MeOH.

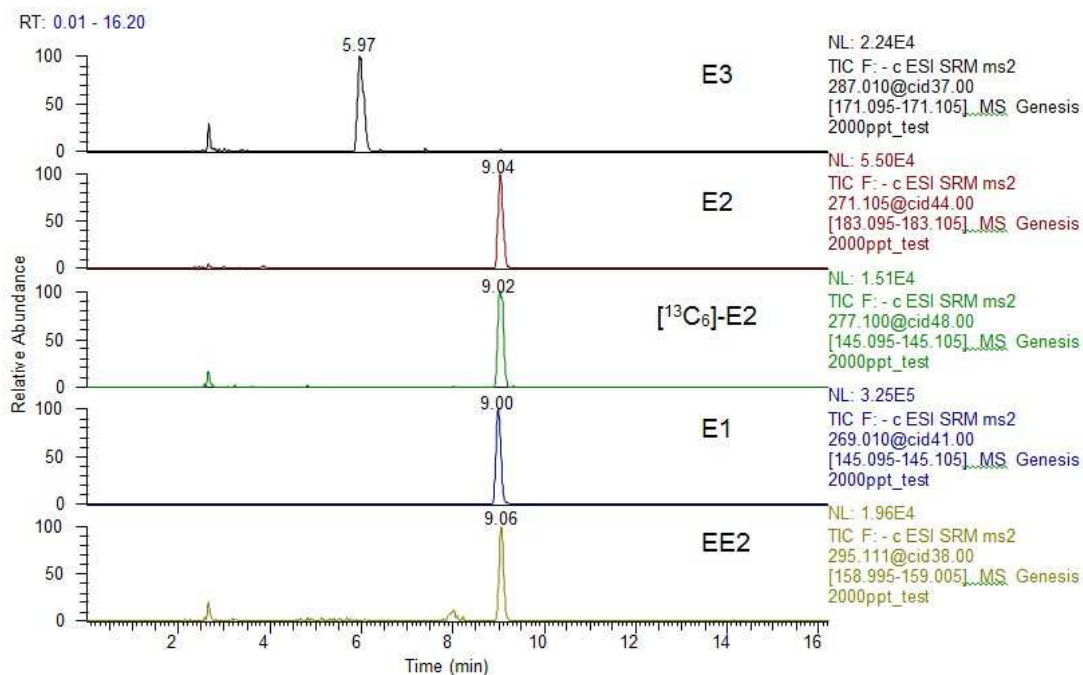
Four different columns: Accucore RP-MS, 50 x 2.1 mm, 2.6 μm, Thermo Scientific, USA; Accucore RP-MS, 100 x 2.1 mm mm, 2.6 μm, Thermo Scientific, USA; Zorbax Extend-C18, Agilent, USA and BetaBasic Column C18, 100 x 2.1 mm, 3 μm, Thermo Scientific, USA were tested (results not shown). Similar results were found with 100 mm and 50 mm Accucore columns. BetaBasic Column C18 showed the best results. The use of this column is also justified by the fact that peak broadening could occur if the on-line SPE column is coupled with an analytical column having a different type of retention [106]. Tests of the lifetime of the columns showed that around 150 samples could be analyzed with the same columns before significant changes were observed on peak shapes. Volume injections were set at 1 and 5 mL and the total time for analysis was 16 and 20 minutes respectively. Shorter times for separation were tested but resulted in co-elution for certain compounds. According to these results, the 10 min separation time for analysis was divided into two segments (conjugated and free estrogens) to improve sensitivity.

The optimal gradient elution program was a challenge given the similar structures of the estrogens and that some of them showed poor separation. Other studies presented the same limitations [54, 55]. Since tandem MS is used to detect the target compounds and that they have different precursor ions and monitored transitions (Table 1), complete separation is not required. Final solvent flow rate was set to 250 μL min<sup>-1</sup>. Higher flow rates were tested but resulted in poor peak resolution and peak shapes. Representative chromatograms of a 2 μg L<sup>-1</sup> standard mixture of the compounds analyzed in river water are illustrated in Figures 4 and 5.





Article Figure 4 - Representative chromatograms of a  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  standard mixture and of a  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  internal standard of the conjugated estrogens analyzed in river water.



Article Figure 5 - Representative chromatogram of a  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  standard mixture and of a  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  internal standard of the free estrogens analyzed in river water.

Two internal standards (isotopically-labeled E2 and E2-3S) were used to compensate for the signal reproducibility and variations between runs, for free and conjugated estrogens, respectively.

## Method validation

Validation data was determined for all water matrices and a summary of the data is presented in Table 3. Additional Data File 2 and Additional Data File 3 also present the summary of the results obtained for precision.

Calibration curves were made using standard additions (Table 3 and Additional Data File 4) and show excellent determination coefficients ( $R^2 > 0.993$ ) for all the compounds in all tested matrices. Intra-day and inter-day precision were considered acceptable if lower than 20% (Additional Data File 2 and Additional Data File 3), while 30% were acceptable for matrix interferences (accuracy) (Table 4) [103].

In general, for water (HPLC, drinking water and river water), linearity was excellent with determination coefficients ( $R^2 \geq 0.991$ ) for all target compounds. Method intra-day precision was between 3–14% for 1 or 5 mL injection ( $C = 200$  or  $50 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=10$ ), except for E1-3S where results were 13-18%. For inter-day precision results were lower than 20 % for 1 or 5 mL loops ( $C = 200$  or  $50 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=12$ ). As a very low spike concentration ( $\text{ng L}^{-1}$ ) was used to perform validation tests and E1-3S is the compound that presents the weakest signal in this method (Figure 4), it is subjected to more variations during the analysis. Consequently, even if all the results obtained are acceptable, validation data for this compound presents higher deviation results when compared with the data obtained for all the other target compounds. This limitation was not observed in samples with higher concentrations as waste samples or urine.

Linearity for wastewater, was very good with determination coefficients ( $R^2$ )  $\geq 0.992$ , except for E3 for which  $R^2$  was 0.989 for 1 mL sample volume. Method intra-day precision was lower than 10% ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=10$ ) for all compounds except for E3 for which it was 18% ( $n=7$ ) and lower than 20 % for inter-day precision ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=12$ ).

For urine, linearity was excellent with determination coefficients varying between  $0.991 \leq R^2 \leq 0.999$  for all for all the estrogens tested.

Extraction recovery results for all target compounds were good ( $> 90\%$ ). When lower spike concentration was used, extraction recoveries were generally good ( $> 80\%$ ), except for E3-3S and E1-3S (70.9% for both compounds). Results are shown in Table Additional Data File 5. Extraction efficacies were tested in two different concentrations for 5 mL injections ( $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$  and  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=7$ ) and one concentration for 1 mL injections ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=10$ ).

According to previous studies [54, 55], the possibility of sample carry over from repeat pre-concentration steps could cause significant concerns in on-line SPE methods. In order to prevent this, blanks (HPLC water without analytes or an internal standard solution) were extracted and analysed in duplicate in every sequence (begin, middle and end) as control for carry over and background concentrations. Blanks samples with internal standards were also analyzed during the analytical sequence to confirm the results. No carry over was noticed even when blanks were extracted and analyzed after  $5000 \text{ ng L}^{-1}$  spiked samples.

Limits of detection (LOD) were evaluated in HPLC, drinking, river and wastewater. The most intense transition (SRM#1) was used to calculate the LOD, while the second most intense transition (SRM#2) was used to confirm the presence of the compound. The limit of detection (LOD) [103] ranged from 6.9 to  $76 \text{ ng L}^{-1}$  while the limit of quantification (LOQ) ranged from 21 to  $228 \text{ ng L}^{-1}$  for 1 mL volume injection. For 5 mL volume injection, the LOD ranged from 3.3 to  $27 \text{ ng L}^{-1}$  while the LOQ ranged from 10 to  $81 \text{ ng L}^{-1}$ . Limits of detection and limits of quantification for all matrix tested are presented in Table 3. Additional Data File 6 and Additional Data File 7 present the results of this method compared to the detection

limits and limits of quantification of others methods found in the literature. In general, the limits of detection of this method are around 10 to 100 times higher than the limits of detection found in the literature for wastewater samples analyzed by equivalent off-line methods. However, the amount of samples used to achieve these limits is 100 to 250 times lower. For river water, even if the amount of sample used is much lower (1 to 5 mL instead of 500 to 2000 mL in other methods), limits of detection are comparable in some cases. For E2, the detection limit for 5 mL samples is 9.5 ng L<sup>-1</sup> while in some off-line method it is reported as 2.3 ng L<sup>-1</sup> using 500 mL samples [35]. Similar results are observed for E1: 5 ng L<sup>-1</sup>, 1 mL sample, compared to 1.2 ng L<sup>-1</sup> [35], 500 mL sample and E2-3S: 5.0 ng L<sup>-1</sup>, 5 mL sample, compared to 0.74 ng L<sup>-1</sup>[35] 500 mL sample, with LOD varying less than 10 times to the online method described.

Article Table 3 - Method validation results for limit of detection and limit of quantification for all waters tested.

Estrogens	LOD <sup>(a)</sup>					
	HPLC	DW <sup>(c)</sup>	RW <sup>(d)</sup>	WW <sup>(e)</sup>	HPLC	RW <sup>(d)</sup>
	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	5 mL <sup>(b)</sup>	5 mL <sup>(b)</sup>
E3-3S	7.1	13	7.1	41	9.2	6.3
E2-17G	27	21	48	42	14	21
E2-17S	6.9	17	8.2	28	4.7	3.3
E1-3S	25	63	74	76	4.6	27
E2-3S	8.9	14	5.0	13	3.4	5.3
E3	37	59	26	52	3.6	10
E2	19	14	9.7	14	6.1	9.5
E1	32	20	5.0	26	13	9.7
EE2	31	46	49	62	7.2	25

(a) LOD - Limit of detection, determined using the most abundant product ion.

(b) Sample volume.

(c) DW - Drinking water; (d) RW - River water; (e) WW - Wastewater

According to Garcia et al., [106] and Schuhmacher et al., [107] a major problem for quantitative analysis using HESI is the presence of matrix effects. Matrix effects are defined as the unexpected suppression or enhancement of the analyte response due to the presence of other compounds in the sample. We showed that almost all compounds were not subjected to significant matrix effects (E2-17G, E2-17S, E2-3S, E1-3S, E2, E1 and EE2) while E3-3S was susceptible to signal enhancement and E3 to signal suppression. Results for matrix effects and accuracy are presented in Additional Data File 8 and Additional Data File 9. Some strategies to reduce matrix effects such as external calibration using matrix-matched samples, isotope dilution and standard additions have been recommended [108]. Although the addition of isotopically-labeled internal standards to compensate for matrix effects are often considered a lengthy and labor intensive method [92, 109]. The internal standards were used in this study since it was shown to be an efficient mean to correct signal distortion caused by matrix interferences.

The recovery for the urine samples using the online SPE method was evaluated at three different concentration levels (500 ng L<sup>-1</sup>, 1000 ng L<sup>-1</sup> and 5000 ng L<sup>-1</sup>, n = 5). The mean peak areas of the selected estrogens in HPLC water for a 1 mL injection were compared with the same volume injection of those of urine samples for a dilution factor of 10. The same mass of analyte was injected in both cases. Results are shown in Additional Data File 10.

## **Method application**

### **Analysis of drinking, river, affluent and effluent water samples using on-line SPE-LC-ESI-MS**

To demonstrate the applicability of the developed method, we analyzed samples of drinking, river, sewage and effluent water from the region of Montreal, Quebec, Canada. Results for water samples are summarized in Table 4.

Article Table 4 - Concentrations of the selected estrogens in the water samples analyzed in ng L<sup>-1</sup>. Samples were collected and analyzed in July 2014.

<i>Estrogens</i>	<i>LOD (Drinking water)</i>	<i>LOD (Sewage and Effluent)</i>	<i>Drinking water (UdeM)</i>	<i>Repentigny</i>	
				<i>Sewage</i>	<i>Effluent</i>
<b>E3-3S</b>	7.1	41	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-17G</b>	14	42	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-17S</b>	4.7	28	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E1-3S</b>	4.6	76	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-3S</b>	3.4	13	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E3</b>	3.6	52	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2</b>	6.1	14	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E1</b>	13	26	< LOD	< LOD	< LOD
<b>EE2</b>	7.2	62	< LOD	< LOD	< LOD

<i>Estrogens</i>	<i>LOD (River water)</i>	<i>St Lawrence River (Delson)</i>	<i>St Lawrence River (Repentigny)</i>	<i>Prairie River</i>	<i>Thousand Island River</i>
<b>E3-3S</b>	6.3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-17G</b>	21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-17S</b>	3.3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E1-3S</b>	27	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2-3S</b>	5.3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E3</b>	10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E2</b>	9.5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>E1</b>	9.7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>EE2</b>	25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Results show that free and conjugated estrogens were not found in concentrations above the LOD of the present method in drinking and river waters for Montreal area in Canada. In wastewater samples, estriol-3-sulfate (E3-3S) is most probably present in sewage and effluent samples, but with very low concentrations (lower than the method detection limit). Although a clear peak could be identified, the presence could not be confirmed by a second SRM transition. The absence of other targeted estrogens may be influenced by the choice of sampling sites. These levels were generally similar or lower to those previously reported in previous studies [3, 4, 7, 8, 31, 33, 34, 81, 110]. In addition, most of the data for conjugated estrogens come from European rivers and wastewaters that present environmental conditions such as temperature and flow that are different from Montreal, QC, Canada.

Furthermore, in most methods found in the literature, large sample volumes (up to 4000 mL) are often used for solid phase extraction prior to analysis to detect estrogens [3, 4, 7, 8, 31, 33-35, 102, 110, 111]. However, the current method is efficient to quantitate and confirm estrogens (including conjugated forms) at low concentration levels ( $\text{ng L}^{-1}$ ) in complex matrices such as river and wastewater sample using 1 mL and 5 mL injections. Table 5 for river water and Table 6 for wastewater show the concentrations found in the literature compared to the present on-line pre-concentration method.

Article Table 5 - Comparison of measured concentrations of the studied estrogens in river samples. Concentrations in ng L<sup>-1</sup>.

<i>Estrogens</i>	<i>Present study</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
E3-3S	< 6.3	< 0.3	NA	ND	< 0.07
E2-17G	< 21	< 3.1	<2.24	ND	1.10 – 7.34
E2-17S	< 3.3	NA	NA	NA	NA
E1-3S	< 25	0.3 – 0.8	ND - 7	0.3 - 7	< 0.16
E2-3S	< 5.3	0.2 – 0.8	NA	0.2 – 0.4	0.59 – 0.85
E3	< 10	NA	NA	ND - 51	1 – 7.27
E2	< 9.5	NA	NA	ND – 8.8	ND
E1	< 9.7	0.2 – 6.6	4 - 22	< 0.1 – 17	ND
EE2	< 25	NA	NA	NA	ND

NA - Not analyzed

ND – Not detected

a – Isobe et al.[33], 1000 mL volume sample

b – Mozaz et al.[34], 500 mL volume sample

c – Liu et al., [3], no information about volume sample

d – Kuster et al.[35], 500 mL volume sample



Article Table 6 - Comparison of measured concentrations of the studied estrogens in wastewater samples. Concentrations in ng L<sup>-1</sup>.

Estrogens	Present study	a		c		e		f		g		h	
	Aff et Eff	Aff	Eff	Aff	Eff	Aff	Eff	Aff	Eff	Aff	Eff	Aff	Eff
E3-3S	< 0.42	NA	< 0.3	6.5 - 333	0.6 - 160	< 1.6	< 0.42	NA	NA	14	14	NA	NA
E2-17G	< 51	NA	< 3.1	ND	ND	< 1.7	< 0.52	NA	NA	< 3	< 3	NA	NA
E2-17S	< 28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E1-3S	< 76	NA	0.3 - 2.2	1.2 - 170	ND - 42	2.9	3.9	10	12	25	25	NA	NA
E2-3S	< 13	NA	< 0.2 - 1.0	3.2 - 957	ND - 94	< 1.1	< 0.22	NA	NA	3.3	3.3	NA	NA
E3	< 52	NA	NA	ND - 660	ND - 275	100	ND	50	1	33 - 187	0.43 - 18	74 - 234	46 - 175
E2	< 14	NA	NA	ND - 162	ND - 158	2	ND	5	0.7	25-avr	0.55 - 3.3	ND - 74	ND - 51
E1	< 26	NA	2.5 - 34	ND - 670	ND - 147	100	5	15	3	25 - 132	2.5 - 82	ND - 376	ND - 42
EE2	< 62	NA	NA	NA	NA	15	5	1.2	1	0.43 - 13	ND - 1	ND	ND

NA - Not analyzed

ND - Not detected

Aff - Affluent

Eff - Effluent

a - Isobe et al.[33], 1000 mL volume sample

c - Liu et al.[3], no information about volume sample

e - Gentili et al.[31], 2000 mL river, 250 mL effluent and 100 affluent volume sample

f - Koh et al.[32], 1000 mL volume sample

g - Baronti et al.[7], 400 mL affluent and 150 mL affluent volume sample

h - Fayad [57], 10 mL volume sample

**Determination of conjugated and free estrogen levels in female urine samples using on-line SPE-LC-HESI-MS**

Zhang and Henion [112] and D’Asenzo [8] showed in previous studies that LC-MS/MS, can be successfully used for determining the low levels of estrogen sulfates in female urine. By using a similar technique, but with an online SPE extraction, we have been able to observe an increased number of conjugated estrogens excreted in female urine. All the conjugated estrogens analyzed were identified. Concerning the free estrogens, apart from some E3 in the urine of pregnant women, they were never detected.

The complete data from this study on amounts of estrogens in urine of women (pregnant or not) are presented in Table 7. They are in fairly good agreement with those previously measured by other studies, although it is difficult to compare given that many such studies are based on daily excretion and not on urine concentration (the results are usually in micrograms per day and not in micrograms per liter). As expected, estrogen levels in the urine of pregnant women are much higher than in the urine of non-pregnant women of similar age.

Article Table 7 - Concentrations of the selected estrogens in the urine samples analyzed in  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Samples were collected and analyzed in September and October 2014.

<i>Estrogens</i>	<i>LOD</i>	<i>Pregnant Women</i>			<i>Women</i>		
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
<b>E3-3S</b>	0.001	493	577	988	16.9	22.5	10.8
<b>E2-17G</b>	0.001	662	798	1707	4.83	10.9	2.29
<b>E2-17S</b>	0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	6.71	6.68	7.91
<b>E1-3S</b>	0.005	5332	9750	2950	36.2	30.9	NA
<b>E2-3S</b>	0.003	10.1	16.5	5.36	1.74	0.473	2.97
<b>E3</b>	0.004	2.09	1.22	14.2	< 0.004	< 0.004	< 0.004
<b>E2</b>	0.006	< 0.006	< 0.006	< 0.006	< 0.006	< 0.006	< 0.006
<b>E1</b>	0.013	0.42	< 0.013	1.08	< 0.013	< 0.013	< 0.013
<b>EE2</b>	0.007	< 0.007	< 0.007	< 0.007	< 0.007	< 0.007	< 0.007

## Method conclusion

An on-line SPE LC/MS/MS method for the simultaneous determination and quantification of conjugated and free hormones was developed and validated. This method was applied for the analysis of urine samples, drinking and surface water samples, as well as sewage and wastewater effluent samples.

Contrary to most published methods which use large sample volumes and time-consuming offline SPE, we were able to quantitate all the proposed hormones using a small sample volume. After breakthrough volume estimations, using the Beta-Basic-18 Dash HTS on-line SPE column, and sample volumes of 1 to 5 ml; all the compounds could be determined at low nanogram-per-liter range (3 - 15 ng L<sup>-1</sup>) with a recovery higher than 70% for all the compounds in all water matrices. For urine samples, limits of detection ranged from 30 - 150 ng L<sup>-1</sup> since the expected concentrations are much higher and they were diluted at least 10 times to avoid matrix interferences.

Samples are analyzed in 16 and 20 minutes runs, with only 10 minutes for analytes separation without the tedious and time-consuming steps required for the standard off-line SPE methods. The main advantage of the on-line SPE is that manual sample preparation was limited to sample filtration and spiking of the internal standard solution. This eliminates several working steps, such as extraction, evaporation and reconstitution, and significantly reduces time and procedural errors. Another advantage of the on-line SPE process is the need to use much smaller sample volumes, 1 to 5 mL instead of about 250 ml to 4 L.

Quantitation was performed using standard additions to compensate for signal alteration due to interferences that could be present in the samples. Quantifying compounds through standard additions provides a more accurate method while this technique is rarely used for the standard off-line SPE methods due to the intensive manual labor required. Method detection limits of the nine hormones ranged from 3 to 15 ng L<sup>-1</sup> in clean water but were

limited to 14 to 76 ng L<sup>-1</sup> in wastewater samples. For all analytes, method intra-day and inter-day precision were less than 20%. Accuracy was  $\pm$  30%. Such MDL are excellent for urine analysis but will only be useful in environmental analysis for fairly contaminated samples or for experimental designs where compounds are spiked.

The results show that the presented method can potentially be applied to the simultaneous analysis of the conjugated and free estrogens at low nanogram-per-liter levels in complex water matrices and urine samples but does not seem sensitive enough for clean or “normal” wastewater samples. Considering that the presented method is able to quantitate both estrogens forms in the same run without any particular preparation, it also shows potential for studying the deconjugation of metabolized estrogens in the contaminated water matrices and their implication on the environmental fate of estrogens, especially considering the fate of conjugated hormones from urine.

### **Description of additional data files**

The following additional data are available with the online version of this paper. Additional data file 1 is a table describing the valve program, on-line SPE (loading pump) and LC (analytical pump). Additional data file 2 is a figure that shows method validation for precision (intra-day). Additional data file 3 is a figure that shows method validation for precision (inter-day). Additional data file 4 is a table that presents method validation results for linearity ( $R^2$ ), for all waters matrix tested. Additional data file 5 is a table listing the extraction recovery results for all target compounds in river water. Additional data file 6 is a table comparing measured detection limits (LODs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Additional data file 7 is a table comparing measured quantification limits (LOQs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Additional data file 8 is a table presenting accuracy for the selected estrogens for all waters tested. Additional data file 9 is a table describing the matrix effects for the selected estrogens for all waters tested and Additional data file 10 is a table listing the calculated recovery values for the online method for the selected estrogens.

## **Acknowledgements**

This work was made possible through the financial support of Veolia Water, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at Polytechnique Montréal, the Canadian Foundation for Innovation (equipment).

## **Supporting Information**

Amanda C. Naldi<sup>1</sup>, Paul B. Fayad<sup>1</sup>, Michèle Prévost<sup>2</sup> and Sébastien Sauvé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup> Department of Civil, Geological and Mining Engineering, Polytechnique Montréal, Montreal, QC, Canada

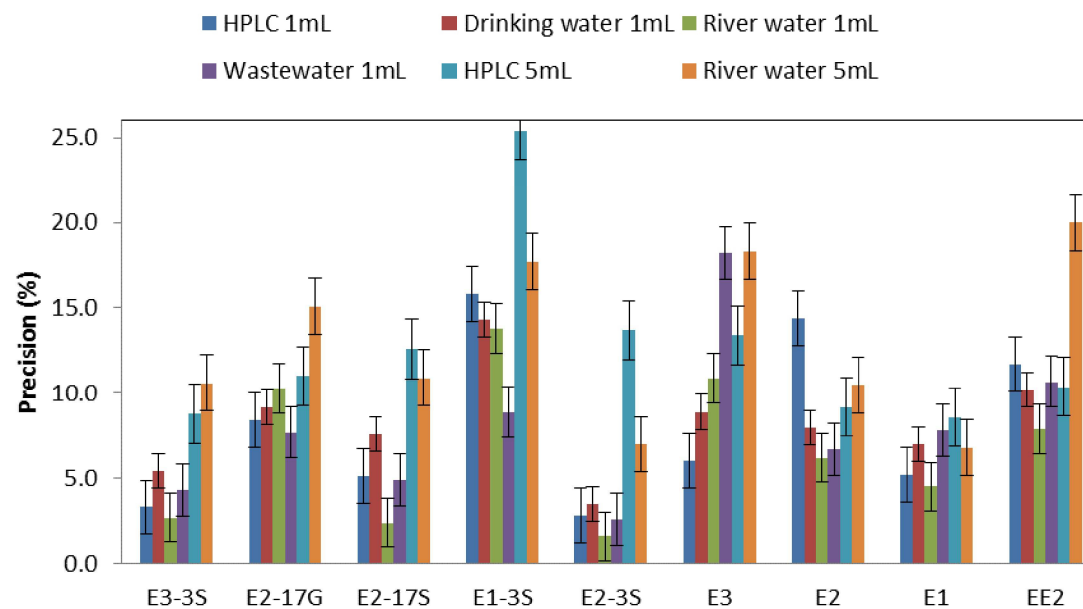
## Additional data file 1

Article Table 8 - S1 – Valve program, on-line SPE (loading pump) and LC (analytical pump).

Gradient elution program for 1 mL and 5 mL injections, used for the pre-concentration and separation of selected estrogens. Solvents consist of: H<sub>2</sub>O with 0.1% NH<sub>4</sub>OH(A) and MeOH with 0.1% NH<sub>4</sub>OH (B).

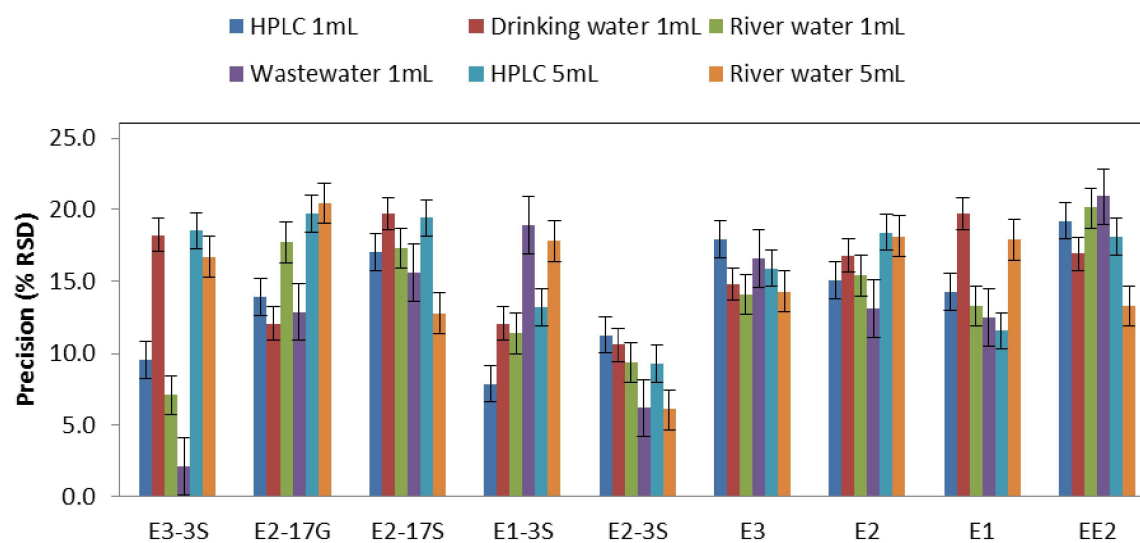
	Load pump (to six port valve)					Analytical pump (to ten port valve)				
	<u>Time (min)</u>		<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>	<u>Flow rate</u> ( $\mu$ min <sup>-1</sup> )	<u>Time (min)</u>		<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>	<u>Flow rate</u> ( $\mu$ min <sup>-1</sup> )
	1 mL loop	5 mL loop				1 mL loop	5 mL loop			
On-line SPE loading step /	0	0	100	0	1000	0	0	60	40	250
Column re-equilibration	1.2	5.2	100	0	1000	1.2	5.2	60	40	250
						3.8	7.8	55	45	250
Loop and SPE column wash /	1.21	5.21	0	100	1000	4.5	8.5	50	50	250
Elution and chromatographic	11.2	13.2	0	100	1000	5.2	9.2	40	60	250
separation						7.2	11.2	30	70	250
						9.2	13.2	15	85	250
SPE column conditioning /	11.21	13.21	100	0	1000	10.2	14.2	5	95	250
Column re-equilibration	16.2	20.2	100	0	1000	11.2	15.2	60	40	250
						16.2	20.2	60	40	250

## Additional data file 2



Article Figure 6 - S1 - Method validation for precision (intra-day).  $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 10$  for 1 mL sample volume and  $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 7$  for 5 mL sample volume.

### Additional data file 3



Article Figure 7 - S2 - Method validation for precision (inter-day).  $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 12$  for 1 mL sample volume and  $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 15$  for 5 mL sample volume.



## Additional data file 4

Article Table 9 - S2 – Method validation results for linearity ( $R^2$ ), for all waters tested (HPLC water, drinking water, river water and wastewater).

Estrogens	$R^2$ (a)					
	HPLC 1 mL <sup>(b)</sup>	DW <sup>(c)</sup> 1 mL <sup>(b)</sup>	RW <sup>(d)</sup> 1 mL <sup>(b)</sup>	WW <sup>(e)</sup> 1 mL <sup>(b)</sup>	HPLC 5 mL <sup>(b)</sup>	RW <sup>(d)</sup> 5 mL <sup>(b)</sup>
E3-3S	0.9979	0.996	0.9984	0.9915	0.9946	0.9949
E2-17G	0.9921	0.9966	0.9947	0.9963	0.9953	0.9960
E2-17S	0.9982	0.9975	0.9989	0.9921	0.9959	0.9991
E1-3S	0.9925	0.9929	0.9959	0.9946	0.9963	0.9885
E2-3S	0.9976	0.9947	0.9989	0.9937	0.9953	0.9917
E3	0.9932	0.9908	0.9978	0.9888	0.9958	0.9983
E2	0.9963	0.9914	0.9990	0.9954	0.9951	0.9939
E1	0.9972	0.9964	0.9987	0.9959	0.9947	0.9927
EE2	0.9953	0.9928	0.9971	0.9935	0.9948	0.9933

(a)  $R^2$  determined by internal standard calibration for spiked solution (n=3, at least 6 point calibration curve).

(b) Sample volume.

(c) DW - Drinking water; (d) RW - River water; (e) WW – Wastewater.

## Additional data file 5

Article Table 10 - S3 – Extraction recovery results for all target compounds in river water. Extraction efficacies were tested in two different concentrations for 5 mL injections ( $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$  and  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=7$ ) and one concentration for 1 mL injections ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $n=10$ ).

	Extraction Recoveries (%)		
	1 mL injection $C = 200 \text{ ngL}^{-1}$	5 mL injection $C = 50 \text{ ngL}^{-1}$	5 mL injection $C = 100 \text{ ngL}^{-1}$
<b>E3-3S</b>	97.7	70.9	104
<b>E2-17G</b>	94.1	84.0	98.4
<b>E2-17S</b>	98.4	92.3	121
<b>E1-3S</b>	102	70.9	104
<b>E2-3S</b>	98.0	93.8	98.4
<b>E3-3S</b>	101	91.7	122
<b>E2</b>	102	85.4	103
<b>E1-3S</b>	101	94.6	101
<b>EE2</b>	111	93.6	97.3

## Additional data file 6

Article Table 11 - S4 – Comparison of measured detection limits (LODs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Conc. in ng L<sup>-1</sup>.

Estrogens	MDL <sup>(a)</sup>													
	Present Method				A		B			C	D	E		
	HPLC	DW <sup>(c)</sup>	RW <sup>(d)</sup>	WW <sup>(e)</sup>	HPLC	RW <sup>(d)</sup>	HPLC	RW <sup>(d)</sup>	Aff <sup>(f)</sup>	Eff <sup>(g)</sup>	RW	GW <sup>(h)</sup>	N/D *	N/D
	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	5 mL <sup>(b)</sup>	5 mL <sup>(b)</sup>	500 mL <sup>(b)</sup>	500 mL <sup>(b)</sup>	100 mL <sup>(b)</sup>	250 mL <sup>(b)</sup>	2000 mL <sup>(b)</sup>	500 mL <sup>(b)</sup>	N/D *	1000 mL <sup>(b)</sup>
<b>E3-3S</b>	7.1	13	7.1	41	9.2	6.3	0.04	0.07	1.6	0.42	0.05	N/A	N/A	0.3
<b>E2-17G</b>	27	21	48	42	14	21	0.23	0.74	1.7	0.52	0.06	2.24	0.005	3.1
<b>E2-3S</b>	8.9	14	5.0	13	3.4	5.3	0.23	0.74	1.1	0.22	0.03	N/A	N/A	0.2
<b>E1-3S</b>	25	63	74	76	4.6	27	0.36	0.16	0.2	0.04	0.005	0.53	0.0001	0.1
<b>E2-17S</b>	6.9	17	8.2	28	4.7	3.3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>E1</b>	32	20	5.0	26	13	9.7	0.57	1.15	0.4	0.04	0.005	2.5	1	0.1
<b>E2</b>	19	14	9.7	14	6.1	9.5	1.22	2.27	0.65	0.16	0.02	2.5	1	0.3
<b>EE2</b>	31	46	49	62	7.2	25	1.51	7.55	N/A	N/A	N/A	3.22	2	0.2
<b>E3</b>	37	59	26	52	3.6	10	0.41	1.13	0.85	0.24	0.03	5.04	1	1.5

(a) LOD - Limit of detection, determined using the most abundant product ion.

(b) Sample volume.

(c) DW - Drinking water; (d) RW - River water; (e) WW - Wastewater; (f) Aff - Affluent; (g) Eff - Effluent; (h) GW - Groundwater.

N/A - Not analyzed

N/D - No Information

\* IDL - Instrument detection limit

A – Kuster et al.[35];

B – Gentili et al.[31];

C – Mozaz et al.[34];

D – Díaz-Cruz et al. [3, 81];

E – Isobe et al.[33];

## Additional data file 7

Article Table 12 - S5 – Comparison of measured quantification limits (LOQs) of the studied estrogens with other methods found in the literature for water samples. Conc. in ng L<sup>-1</sup>.

Estrogens	LOQ <sup>(a)</sup>											
	HPLC		DW <sup>(c)</sup>		Present Method			F		G		RW <sup>(d)</sup>
	1 mL <sup>(b)</sup>	1 mL <sup>(b)</sup>	RW <sup>(d)</sup> 1 mL <sup>(b)</sup>	WW <sup>(e)</sup> 1 mL <sup>(b)</sup>	HPLC 5 mL <sup>(b)</sup>	RW <sup>(d)</sup> 5 mL <sup>(b)</sup>	WW <sup>(e)</sup> 50 mL <sup>(b)</sup>	Aff <sup>(f)</sup> 100 mL <sup>(b)</sup>	Eff <sup>(g)</sup> 250 mL <sup>(b)</sup>	Aff <sup>(f)</sup> 150 mL <sup>(b)</sup>	Eff <sup>(g)</sup> 400 mL <sup>(b)</sup>	RW <sup>(d)</sup> 4000 mL <sup>(b)</sup>
<b>E3-3S</b>	21	39	21	123	28	19	5	3	1	N/A	N/A	N/A
<b>E2-17G</b>	81	63	144	126	42	63	6	3	1	N/A	N/A	N/A
<b>E2-3S</b>	27	42	15	39	10	16	3	2	1	N/A	N/A	N/A
<b>E1-3S</b>	75	189	222	228	14	81	2	0.8	0.3	N/A	N/A	N/A
<b>E2-17S</b>	21	51	25	84	14	9.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>E1</b>	96	60	15	78	39	29	2	1	0.5	0.2	0.08	0.008
<b>E2</b>	57	42	29	42	18	29	4	2	1	0.6	0.2	0.02
<b>EE2</b>	93	138	147	186	22	75	N/A	N/A	N/A	0.9	0.3	0.03
<b>E3</b>	111	177	78	156	11	30	4	2	1	0.6	0.2	0.02

(a)LOQ - Limit of Quantification, determined using the most abundant product ion.

(b) Sample volume.

(c) DW - Drinking water; (d) RW - River water; (e) WW - Wastewater; (f) Aff - Affluent; (g) Eff - Effluent; (h) GW - Groundwater.

N/A - Not analyzed

F - D'Asenzo et al. [8];

G - Baronti et al.[7];

## Additional data file 8

Article Table 13 - S6 – Accuracy for the selected estrogens for all waters tested.

Estrogens	Accuracy <sup>(a)</sup>				
	DW <sup>(b)</sup>	RW <sup>(c)</sup>	WW <sup>(d)</sup>	WW* <sup>(d)</sup>	RW** <sup>(c)</sup>
	1 mL <sup>(e)</sup>	1 mL <sup>(e)</sup>	1 mL <sup>(e)</sup>	1 mL <sup>(e)</sup>	5 mL <sup>(e)</sup>
E3-3S	18	-2.3	70	30	-4.5
E2-17G	7.9	-5.9	-3.9	-11	4.1
E2-17S	7.1	-1.6	8.0	0.4	-6.2
E1-3S	1.1	2.4	X	-0.1	-4.5
E2-3S	4.5	-2.0	3.9	-2.5	-9.4
E3	7.3	0.8	-75	-36	-6.2
E2	4.5	2.7	0.7	4.3	-11
E1	0.5	0.6	-15	-5.5	-6.9
EE2	7.2	11	2	0.2	1.2

(a) Accuracy for the selected estrogens ( $C = 200 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ). \* ( $C = 1000 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ). \*\* ( $C = 50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ).

(b) DW - drinking water; (c) RW - river water; (d) WW – wastewater (e) Sample volume.

## Additional data file 9

Article Table 14 - S7 – Matrix Effects for the selected estrogens for all waters tested (in percentage).

Estrogens <sup>(a)</sup>	DW <sup>(b)</sup>	RW <sup>(c)</sup>	RW* <sup>(c)</sup>	WW <sup>(d)</sup>
	1 mL <sup>(e)</sup>	1 mL <sup>(e)</sup>	5 mL <sup>(e)</sup>	1 mL <sup>(e)</sup>
E3-3S	111	85	84	153
E2-17G	90	91	107	87
E2-17S	100	93	97	98
E1-3S	99	100	154	148
E2-3S	128	120	95	78
E3	113	107	91	120
E2	117	113	99	103
E1	95	99	100	78
EE2	137	141	86	94

(a) Matrix effects for the selected estrogens (C = 200 ng L<sup>-1</sup>, n = 10). \* (C = 50 ng L<sup>-1</sup>, n = 10).

(b) DW - drinking water; (c) RW - river water; (d) WW – wastewater (e) Sample volume.

## Additional data file 10

Article Table 15 - S8 – Calculated recovery values in percentage for the selected estrogens. BetaBasic column was used as SPE column for the on-line SPE-LC-MS/MS method. Recovery values were calculated comparing the same volume injection of those of urine samples diluted at least ten times. (n = 5).

Estrogens	Recovery (%)		
	500 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>	5000 ng L <sup>-1</sup>
E3-3S	85	83	NC
E2-17G	94	90	NC
E2-17S	81	96	63
E1-3S	87	73	NC
E2-3S	92	93	64
E3	114	109	115
E2	117	99	97
E1	110	94	94
EE2	118	99	97

NC – not calculated because the signal was too strong

## 7. Conclusion

Depuis quelques décennies, les contaminants émergents sont devenus une source d'intérêt grandissante. Parmi ceux-ci, les perturbateurs endocriniens, spécifiquement les hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques, sont des composés dont le potentiel d'imiter ou d'interférer avec les fonctions hormonales normales (développement, croissance et reproduction) est reconnu même à des niveaux très bas ( $\text{ng L}^{-1}$ ). Les sources responsables du déversement de ces composés dans l'environnement aquatique sont multiples et découlent majoritairement de leur consommation et excrétion naturelle autant humaine qu'animale. Bien que les hormones soient excrétées sous la forme conjuguée, reconnues moins actives que dans le cas des hormones libres, elles peuvent être clivées par des processus microbiens avant ou pendant le traitement des eaux usées. Il a été démontré que l'exposition chronique des organismes aquatiques à ces substances contribue à l'apparition de divers phénomènes tels qu'un dérèglement hormonal, ainsi que des impacts potentiels sur les écosystèmes situés près des points de rejet des eaux usées contaminées.

Dans ce contexte, une méthode analytique en ligne LC-MS/MS pour la détection et la quantification simultanée des hormones stéroïdiennes libres et conjuguées dans les eaux usées, les eaux de surface et l'urine a été développée et validée. Cette méthode permet l'analyse des échantillons en utilisant un volume d'échantillon très faible (1 – 5 mL). Les hormones stéroïdiennes visées comptent trois œstrogènes naturels, un œstrogène synthétique et cinq œstrogènes conjugués, choisies en raison de leur présence et quantité dans l'environnement.

La méthode consiste en trois étapes principales : l'extraction (SPE), la séparation (HPLC) et la détection (MS/MS). L'optimisation de la spectrométrie de masse (MS/MS) a été effectuée pour obtenir la meilleure sensibilité possible pour les œstrogènes conjugués, y compris le choix du type d'ionisation (ESI-) et les solvants utilisés.



La validation de la méthode a été réalisée en évaluant la linéarité, la précision, l'exactitude, les limites de détection (MDL) et les limites de quantification (LOQ) de la méthode pour l'urine, l'eau purifiée, l'eau de robinet, l'eau de la rivière et des eaux usées. Les courbes d'étalonnage ont montré une bonne linéarité dans toutes les matrices, avec  $R^2 \geq 0,993$ , ainsi qu'une précision avec un coefficient de variance inférieure à 10%. Les limites de quantification varient d'un minimum de 3 à 15 ng L<sup>-1</sup> pour un volume d'injection entre 1 mL et 5 mL et le recouvrement des composés varie de 72 % à 117 %.

Il a été démontré que cette méthode était simple, sensible et très avantageuse pour détecter et quantifier les estrogènes libres et conjugués simultanément. Puisque cette nouvelle méthode ne nécessite pas de l'extraction manuelle, elle a permis de réduire le temps total d'exécution des analyses, le nombre d'étapes de travail, la consommation de solvant et les erreurs dues à l'intervention humaine. Les échantillons ont été analysés entre 15 à 20 min sans les étapes fastidieuses et qui prennent beaucoup de temps comme pour les méthodes SPE manuelles. La quantification a été réalisée en utilisant des étalons internes pour compenser les altérations des signaux dues à des interférences qui pourraient être présentes dans les échantillons. L'ion le plus abondamment produit a été utilisé pour déterminer la limite de détection de la méthode et de l'ion produit en moins grande quantité a été utilisé pour confirmer la présence des composés dans les échantillons.

L'applicabilité de cette nouvelle méthode a aussi été démontrée pour l'analyse d'échantillons d'urine, d'eaux de superficie et d'eaux usées avec succès. Malgré que la méthode développée ait une sensibilité adéquate pour l'analyse des hormones dans des échantillons d'urine, il reste encore des opportunités d'améliorations en ce qui concerne les limites de quantification de la méthode développée pour des échantillons d'eaux.

Différentes approches peuvent être utilisées pour améliorer la méthode, en fonction des besoins et de la faisabilité.

La sensibilité de la spectrométrie de masse peut être augmentée en ajoutant un adduit. Cependant, cela est plus facilement réalisable lorsque l'on ne considère qu'un seul composé, en raison de la possibilité d'interférer dans la détection et quantification d'autres composés.

L'étape qui mérite une attention particulière afin d'améliorer la sensibilité de la méthode dans l'ensemble serait l'étape d'extraction (SPE). Bien que l'extraction en ligne présente une très grande sensibilité considérant le petit volume utilisé pour l'analyse, la sensibilité est encore plus faible qu'avec les méthodes traditionnelles de SPE manuelle. Avec l'extraction manuelle, des volumes d'échantillon jusqu'à quatre litres peuvent être extraits avec facilité. Le grand volume d'échantillon utilisé augmente la concentration de l'analyte dans l'extrait et facilite la quantification de faibles concentrations. Cependant, la technique présente les inconvénients et des limitations déjà présentées dans cette étude. Une alternative (plus laborieuse et coûteuse) serait de coupler l'extraction manuelle avec l'extraction en ligne ce qui permettrait d'augmenter significativement la sensibilité de la méthode. Un grand volume initial de l'échantillon serait alors utilisé pour l'extraction manuelle et un volume d'échantillon pré-concentré serait injecté dans le système en ligne.

Concernant le défi de détecter des œstrogènes dans les échantillons d'eau, une hypothèse est que les échantillons ne présentent pas de concentration de ces hormones et/ou d'œstrogènes car ceux-ci sont déconjugués avant l'analyse des échantillons. Une suggestion pour tester cette hypothèse serait de recueillir et d'analyser des échantillons avec des concentrations connues de ces hormones.

Une observation importante est que les échantillons ont été analysés dans un délai de 24 à 72 heures après le prélèvement. Des études montrent que la déconjugaison peut se produire pendant de courtes périodes, souvent de quelques heures et donc cela serait une des raisons pour laquelle la méthode n'est pas capable de détecter les hormones dans cette matrice. Puisque l'objectif principal de la méthode mise au point est l'identification et la quantification des hormones conjuguées, tous les efforts ont été faits pour obtenir une bonne méthode pour ces composés. En ce qui concerne les hormones libres, une possibilité serait d'utiliser une méthode plus sensible pour l'analyse des hormones libres et d'analyser le même échantillon à

différents temps. Une augmentation de la concentration d'hormones libres en fonction du temps peut suggérer que le phénomène de déconjugaison est présent.

En conclusion, le développement de la nouvelle méthode d'analyse présentée dans ce mémoire avait comme objectif de trouver une approche efficace pour quantifier les œstrogènes libres et conjugués présents dans les eaux environnementales et dans l'urine. Les résultats présentés au chapitre six ont ainsi démontré que la méthode pouvait être une alternative intéressante par rapport à l'extraction par SPE manuelle et ainsi, permettait la possibilité d'analyser les deux formes d'œstrogènes à l'état de trace présent dans l'environnement et dans l'urine.

## **7.1 Perspectives**

La croissance de la population humaine et animale entrainera inévitablement une augmentation de la concentration des hormones stéroïdiennes dans l'environnement. Les données obtenues par d'autres études ont déjà montré que la concentration des œstrogènes a augmenté dans les eaux usées à certaines stations d'épuration des eaux et des effluents. Ceci suggère que la déconjugaison des œstrogènes ou que d'autres phénomènes tels que la liaison avec des particules peuvent se produire pendant le processus de traitement des eaux usées, ou encore dans l'environnement. Des défis importants se posent au niveau d'élimination de telles hormones dans les usines de traitement des eaux. L'objectif est de diminuer leurs rejets dans les eaux réceptrices destinées à la production d'eau potable et où vivent les espèces aquatiques susceptibles à ces composés à de très faibles concentrations.

Grâce au développement de ce type de méthode, il sera possible d'approfondir nos connaissances sur la présence et le comportement des hormones stéroïdiennes ainsi que sur l'étude de l'élimination de ces contaminants lors du traitement des eaux usées. Les travaux analytiques sur les hormones stéroïdiennes sont de sujet courant et d'intérêt dans les matrices environnementales et demeurent un défi par rapport aux questions que nous avons à leur sujet ainsi qu'à celles qui sont encore à venir.

## Bibliographie

1. Lajeunesse A, Gagnon C, Sauvé S: **Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2008, **80**:5325-33.
2. Purdom CE HP, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP: **Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works.** *J Chem Ecol* 1994, **8**:275-85.
3. Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S: **Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: a review.** *Sci Total Environ* 2009, **407**:4975-85.
4. Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S: **Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review.** *Sci Total Environ* 2009, **407**:731-48.
5. Routledge EJ SJ, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M: **Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening.** *Environ Sci Technol* 1998, **32**:1549-58.
6. Shore L, Gurevitz M, Shemesh M: **Estrogen as an environmental pollutant.** *Bull Environ Contam Toxicol* 1993, **51**:361-6.
7. Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R: **Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water.** *Environ Sci Technol* 2000, **34**:5059-66.
8. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, et al.: **Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities.** *Sci Total Environ* 2003, **302**:199-209.
9. Segura PA, Garcia-Ac A, Lajeunesse A, Ghosh D, Gagnon C, Sauvé S: **Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J Environ Monit* 2007, **9**:307-13.

10. Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot MF: **Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2008, **1210**:84-91.
11. Jenkins RL, Wilson EM, Angus RA, Howell WM, Kirk M: **Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent.** *Toxicol Sci* 2003, **73**:53-9.
12. Ohko Y, Iuchi K-i, Niwa C, Tatsuma T, Nakashima T, Iguchi T, et al.: **17 $\beta$ -Estradiol Degradation by TiO<sub>2</sub> Photocatalysis as a Means of Reducing Estrogenic Activity.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:4175-81.
13. Fieser LF FM. Steroids. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1959.
14. Xu N, Johnson AC, Jurgens MD, Llewellyn NR, Hankins NP, Darton RC: **Estrogen concentration affects its biodegradation rate in activated sludge.** *Environ Toxicol Chem* 2009, **28**:2263-70.
15. Laval Ud. [En ligne]. [cité le October 26, 2015]. Disponible: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/22502/ch03.html>
16. Rang HP DM, Ritter JM. Farmacologia. 4e éd: Guanabara Koogan; 2001.
17. Rubin BS: **Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects.** *J Steroid Biochem* 2011, **127**:27-34.
18. Peng X, Wang Z, Yang C, Chen F, Mai B: **Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2006, **1116**:51-6.
19. Miège C, Bados P, Brosse C, Coquery M: **Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009, **28**:237-44.
20. Flor S, Lucangioli S, Contin M, Tripodi V: **Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2010, **31**:3305-13.
21. Alvarez Sanchez B, Capote FP, Jimenez JR, Luque de Castro MD: **Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: an approach to lipidomics.** *J Chromatogr A* 2008, **1207**:46-54.

22. Panter GH, Thompson RS, Beresford N, Sumpter JP: **Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity.** *Chemosphere* 1999, **38**:3579-96.
23. Okayasu Y, Komori K, Yasojima M, Suzuki Y: **Degradation of Free Estrogens and their Conjugates in Wastewater Treatment Process.** *WEFTEC®* 2005, **2005**:291-7.
24. ScienceLab. [En ligne]. 2013 [cité le November 3, 2015 2015]. Disponible: <http://www.hmdb.ca/system/metabolites/msds/000/000/100/original/HMDB00145.pdf?1358894245>
25. OSHA. [En ligne]. 2006 [cité le November 30, 2015 2015]. Disponible: [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_238925.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_238925.html)
26. Helen Varney JMK, Carolyn L. Gegor. *Varney's midwifery*. Fourth Editione éd: . Jones and Bartlett Publishers; 2004.
27. Raju U, Bradlow HL, Levitz M: **Estriol-3-sulfate in human breast cyst fluid. Concentrations, possible origin, and physiologic implications.** *Ann N Y Acad Sci* 1990, **586**:83-7.
28. Canada LAdpd. [En ligne]. 2011 [cité le January 11, 2011 2011]. Disponible: <http://www.e-therapeutics.ca/>
29. Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE: **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review.** *Chemosphere* 1998, **36**:357-93.
30. Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GB, Wegener J, et al.: **Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands.** *Sci Total Environ* 1999, **225**:101-8.
31. Gentili A, Perret D, Marchese S, Mastropasqua R, Curini R, Di Corcia A: **Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.** *Chromatographia* 2002, **56**:25-32.
32. Koh YK, Chiu TY, Boobis A, Cartmell E, Lester JN, Scrimshaw MD: **Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2007, **1173**:81-7.

33. Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M: **Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2003, **984**:195-202.
34. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barcelo D: **Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2004, **1045**:85-92.
35. Kuster M, Azevedo DA, Lopez de Alda MJ, Aquino Neto FR, Barcelo D: **Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil).** *Environ Int* 2009, **35**:997-1003.
36. Huber MM, Korhonen S, Ternes TA, von Gunten U: **Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide.** *Water Res* 2005, **39**:3607-17.
37. Lee HB, Liu D: **Degradation of 17 $\beta$ -Estradiol and its Metabolites by Sewage Bacteria.** *Water Air Soil Poll* 2002, **134**:351-66.
38. Holthaus KIE, Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Smith JLL, Carter JE: **The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers.** *Environ Toxicol Chem* 2002, **21**:2526-35.
39. Lai KM, Johnson KL, Scrimshaw MD, Lester JN: **Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems.** *Environ Sci Technol* 2000, **34**:3890-4.
40. Jiang JQ, Yin Q, Zhou JL, Pearce P: **Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters.** *Chemosphere* 2005, **61**:544-50.
41. Schäfer AI, Nghiem LD, Waite TD: **Removal of the Natural Hormone Estrone from Aqueous Solutions Using Nanofiltration and Reverse Osmosis.** *Environ Sci Technol* 2003, **37**:182-8.
42. Nghiem LD, Schäfer AI: **Adsorption and Transport of Trace Contaminant Estrone in NF/RO Membranes.** *Environ Eng Sci* 2002, **19**:441-51.
43. Vogel J: **Tunnel vision: The regulation of endocrine disruptors.** *Policy Sciences* 2004, **37**:277-303.

44. Dickerson S, Gore A: **Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle.** *Rev Endocr Metab Disord* 2007, **8**:143-59.
45. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AI, Fico TA, et al.: **Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data.** *Reprod Toxicol* 1997, **11**:465-81.
46. Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsén H, Mayer I, Dimberg K: **Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol.** *Aquat Toxicol* 2001, **53**:139-52.
47. Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP: **Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence.** *Crit Rev Toxicol* 1998, **28**:319-61.
48. Le Curieux-Belfond O, Fievet B, Séralini GE, Mathieu M: **Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of estradiol-17 $\beta$  in the oyster *Crassostrea gigas*.** *J Exp Mar Bio Ecol* 2005, **325**:125-33.
49. Williams RJ, Jürgens MD, Johnson AC: **Initial predictions of the concentrations and distribution of 17 $\beta$ -oestradiol, oestrone and ethinyl oestradiol in 3 English rivers.** *Water Res* 1999, **33**:1663-71.
50. Johnson AC, Belfroid A, Di Corcia AD: **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** *Sci Total Environ* 2000, **256**:163-73.
51. Tixier C, Singer HP, Oellers S, Muller SR: **Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters.** *Environ Sci Technol* 2003, **37**:1061-8.
52. Zwiener C, Frimmel FH: **LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology - a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids.** *Anal Bioanal Chem* 2004, **378**:862-74.
53. Miao X-S, Koenig BG, Metcalfe CD: **Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2002, **952**:139-47.



54. Viglino L, Aboulfadl K, Mahvelat AD, Prevost M, Sauvé S: **On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters.** *J Environ Monit* 2008, **10**:482-9.
55. Viglino L, Aboulfadl K, Prevost M, Sauvé S: **Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS.** *Talanta* 2008, **76**:1088-96.
56. López de Alda MJ, Barceló D: **Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection.** *J Chromatogr A* 2001, **911**:203-10.
57. Fayad PB, Prevost M, Sauvé S: **On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters.** *Talanta* 2013, **115**:349-60.
58. Duong C, Ra J, Schlenk D, Kim S, Choi H, Kim S: **Sorption of Estrogens onto Different Fractions of Sediment and Its Effect on Vitellogenin Expression in Male Japanese Medaka.** *Arch Environ Contam Toxicol* 2010, **59**:147-56.
59. Rabii F. **Analyse des agents de chimiothérapie par extraction sur phase solide automatisée couplée à la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem (SPE-LC-ESI-MS/MS):** Dans: Montréal Ud, rédacteur. 2012. p. 101.
60. Hennion M-C: **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.** *J Chromatogr A* 1999, **856**:3-54.
61. Fontanals N, Marcé RM, Borrull F: **New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds.** *J Chromatogr A* 2007, **1152**:14-31.
62. Hernández-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodríguez-Delgado MÁ, Cifuentes A: **Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 2007, **1153**:214-26.
63. Hyötyläinen T: **Critical evaluation of sample pretreatment techniques.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**:743-58.
64. S.C.N. Queiroz CHC, I.C.S.F. Jardim: **Extração em Fase Sólida (SPE).** *Quim Nova* 2001, **24**:68.

65. Anastas P, Eghbali N: **Green Chemistry: Principles and Practice**. *Chem Soc Rev* 2010, **39**:301-12.
66. D'Archivio AA, Fanelli M, Mazzeo P, Ruggieri F: **Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography**. *Talanta* 2007, **71**:25-30.
67. S.C.N. Queiroz LFCM, I.C.S.F. Jardim: **Novos sorbentes baseados em poli(metiloxiloxano) sobre sílica para uso em extração em fase sólida**. *Quim Nova* 2006, **29**:637.
68. Tran AT, Hyne RV, Doble P: **Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC**. *Chemosphere* 2007, **67**:944-53.
69. Biziuk M, Namieśnik J, Czerwiński J, Gorlo D, Makuch B, Janicki W, et al.: **Occurrence and determination of organic pollutants in tap and surface waters of the Gdańsk district**. *J Chromatogr A* 1996, **733**:171-83.
70. Venn RF. Principles and Practice of Bioanalysis. Second Edition ed: CRC Press; 2008.
71. Rossi DT, Zhang N: **Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects**. *J Chromatogr A* 2000, **885**:97-113.
72. Caldas SS, Gonçalves FF, Primel EG, Prestes OD, Martins ML, Zanella R: **Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas**. *Quim Nova* 2011, **34**:1604-17.
73. Marin JM, Sancho JV, Pozo OJ, Lopez FJ, Hernandez F: **Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *J Chromatogr A* 2006, **1133**:204-14.
74. Gil Garcia MD, Martinez Galera M, Barranco Martinez D, Gisbert Gallego J: **Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography-fluorescence detection**. *J Chromatogr A* 2006, **1103**:271-7.
75. Kuster M, López de Alda MJ, Hernando MD, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D: **Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar**

**pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain).** *J Hydrol (Amst)* 2008, **358**:112-23.

76. Pacheco SG, R. L. O.; Peixoto, F. M.; Gouvêa, A. C. M. S.; Santiago, M. C. P. A.; Felberg, I.; Borguini, R. G.: **Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale.** *Analytical Chemistry: An Indian Journal* 2013, **12**:194-7.

77. Spackman DH, Stein WH, Moore S: **Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids.** *Anal Chem* 1958, **30**:1190-206.

78. Berezkin VG: **M.S. Tswett's Intellectual Heritage and Modern Chromatography.** *Anal Chem* 2001, **56**:587-92.

79. Cech NB, Enke CG: **Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals.** *Mass Spectrom Rev* 2001, **20**:362-87.

80. Niessen WMA. *Liquid chromatography--mass spectrometry.* 3rd ed. /e éd. Boca Raton :: CRC/Taylor & Francis; 2006.

81. Diaz-Cruz MS, Lopez de Alda MJ, Lopez R, Barcelo D: **Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS).** *J Mass Spect* 2003, **38**:917-23.

82. Johnson AC, Sumpter JP: **Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:4697-703.

83. Fayad PB, Prevost M, Sauvé S: **Laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry analysis of selected steroid hormones in wastewater: method optimization and application.** *Anal Chem* 2010, **82**:639-45.

84. Fotsis T: **The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS -II. Fractionation and quantitation of the main groups of estrogen conjugates.** *J Steroid Biochem* 1987, **28**:215-26.

85. Orme ML, Back DJ, Breckenridge AM: **Clinical pharmacokinetics of oral contraceptive steroids.** *Clin Pharmacokin* 1983, **8**:95-136.

86. Ternes TA, Kreckel P, Mueller J: **Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge.** *Sci Total Environ* 1999, **225**:91-9.

87. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M: **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** *Sci Total Environ* 1999, **225**:81-90.
88. Maggs JL, Grimmer SFM, Orme MLE, Breckenridge AM, Park BK, Gilmore IT: **The biliary and urinary metabolites of [3H]17 $\alpha$ -ethynylestradiol in women.** *Xenobiotica* 1983, **13**:421-31.
89. Lagoguey M, Dray F, Chauffournier JM, Reinberg A: **Circadian and circannual rhythms of testosterone and epitestosterone glucuronides in healthy human adults.** *C R Acad Sci* 1972, **274**:3435-7.
90. Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak SL, Perdiz D, Cargouet M, Levi Y: **Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples.** *J Separ Sci* 2003, **26**:105-11.
91. Suri RP, Singh TS, Chimchirian RF: **Effect of process conditions on the analysis of free and conjugated estrogen hormones by solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS).** *Environ Monit Assess* 2012, **184**:1657-69.
92. Segura PA, Gagnon C, Sauvé S: **A fully automated on-line preconcentration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of anti-infectives in wastewaters.** *Anal Chim Acta* 2007, **604**:147-57.
93. Jordan TB, Nichols DS, Kerr NI: **Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**:2257-66.
94. Oliferova L, Statkus M, Tsysin G, Zolotov Y: **On-line solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using polytetrafluoroethylene capillary.** *Talanta* 2007, **72**:1386-91.
95. Garcia-Ac A, Segura PA, Gagnon C, Sauvé S: **Determination of bezafibrate, methotrexate, cyclophosphamide, orlistat and enalapril in waste and surface waters using on-line solid-phase extraction liquid chromatography coupled to polarity-switching electrospray tandem mass spectrometry.** *J Environ Monit* 2009, **11**:830-8.
96. Garcia-Ac A, Segura PA, Viglino L, Furtos A, Gagnon C, Prevost M, et al.: **On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-**

- tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water.** *J Chromatogr A* 2009, **1216**:8518-27.
97. Schilling JB, Cepa SP, Menacherry SD, Bavda LT, Heard BM, Stockwell BL: **Liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry for the confirmation of sarafloxacin in catfish tissue.** *Anal Chem* 1996, **68**:1905-9.
98. Hennion MC: **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.** *J Chromatogr A* 1999, **856**:3-54.
99. Storm T, Hartig C, Reemtsma T, Jekel M: **Exact mass measurements on-line with high-performance liquid chromatography on a quadrupole mass spectrometer.** *Anal Chem* 2001, **73**:589-95.
100. Tauxe-Wuersch A, De Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J: **Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment.** *Water Res* 2005, **39**:1761-72.
101. Hogendoom EA, Huls R, Dijkman E, Hoogerbrugge R: **Microwave assisted solvent extraction and coupled-column reversed-phase liquid chromatography with UV detection use of an analytical restricted-access-medium column for the efficient multi-residue analysis of acidic pesticides in soils.** *J Chromatogr A* 2001, **938**:23-33.
102. Isobe T, Serizawa S, Horiguchi T, Shibata Y, Managaki S, Takada H, et al.: **Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay.** *Environ Pollut* 2006, **144**:632-8.
103. USEPA. Appendix B to 40 CFR part 136 of the Federal Register; Code of Federal Regulations (annual edition). U.S. Government Publishing Office 2011.
104. USEPA. EPA Method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS): Office of Water; 2010. 37 p.
105. Commission E. Council Regulation (EEC)1990.
106. Garcia-Ac A, Segura PA, Viglino L, Gagnon C, Sauvé S: **Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater.** *J Mass Spect* 2011, **46**:383-90.
107. Schuhmacher J, Zimmer D, Tesche F, Pickard V: **Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass**

- spectrometry: practical approaches to their elimination.** *Rapid Commun Mass Sp* 2003, **17**:1950-7.
108. Kloepfer A, Jekel M, Reemtsma T: **Occurrence, sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants.** *Environ Sci Technol* 2005, **39**:3792-8.
109. Hummel D, Loffler D, Fink G, Ternes TA: **Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass Spectrometry.** *Environ Sci Technol* 2006, **40**:7321-8.
110. Kuster A, Bachmann J, Brandt U, Ebert I, Hickmann S, Klein-Goedicke J, et al.: **Regulatory demands on data quality for the environmental risk assessment of pharmaceuticals.** *Regul Toxicol Pharm* 2009, **55**:276-80.
111. Labadie P, Cundy AB, Stone K, Andrews M, Valbonesi S, Hill EM: **Evidence for the Migration of Steroidal Estrogens through River Bed Sediments.** *Environ Sci Technol* 2007, **41**:4299-304.
112. Zhang H, Henion J: **Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology.** *Anal Chem* 1999, **71**:3955-64.