

Université de Montréal

**Analyse d'hormones stéroïdiennes par spectrométrie de masse dans les eaux du robinet, de surface et les eaux usées**

*par*

Ken Goeury

Département de Chimie  
Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)  
en Chimie, option Analytique

Février, 2022

© Ken Goeury, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de Chimie, Faculté des Arts et Sciences

---

*Cette thèse intitulée*

**Analyse d'hormones stéroïdiennes par spectrométrie de masse dans les eaux du robinet, de surface et les eaux usées**

*Présentée par*

**Ken Goeury**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Pierre Chaurand**

Président-rapporteur

**Sébastien Sauvé**

Directeur de recherche

**Michèle Prévost**

Codirectrice

**Patrick Hayes**

Membre du jury

**Zhe Lu**

Examineur externe

## Résumé

Il apparaît au grand jour que de nombreuses substances telles que les perturbateurs endocriniens sont introduites quotidiennement dans l'environnement. Ces molécules organiques bien souvent d'origine anthropique peuvent être employées dans d'innombrables circonstances : pharmaceutique, médecine, agriculture, cosmétique, agroalimentaire pour citer quelques exemples. Parmi ce large panel de composés, se trouvent les hormones stéroïdiennes. Un certain nombre de maladies et de modifications aussi bien comportementales que physiologiques tant chez l'humain que sur la faune aquatique sont attribuées à l'usage et aux rejets chroniques de ces perturbateurs endocriniens. Il est donc indispensable de développer une approche portée sur la prévention et l'étude des niveaux de contamination selon un seul maître-mot : précaution.

Dans ce contexte, ce projet de doctorat visait à développer de nouvelles méthodes de détection des hormones stéroïdiennes à niveau ultra-trace dans diverses matrices environnementales. La sélection des composés ciblés dans ce projet s'est basée sur la nouvelle liste de perturbateurs endocriniens prioritaires de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), récemment élargie à d'autres classes de substances dont le bisphénol A. Les méthodes analytiques ont été développées non seulement dans l'eau du robinet (EPA 539), mais également dans d'autres matrices plus complexes (eaux de surface, eaux usées). Commune à l'ensemble des procédures testées, la phase de validation analytique a permis de vérifier la conformité avec les exigences de performance de l'EPA. La première méthode mise au point repose sur une pré-concentration rapide de l'échantillon par extraction sur phase solide en ligne (*on-line SPE*) couplée à la chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) et à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La méthode validée présente de nombreux avantages—reproductibilité, automatisation, temps d'analyse minimal, logistique réduite et surtout des limites de détection de  $0,10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $7,5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  selon les différentes matrices étudiées. Cette méthode apparaît particulièrement adaptée pour la détection des hormones dans les eaux usées, en lien avec les plus fortes concentrations attendues. Cependant, il est apparu pertinent d'améliorer encore la sensibilité des méthodes dans certains contextes, notamment dans le cadre des

analyses d'eau de surface, compte tenu des critères de qualité applicables. La principale modification fut apportée au niveau de l'extraction et de la purification des échantillons. Amendée à la faveur des différentes matrices, l'étape d'extraction par SPE hors-ligne automatisée (*off-line SPE*) a permis d'atteindre des limites de détection adéquates variant de  $0,010 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $6,0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dépendamment de la matrice et du composé. Un aspect original de cette étude a consisté à étudier de façon plus systématique les facteurs de robustesse de la méthode lorsque soumise à certaines variations, tant au niveau de l'analyse instrumentale (phases mobiles, volume d'injection) que des protocoles (emploi de différents agents de conservation, par exemple).

L'analyse de la phase dissoute ne saurait être suffisante pour comprendre le devenir environnemental des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques, notamment leur distribution. Dans cette optique, la phase particulaire en suspension dans la colonne d'eau (SPM) fut également étudiée après optimisation et validation de la méthode d'extraction. Les limites de détection obtenues étaient comprises entre  $0,10 \text{ ng/g}$  et  $3,0 \text{ ng/g}$ , un degré de performance adéquat au regard des teneurs attendues dans l'environnement.

De telles méthodes ne trouveraient pas de fondement si elles n'étaient pas employées à l'analyse d'échantillons réels. C'est pourquoi, pour chaque méthode développée, une série d'échantillons d'eau a été analysée pour toutes les matrices étudiées. La quantification des hormones stéroïdiennes a permis de rendre compte des niveaux de concentrations retrouvés dans l'environnement. Une étude saisonnière d'un cours d'eau a également été réalisée durant quatre saisons (hiver, printemps, été et automne) afin d'évaluer les éventuelles variations saisonnières en termes d'occurrence et de concentration.

**Mots-clés :** perturbateurs endocriniens, hormones stéroïdiennes, bisphénol A, extraction sur phase solide, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, eau du robinet, eau de surface, eaux usées.



## Abstract

It is now admitted that many substances such as endocrine disruptors are released daily into the environment. This process can be of natural origin but is predominantly linked to human activity. Endocrine disruptors originate from numerous fields: medicine, agriculture, cosmetics, and the food industry, to name a few. Steroid hormones belong to this wide array of compounds. A significant number of human diseases and behavioral and physiological changes in both humans and aquatic life have been attributed to the use and chronic release of these endocrine disruptors. The effects of such a cocktail of substances are difficult to understand and evaluate. To date, the synergistic mechanisms or the potential cumulative effects are not well known. It remains essential to develop an approach focused on the prevention and the study of contamination levels with one key word in mind: precaution.

In this context and aiming to detect steroid hormones in tap water, surface water and wastewater at trace levels, new analytical methods have been developed within the framework of this project. The first method developed is based on high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS / MS). LC-MS/MS hyphenation involved using an electrospray ionization source at atmospheric pressure with heating element (H-ESI). Pre-concentration and purification of the samples were executed by on-line solid phase extraction (on-line SPE). The validated method presents several advantages: reproducibility, automation, minimum analysis time, reduced logistics and above all, detection limits ranging from  $0.10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $7.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  considering the different matrices studied.

The second approach proposed herein is based on the development of an analysis method allowing lower detection limits compared to the previous workflow. The same detection method was used, but a modification was made to the sample extraction and purification. Allowing for greater pre-concentration than online SPE, manual SPE (off-line SPE) was used in this method. Depending on the particular matrix, the extraction step allowed to reach adequate detection limits for the analysis of environmental aqueous samples:  $0.010 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  up

to  $6.0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  from the matrix-free sample to the most complex matrices. The use of an automated system also made it possible to make the extraction step robust and reproducible.

The analysis of the dissolved phase of water samples cannot be sufficient to understand and comprehensively assess the contamination of aquatic environments. The particulate phase in suspension in the water column (SPM) was also studied. The extraction method was optimized and validated. Coupled with the previous method of analysis, it was possible to quantify the steroid hormones attached to suspended materials. The obtained detection limits ranged from  $0.10 \text{ ng/g}$  to  $3.0 \text{ ng/g}$  dry weight.

For each developed method, dissolved phase samples were analyzed for all the studied matrices (tap water, surface water and wastewater). Quantification of steroid hormones allowed the comprehension of concentration levels found in the environment under usual discharge conditions in multiples matrices. A seasonal study of a watercourse was also carried out during the winter, spring, summer and fall seasons to observe possible seasonal variations in terms of occurrence and concentration.

**Keywords:** endocrine disruptors, steroid hormones, solid phase extraction, liquid chromatography, mass spectrometry, tap water, surface water, wastewater.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xii</b>
<b>Liste d'abréviations, sigles et acronymes</b> .....	<b>xxvi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxxii</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction générale et mise en contexte</b> .....	<b>34</b>
1.1 Contaminants « émergents » ou « d'intérêt émergent » ?.....	34
1.1.1 Origine, usages et intérêt .....	35
1.1.2 Contamination environnementale et risques associés .....	37
1.2 Les perturbateurs endocriniens (EDCs).....	40
1.2.1 Notions importantes et fonctionnement.....	40
1.2.1.1 D'où viennent-ils ? .....	40
1.2.1.2 Quels sont leurs modes d'action dans les organismes ?.....	43
1.2.1.3 Des effets toxicologiques difficiles à appréhender .....	44
1.3 Les hormones stéroïdiennes et le bisphénol A.....	53
1.3.1 Retour historique et origines.....	54
1.3.2 Structure et mode de fonctionnement.....	55
1.3.3 Synthèse chimique pour la production des hormones synthétiques et du bisphénol A .....	62
1.3.4 Classification des hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestatifs et androgènes) et du bisphénol A .....	63
1.3.4.1 Propriétés physicochimiques.....	64
1.3.4.2 Sources et devenir environnemental .....	70
1.3.5 Occurrence dans l'environnement .....	77
1.3.5.1 Présence dans l'eau du robinet .....	77
1.3.5.2 Présence dans l'eau de surface .....	78
1.3.5.3 Présence dans les eaux usées.....	80

1.3.5.4	Présence sur la phase particulaire dans l'eau .....	87
1.3.5.5	Normes et recommandations .....	88
<b>Chapitre 2 – Préparation des échantillons et analyse des hormones .....</b>		<b>89</b>
2.1	Mise en contexte .....	89
2.2	Échantillonnage et préservation des échantillons .....	90
2.3	Un large panel de méthodes d'extraction.....	96
2.3.1	Extraction basée sur des méthodes instrumentales.....	96
2.3.2	Extraction par ultrasons .....	97
2.3.3	Extraction sur phase solide .....	98
2.3.4	Méthodes d'extraction d'échantillons en phase dissoute, particulaire et solide 100	
2.4	Méthodes détaillées de préparation des échantillons .....	100
2.4.1	Extraction sur phase solide hors-ligne (off-line SPE) .....	100
2.4.1.1	Caractéristiques techniques et instrumentation .....	100
2.4.1.2	Extraction des échantillons d'eau HPLC et d'eau du robinet .....	104
2.4.1.3	Extraction des échantillons d'eau de surface et d'eaux usées.....	104
2.4.2	Extraction sur phase solide automatisée en ligne (on-line SPE) .....	105
2.4.3	Extraction de la phase particulaire des échantillons d'eau (SPM) .....	108
2.5	Méthodes de séparation .....	109
2.5.1	Diversité des méthodes de séparation pour l'analyse des hormones.....	110
2.5.2	La chromatographie liquide.....	112
2.6	La spectrométrie de masse (MS) .....	115
2.6.1	Aspect général .....	115
2.6.2	Les sources d'ionisation .....	117
2.6.2.1	Généralités.....	117
2.6.2.2	Source APCI.....	117
2.6.2.3	Source (H)ESI .....	119
2.6.3	L'analyseur .....	121
2.6.3.1	Analyseurs disponibles pour l'analyse des hormones.....	121

2.6.3.2	Le triple quadripôle .....	123
2.7	Problématique, justification et objectifs des travaux de recherche.....	127
2.8	Structure de la thèse.....	128
<b>Chapitre 3. Analyse d’hormones perturbatrices endocriniennes prioritaires selon l’Agence de protection de l’environnement et du bisphénol A dans l’eau du robinet, l’eau de surface et les eaux usées par méthode de préconcentration en-ligne couplée à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse en tandem.....</b>		
<b>130</b>		
<b>Abstract</b>	<b>132</b>	
3.1	Introduction.....	133
3.2	Materials and methods .....	135
3.2.1	Chemicals and standards .....	135
3.2.2	Sample collection and pre-treatment .....	136
3.2.3	Sample preparation and instrumental analysis .....	137
3.2.4	Method validation.....	139
3.2.5	Quality assurance (QA) / quality control (QC) .....	139
3.3	Results and discussion .....	141
3.3.1	Instrumental optimization.....	141
3.3.2	Validation of the on-line SPE – UHPLC-MS/MS method.....	144
3.3.2.1	On-line SPE recovery.....	144
3.3.2.2	Matrix effects and quantification procedure .....	145
3.3.2.3	Linearity performance and LOD/LOQ.....	146
3.3.2.4	Precision and trueness .....	150
3.3.3	Method demonstration to water samples from Eastern Canada .....	153
3.3.4	Contribution of the study to the state-of-art .....	158
3.4	Conclusions.....	159
3.5	Supplementary Material.....	161
<b>Chapitre 4. Évaluation d’une extraction automatisée hors ligne sur phase solide suivie d’une analyse par LC-MS/MS pour la surveillance des perturbateurs endocriniens sur</b>		

## la liste prioritaire de l'EPA dans l'eau du robinet, les eaux de surface et les eaux usées

178

### Abstract 179

4.1	Introduction.....	180
4.2	Materials and methods .....	183
4.2.1	Chemicals and standards .....	183
4.2.2	Sample collection and pre-treatment .....	183
4.2.3	Sample preparation and instrumental analysis .....	184
4.2.4	Method validation.....	185
4.2.5	Quality assurance / quality control .....	186
4.3	Results and discussion .....	186
4.3.1	Evaluation of select SPE adsorbents .....	186
4.3.2	Potential factors affecting analytical performance .....	189
4.3.2.1	Sample storage conditions.....	189
4.3.2.2	Sample pH adjustment .....	190
4.3.2.3	Reconstitution medium .....	191
4.3.2.4	Instrumental method factors.....	192
4.3.3	Analytical validation.....	193
4.3.4	Method application to water samples from Eastern Canada .....	197
4.3.4.1	Wastewater samples (Influents) .....	197
4.3.4.2	Wastewater samples (Effluents).....	199
4.3.4.3	Surface water samples.....	201
4.3.4.4	Tap water samples.....	202
4.3.5	Lessons learned and remaining challenges.....	204
4.4	Conclusions.....	206
4.5	Supplementary material .....	208

<b>Chapitre 5. Évaluation du risque en lien avec la présence des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase dissoute et la matière particulaire en suspension dans les eaux de surface du Québec, Canada.....</b>	<b>227</b>
---	------------

<b>Abstract</b>	<b>228</b>
5.1	Introduction..... 229
5.2	Materials and methods ..... 232
5.2.1	Chemicals and standards ..... 232
5.2.2	Sample collections..... 232
5.2.3	Sample preparation and instrumental analysis ..... 235
5.2.4	Analytical method validation ..... 236
5.2.5	Quality assurance/quality control ..... 237
5.2.6	Risks to aquatic organisms ..... 238
5.2.7	Statistics and GIS ..... 239
5.3	Results and discussion ..... 241
5.3.1	Endocrine disruptors in southwestern Quebec (Survey 1) ..... 241
5.3.2	Seasonal sampling of the Mille-Iles River (Survey 2) ..... 243
5.3.2.1	Dissolved phase samples ..... 243
5.3.2.2	Suspended particulate matter (SPM) samples ..... 247
5.3.3	Ecological risk assessment ..... 249
5.4	Conclusions..... 251
5.5	Supplementary material ..... 253
<b>Chapitre 6. Conclusions</b>	<b>287</b>
6.1	Conclusions..... 287
6.2	Perspectives ..... 291
<b>7. Références</b>	<b>296</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1-1.</b> Principaux effets observés des EDCs sur les êtres vivants présents dans l'environnement.....	46
<b>Tableau 1-2.</b> Noms triviaux et systématiques d'hormones stéroïdiennes de premier plan..	59
<b>Tableau 1-3.</b> Exemples de bisphénols selon leurs substituants sur le carbone central. ....	62
<b>Tableau 1-4.</b> Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (*) sont des hormones synthétiques.....	66
<b>Tableau 1-4.</b> Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (*) sont des hormones synthétiques.....	67
<b>Tableau 1-4.</b> Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (*) sont des hormones synthétiques. ....	68
<b>Tableau 1-4.</b> Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (*) sont des hormones synthétiques. ....	69
<b>Tableau 1-5.</b> Concentrations relevées dans les eaux de surface .....	78
<b>Tableau 1-6.</b> Concentrations relevées dans les affluents de stations d'épuration.....	81
<b>Tableau 1-7.</b> Concentrations relevées dans les effluents de stations d'épuration.....	84
<b>Tableau 1-8.</b> Concentrations relevées dans la phase particulaire de l'eau de surface. ....	87
<b>Tableau 2-1.</b> Résumé de différentes techniques analytiques employées dans le cadre de l'analyse des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans les matrices aquatiques.....	92
<b>Tableau 2-2.</b> Résumé des différentes techniques analytiques employées dans le cadre de l'analyse des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase particulaire.....	95



<b>Tableau 2-2.</b> Les différents types d'analyseurs communément utilisés dans l'analyse des hormones d'après De Hoffmann <i>et al.</i> et Holčapek <i>et al.</i> [332,339].....	121
<b>Tableau 2-3.</b> Principe de fonctionnement des différents types d'analyseurs communément utilisés dans l'analyse des hormones d'après Gross <i>et al.</i> et De Hoffmann <i>et al.</i> [328,332] .....	122
<b>Table 3.1.</b> Summary of R <sup>2</sup> , LODs, and LOQs for the 14 targeted EDCs in the different matrices assayed (TW: tap water; SW: surface water; Inf: wastewater influent; Eff: wastewater effluent). .....	149
<b>Table 3.2.</b> Intra-day and inter-day precision (RSD, %) for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (see also Section 2.5). .....	151
<b>Table 3.3.</b> Trueness (%) in HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf), and wastewater effluent (Eff), determined at two spike levels (see also Section 2.5).....	153
<b>Table 3.4.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in raw sewage (WWTP influent) measured at selected WWTP in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L <sup>-1</sup> . ND = not determined. ....	154
<b>Table 3.5.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the treated effluent of selected WWTPs in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L <sup>-1</sup> .....	155
<b>Table 3.6.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in surface water at different locations in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L <sup>-1</sup> .....	156
<b>Table 3.7.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in different tap water samples from selected municipalities in two Canadian provinces (Quebec and Ontario). Concentrations are expressed in ng·L <sup>-1</sup> .....	157
<b>Table S3.1.</b> Chromatographic conditions for the on-line SPE – UHPLC-MS/MS analysis of hormones and bisphenol A. ....	163

<b>Table S3.2.</b> Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS; SRM) parameters for the targeted analytes in both positive and negative mode. ....	164
<b>Table S3.3.</b> Illustration of the variability (RSD, %) of intermediate-level continued verification standards (CVS) injected to control the chromatographic retention times (RT), analyte absolute areas (Area), and native analyte to internal standard area ratios ( $A_N/A_{IS}$ ) along the on-line SPE UHPLC-MS/MS analytical sequence. The relative standard deviation performance (RSD, %) is illustrated here in the case of 5 CVS samples injected regularly along a sequence comprising 30 surface water samples.....	165
<b>Table S3.4.</b> Verification of IS variability (% RSD) in terms of absolute area across samples (amended at $50 \text{ ng L}^{-1}$ with isotope-labelled IS) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, for the different matrix types (HPLC: matrix-free HPLC water; TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent). ....	166
<b>Table S3.5.</b> Verification of IS variability (% RSD) in terms of chromatographic retention time (RT) across individual samples (amended at $50 \text{ ng L}^{-1}$ with isotope-labelled IS) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, for the different matrix types (HPLC: matrix-free HPLC water; TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent). ....	166
<b>Table S3.6.</b> Verification of IS relative recovery (mean $\pm$ SD) across individual field samples analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, across the four matrix types (TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent). ....	167
<b>Table S3.7.</b> Matrix effects at high level concentration ( $C = 160 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for the four different matrixes. A negative value indicates ion suppression with respect to matrix-free (HPLC) water, while a positive value indicates signal enhancement with respect to matrix-free (HPLC) water. ....	167
<b>Table S3.8-(a).</b> Relative matrix effects established comparing the slope of individual sample and the matrix-match line for the four different matrixes. Ion suppression results a negative value while signal enhancement results a positive value. ....	168

**Table S3.8-(b).** Relative matrix effects established comparing the slope of individual sample and the matrix-match line for the four different matrixes. Ion suppression results a negative value while signal enhancement results a positive value. .... 169

**Table 4.1.** Comparison of method detection limits (LOD, ng/L) of EU-priority ethinylestradiol (EE2), estrone (E1), and 17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2) in tap water, surface water, and wastewater in the present study and recent literature (2012-2021). Method LOD requirements of the EU Water Framework Directive are shown in italicized font. .... 196

**Table 4.2.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the influent of selected WWTPs in the province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup> and ND refers to “not detected”..... 198

**Table 4.3.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the treated effluent of selected WWTPs in the province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup> and ND refers to “not detected”..... 200

**Table 4.4.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in different tap water samples from selected municipalities in province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup> and ND refers to “not detected”..... 203

**Table S4.1.** Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS; SRM) parameters for the targeted analytes in positive and negative ionization mode. .... 211

**Table S4.2.** Illustration of the quality control chart approach implemented via Continued Calibration Verification (CCV) samples, showing the relative standard deviations (RSD%) for the following criteria: retention time (RT), absolute area (Area), and area ratio of native analytes to their isotope-labelled internal standard ( $A_N/A_{ILIS}$ ). .... 212

**Table S4.3.** Matrix effects established in the different matrixes upon a comparison with neat HPLC water. (S4.3a) Spike level 1 (QC1). Pass/fail performance refers to the USEPA criterion for accuracy (70-130%), equating here to matrix effects within  $\pm 30\%$ . .... 213

**Table S4.3.** Matrix effects established in the different matrixes upon a comparison with neat HPLC water. (S4.3b) Spike level 2 (QC2). Pass/fail performance refers to the USEPA criterion for accuracy (70-130%), equating here to matrix effects within  $\pm 30\%$ . .... 214

**Table S4.4.** Summary of R<sup>2</sup>, LODs, and LOQs for the 15 targeted EDCs in the different studied matrixes (HPLC water, tap water, surface water, wastewater influent and wastewater effluent).

.....215

**Table S4.5.** Intra-day and inter-day precision (RSD%) for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (QC1 and QC2, see also Text S4.3). RSDs higher than 20% are indicated in bold. ....216

**Table S4.6.** Accuracy (%) performance of matrix-matched extracted calibrants for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (QC1 and QC2, see also Text S4.3). Accuracy values were all within the USEPA acceptance criterion of 70-130%. .... 217

**Table S4.7.** Individual concentrations and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in river surface waters from different locations in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L<sup>-1</sup>. .... 218

**Table S4.8.** Geographical information and identification of studied sites for the quantification of EDCs in tap water (Province of Quebec)..... 220

**Table 5.1.** Summary of compiled predicted no-effect concentrations (PNEC, ng/L) for estrogenic endocrine-disruptors..... 240

**Table 5.2.** Detection frequency (% of samples above the reporting limit) and concentration ranges (min – max of samples with detections) of endocrine disruptors detected in the St. Lawrence River and tributaries (Survey 1, n = 69). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup> and ng·g<sup>-1</sup> for the dissolved phase and the SPM, respectively. .... 242

**Table 5.3.** Detection frequency (% of samples above the reporting limit) and concentration ranges (min – max of samples with detections) of endocrine disruptors detected in the Mille Iles River (Survey 2, n = 68). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup> and ng·g<sup>-1</sup> for the dissolved phase and the SPM, respectively. Mean SPM-water distribution coefficients (Log  $K_d$ , L·kg<sup>-1</sup>) are also provided with corresponding standard deviations (SD), when applicable. ....245

<b>Table S5.1.</b> Geographical information of sampling sites as part of Survey (1) in the St. Lawrence River and 15 of its tributaries. Corresponding sampling maps are also shown in SI Figure S1. ....	256
<b>Table S5.2.</b> Geographical information of sampling sites as part of Survey (2) along the Mille Iles River.....	259
<b>Table S5.3.</b> Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters for the targeted analytes in both positive and negative mode (selected reaction monitoring (SRM), fast-polarity switching electrospray ionization). ....	260
<b>Table S5.4.</b> Summary of R <sup>2</sup> , LODs, LOQs, precision and accuracy for the 15 targeted EDCs in suspended particulate matter. ....	261
<b>Table S5.5.</b> Individual concentrations of EDCs in aqueous phase samples of Survey (1), collected in the St. Lawrence River and major tributaries (province of Quebec, Canada). Concentrations are indicated in ng·L <sup>-1</sup> . ....	262
<b>Table S5.6.</b> Individual concentrations of EDCs in suspended particulate matter (SPM) samples of Survey (1), collected in the St. Lawrence River and major tributaries (province of Quebec, Canada). Concentrations are indicated in ng·g <sup>-1</sup> . ....	265
<b>Table S5.7.</b> Concentration ranges (ng·L <sup>-1</sup> ) of the targeted endocrine disruptors in surface water samples reported in this and other studies. (n.a.: not analysed; n.d.: not detected)..	268
<b>Table S5.8.</b> Individual concentrations and total concentrations (ΣEDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples Survey (2) (Mille Iles River) during the winter. Concentrations are indicated in ng·L <sup>-1</sup> . ....	270
<b>Table S5.9.</b> Individual concentrations and total concentrations (ΣEDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples Survey (2) (Mille Iles River) during the spring. Concentrations are indicated in ng·L <sup>-1</sup> . ....	271
<b>Table S5.10.</b> Individual concentrations and total concentrations (ΣEDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples Survey (2) (Mille Iles River) during the summer. Concentrations are indicated in ng·L <sup>-1</sup> . ....	272

<b>Table S5.11.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples Survey (2) (Mille Iles River) during the autumn. Concentrations are indicated in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .	273
<b>Table S5.12.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of Survey (2) (Mille Iles River) during the winter. Concentrations are indicated in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .	274
<b>Table S5.13.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of Survey (2) (Mille Iles River) during the spring. Concentrations are indicated in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .	275
<b>Table S5.14.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of Survey (2) (Mille Iles River) during the summer. Concentrations are indicated in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .	276
<b>Table S5.15.</b> Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of Survey (2) (Mille Iles River) during the autumn. Concentrations are indicated in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .	277
<b>Table S5.16.</b> Comparison of $\Sigma$ EDC concentrations in the dissolved phase between seasons (survey 2), showing the p-values of the pairwise Wilcoxon's rank-sign tests. Significant differences are highlighted in bold (p-value <0.05).	278
<b>Table S5.17.</b> Relative contributions (%) of the target endocrine disruptors to the summed EDC levels in the dissolved phase of survey 2 (Mille Iles River), arranged per sampling season. Contributions higher than 5% are highlighted in bold font.	278
<b>Table S5.18.</b> Comparison of $\Sigma$ EDC concentrations in the SPM between seasons (survey 2), showing the p-values of the pairwise Wilcoxon's rank-sign tests. Significantly different data are highlighted in bold (p-value <0.05).	279
<b>Table S5.19.</b> Solid water distribution coefficient $\text{Log } K_d$ ( $K_d$ in $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples in the province of Quebec (Canada).	279
<b>Table S5.20.</b> Calculated site-specific estrogenic activities (EEQ, $\text{ng } \text{E}_2/\text{L}$ ) for survey (1) (n = 69). Values above the threshold of 1 $\text{ng } \text{E}_2 / \text{L}$ are highlighted in red font.	280

**Table S5.21.** Calculated site-specific estrogenic activities (EEQ, ng E2/L) for survey (2) (n = 68). Values above the threshold of 1 ng E2 / L are highlighted in red font. .... 281

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> Sources, dégradation, devenir et transport des contaminants émergents dans l'environnement d'après Wilkinson et al [25].....	38
<b>Figure 1.2</b> Nombre de publications annuelles faisant référence aux perturbateurs endocriniens lorsque les mots-clefs « perturbateur endocrinien » sont inscrits dans le moteur de recherche ISI Web of Science.....	42
<b>Figure 1.3</b> Illustration de la perturbation endocrinienne sur un organe cible. Le perturbateur endocrinien bloque complètement ou en partie le site de reconnaissance du récepteur modifiant ainsi sa fonction. ....	43
<b>Figure 1.4</b> Comparaison entre le lac témoin (A) et le lac contaminé (B) avec 5-6 ng L <sup>-1</sup> d'éthinylestradiol. Mesure effectuée au niveau de la fourche sur une durée de 7 ans. D'après Kidd <i>et al</i> [57]. ....	45
<b>Figure 1.5</b> Composition du système endocrinien chez la femme (à gauche) et chez l'homme (à droite) d'après Gore <i>et al.</i> [72].....	48
<b>Figure 1.6</b> Évolution de la densité moyenne de sperme d'après un ensemble de 61 publications parues entre 1938 et 1990. Le diamètre du cercle est proportionnel à la taille de l'échantillon [83]. ....	51
<b>Figure 1.7</b> Représentation de la structure du noyau stérane (à gauche) et du cortisol (à droite) en fonction de l'identification des cycles et de la numérotation des carbones. ....	56
<b>Figure 1.8</b> Représentation d'une structure de type $\alpha$ (à gauche) et de type $\beta$ (à droite) en fonction de la position de l'atome d'hydrogène sur le carbone 5.....	56
<b>Figure 1.9</b> Représentation des deux conformations possible trans- (à gauche) et cis- (à droite) à la jonction de deux cycles non-aromatiques dans le squelette stérane.....	57
<b>Figure 1.10</b> Représentation des deux conformères possibles pour le cyclohexane à savoir la configuration « bateau » à gauche et la configuration « chaise » à droite. Les lettres « a » et « e » représentent respectivement les groupements situés dans le plan axial et ceux situés dans le plan équatorial. ....	58



<b>Figure 1.11</b> Représentation du 17 $\alpha$ -estradiol / estra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\alpha$ -diol (à gauche) et du 17 $\beta$ -estradiol / estra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol (à droite) en fonction de la configuration absolue du carbone 17.....	58
<b>Figure 1.12</b> Schématisation des mécanismes impliqués dans la stéroïdogénèse à partir du cholestérol. Les enzymes et leur localisation sont représentées dans les différents encadrés [112]. .....	60
<b>Figure 1.13</b> Structure générale d'un bisphénol (squelette diphenylméthane).....	61
<b>Figure 1.14</b> Voie de synthèse industrielle du Bisphénol A. Réaction de condensation de l'acétone sur 2 équivalents molaires de phénol. ....	62
<b>Figure 1.15</b> Sources et devenir environnemental de l'éthinylestradiol (modèle applicable aux autres hormones ostrogéniques, androgéniques et progestatifs) [143].....	72
<b>Figure 1.16</b> Processus (proposé) de biotransformation des œstrogènes dans l'environnement [167].....	74
<b>Figure 1.17</b> Sommaire des processus de dégradation/transformation du BPA selon les différents milieux. Seuls les intermédiaires sont ici représentés [182]. .....	76
<b>Figure 2.1</b> Représentation de la phase stationnaire d'une cartouche SPE Oasis HLB mettant en lumière la balance entre les interactions hydrophobes (chaines alkyles et noyaux benzéniques) et les interactions intermoléculaires hydrophiles (pyrrolidones).....	101
<b>Figure 2.2</b> Schéma explicatif des différentes étapes nécessaires à la purification et l'extraction dans le cadre d'une extraction sur phase solide hors-ligne (SPE off-line). Les différentes étapes y sont représentées de la gauche vers la droite : conditionnement, percolation, lavage (puis séchage) et élution.....	102
<b>Figure 2.3</b> Schéma de fonctionnement de la SPE automatisée en ligne couplée à la spectrométrie de masse en tandem (on-line SPE-LC-MS/MS). L'étape 1 représente l'étape de conditionnement de la colonne SPE. L'étape 2 représente le chargement de la colonne SPE. L'étape 3 représente l'élution des analytes vers la colonne analytique et l'analyseur. Adapté de Viglino <i>et al.</i> [116].....	106

<b>Figure 2.4</b> Exemple de phase stationnaire peu polaire utilisée lors de l'analyse d'hormones par chromatographie en phase gazeuse .....	110
<b>Figure 2.5</b> Dérivation d'un groupement hydroxyle par le BSTFA en vue d'une analyse par chromatographie sur phase gazeuse .....	111
<b>Figure 2.6</b> Schéma représentatif du mécanisme d'ionisation d'une molécule par APCI en mode positif adapté de M. Vestal [329] .....	119
<b>Figure 2.7</b> Schéma représentatif du mécanisme d'ionisation d'une molécule par ESI en mode positif adapté de De Hoffmann <i>et al.</i> [332] .....	120
<b>Figure 2.8</b> Schématisation d'un quadripôle (gauche) et des paires d'électrodes (droite) d'après Gross et De Hoffmann <i>et al.</i> [328,332] .....	123
<b>Figure 2.9</b> Schéma de fonctionnement d'un analyseur de type triple quadripôle.....	124
<b>Figure 2.10</b> Mécanisme de fragmentation possible pour l'estradiol (E2) m/z 271 vers son ion fragment majoritaire à m/z 183, en mode négatif. Adapté de Wooding <i>et al.</i> [340]....	126
<b>Figure 3.1.</b> Direct injection UHPLC-MS/MS sensitivity depending on different concentrations of NH <sub>4</sub> F salt. Compounds analyzed in negative mode follow the same trend as equilin (left panel), and those analyzed in positive mode follow the same trend as progesterone (right panel).....	142
<b>Figure 3.2.</b> Influence of the on-line SPE wash volume (mL) on analyte absolute area for the 14 targeted EDCs (C = 50 ng·L <sup>-1</sup> ) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, illustrated for surface water (left) and wastewater effluent (right). Error bars indicate standard deviations (n = 3 per condition). .....	144
<b>Figure S3.1.</b> Chemical structures of targeted hormones studied in the present work. ....	170
<b>Figure S3.2.</b> On-line setup and procedure for the presented analytical method. Step 1 represent the load of the sample in the 10 mL loop while the MS mobile phase is conditioning the analytical column. Step 2 shows the pre-concentration of analytes on the tandem-SPE-columns. Step 3 describes the washing step of the 10 mL loop and the elution of analytes to the chromatographic column and MS/MS detection. ....	171

<b>Figure S3.3.</b> Relative sensitivity depending on different sources (APCI Vs. heated-ESI) and mobile phases in the particular case of mestranol. ....	172
<b>Figure S3.4.</b> Relative sensitivity depending on using the polarity-switching mode (+/-) or single ionization modes, (-) or (+). Compounds analysed in positive mode follow the same trend as progesterone (right panel) and those analysed in negative mode follow the same trend as equilin (left panel).....	173
<b>Figure S3.5.</b> Relative sensitivity depending on the different salt concentrations in the case of mestranol. .....	174
<b>Figure S3.6.</b> Online recoveries for studied hormones and Bisphenol A (BPA). Reported values range from 64 to 79%.....	175
<b>Figure S3.7.</b> SRM chromatogram of EE2 in a spiked surface water sample at 5 ng·L <sup>-1</sup> . Signal over the noise was automatically determined. ....	176
<b>Figure S3.8.</b> On-line SPE – UHPLC-MS/MS chromatograms of the 14 hormones (quantification transition; C = 100 ng·L <sup>-1</sup> ) and the five internal standards (isotope-labelled ISs) with the finally retained conditions: analytical mobile phase composition (H <sub>2</sub> O:methanol), on-line SPE loading mobile phase (H <sub>2</sub> O HPLC with 0.1% HCOOH), on-line SPE loading flow rate (1500 μL min <sup>-1</sup> ) and sample volume (10 mL). ....	177
<b>Figure 4.1.</b> Absolute off-line SPE recoveries for the 13 targeted hormones and bisphenol A (C = 100 ng·L <sup>-1</sup> ).....	187
<b>Figure 4.2.</b> Absolute off-line SPE recoveries for the 14 targeted hormones and bisphenol A (BPA) with the in-house method and HRPHS SolEx cartridge, considering different water matrixes (HPLC-water, tap water, surface water, wastewater influent, and wastewater effluent). Error bars refer to standard deviations (n = 3 per condition). ....	188
<b>Figure 4.3.</b> Absolute areas (in arbitrary units – a.u.) of target EDCs when surface water samples were amended with different preservatives (formaldehyde, 100 ng·L <sup>-1</sup> ; Omadine, 70 mg·L <sup>-1</sup> ; sodium thiosulfate, 70 mg·L <sup>-1</sup> ) prior a 21-day storage period at 4 °C. Error bars represent standard deviations (n = 3 per condition). ....	190

<b>Figure 4.4.</b> Absolute signal intensity (in arbitrary units – a.u.) for targeted compounds depending on pH (sample pH, pH = 7 and pH = 5) in wastewater influent (left) and tap water (right). Error bars represent standard deviations (n = 3 per condition). .....	191
<b>Figure 4.5.</b> Signal intensity (in arbitrary units – a.u.) variation depending on % MeOH in the reconstitution medium (injection volume: 100 µL). Error bars represent standard deviations (n = 3 per condition). .....	192
<b>Figure S4.1.</b> Chemical structures of the targeted EDCs. ....	221
<b>Figure S4.2.</b> Illustration of the automated offline solid-phase extraction apparatus used for sample pre-concentration.....	222
<b>Figure S4.3.</b> Number of points per chromatographic peak illustrated for medroxyprogesterone at low (a) and high (b) concentration.....	223
<b>Figure S4.4.</b> Analyte mean absolute areas for 5 CCV samples (spike level: 100 ng·L <sup>-1</sup> ) regularly injected during an LC-MS sequence of 25 samples. Error bars refer to standard deviations (n = 5). .....	224
<b>Figure S4.5.</b> Variability of IS absolute signal depending on the preservative agent amended to surface water samples (concentration: 100 ng·L <sup>-1</sup> ). .....	224
<b>Figure S4.6.</b> Signal intensity variation depending on the injection volume (fully aqueous reconstitution medium).....	225
<b>Figure S4.7.</b> Off-line SPE-UHPLC-MS/MS chromatograms obtained with the optimized parameters (note: RT <sub>altrenogest</sub> = 7.63 min). .....	225
<b>Figure S4.8.</b> Map of tap water sampling sites (Province of Quebec, Canada) .....	226
<b>Figure 5.1.</b> Maps showing the location of surface water sampling sites as part of Survey (1) (top panel) and Survey (2) (bottom panel). River flow directions are indicated in blue arrows. In Survey (1), samples were collected by performing a series of transects along a 200-km reach of the St. Lawrence River (red diamond symbols) as part of the Lampsilis R/V monitoring, while additional samples were collected near the mouth of its major tributary rivers (yellow isosceles symbols). For readability, the 19 sampling sites located in the Sorel Islands area are not shown here but can be found in the zoomed-in map in SI (Figure S1-c).	

The green star symbol denotes the position of the Montreal WWTP effluent reject point (see also SI Figure S1-b). In Survey (2), 17 locations were monitored along the Mille Iles River: 15 from its source (RMI 1) to its mouth (RMI 15), with two additional samples near the mouth of L'Assomption River (AR and AR/RdP). The sampling of Survey (2) was repeated across 4 seasons. .... 234

**Figure 5.2.** Spatial distribution of summed EDC concentrations ( $\Sigma$ EDCs, ng/L) in the Rivière des Mille Iles, color-coded according to the surveyed season. .... 246

**Figure S1.** Zoomed-in maps showing the sampling locations of Survey (1) within the St. Lawrence River and select tributary rivers. .... 282

**Figure S2.** Extraction and clean-up recoveries for hormones depending on the used clean-up mixture (elution solvent used at the cleanup step: ACN/MeOH 7:3 v/v or ACN/MeOH 9:1 v/v). In light of the results, the second method was selected. .... 286

## Liste d'abréviations, sigles et acronymes

Les mots ou acronymes indiqués en italique correspondent aux termes anglais. Certains termes n'apparaissent qu'en anglais car ils ne sont pas usités dans la langue française.

%	pourcentage
$\alpha$	alpha
ACN	acétonitrile
ALTRE	altrénogest
ANDRO	androstènedione
AP	pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure</i> )
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> )
APPI	photoionisation à pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure photoionisation</i> )
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASE	extraction accélérée par solvant ( <i>accelerated solvent extraction</i> )
atm	atmosphère
$\beta$	bêta
BPA	bisphénol-A
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
°C	degré Celsius
CAS	<i>chemical abstract service</i>
CLLE	extraction liquide-liquide continue ( <i>continuous liquid-liquid extraction</i> )
COVID-19	Maladie à coronavirus ( <i>coronavirus disease 2019</i> )
DAD	détecteur à barette de diodes ( <i>diode array detector</i> )
DC	tension continue ( <i>direct current</i> )
DCM	dichlorométhane ( <i>dichloromethane</i> )
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DES	diéthylstilbestrol ( <i>diethylstilbestrol</i> )

DOC	<i>dissolved organic carbon</i>
DWTP	<i>drinking water treatment plant</i>
e <sup>-</sup>	électron
E1	estrone
a-E2	17 $\alpha$ -estradiol
$\beta$ -E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	estriol
EDC	perturbateur endocrinien ( <i>endocrine disrupting compound</i> )
EE2	17 $\alpha$ -éthynylestradiol
EI	ionisation électronique ( <i>electronic ionisation</i> )
EQUI	équiline
EQUIL	équilénine
ESI	ionisation par nébulisation électrostatique ( <i>electrospray ionisation</i> )
EU WFD	Directive-cadre sur l'eau de l'Union Européenne ( <i>European Union Water Framework Directive</i> )
FA	acide formique ( <i>formic acid</i> )
FDA	administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FS	mode balayage complet ( <i>full scan</i> )
FT-ICR	spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier ( <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i> )
GC	chromatographie gazeuse ( <i>gas chromatography</i> )
GF	fibres de verre ( <i>glass fiber</i> )
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
HESI	ionisation par nébulisation électrostatique chauffée ( <i>heated electrospray ionisation</i> )
HLB	Balance hydrophile-lipophile ( <i>hydrophilic-lipophilic balance</i> )
UHPLC	chromatographie liquide à ultra-haute performance ( <i>ultra-high performance liquid chromatography</i> )
IS	étalon interne ( <i>internal standard</i> )
K	Kelvin

K <sub>ow</sub>	coefficient de partage octanol/eau
kPa	kilopascal
L	litre
LC	chromatographie liquide ( <i>liquid chromatography</i> )
LDTD	désorption thermique à diode laser ( <i>laser diode thermal desorption</i> )
LEVO	lévonorgestrel
LIT	Trappe ionique linéaire ( <i>linear ion trap</i> )
LLE	extraction liquide-liquide ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
LOD	limite de détection ( <i>limit of detection</i> )
LOEC	concentrations minimales d'impacts observés ( <i>lowest observed effect concentration</i> )
LOQ	limite de quantification ( <i>limit of quantification</i> )
m/z	rapport masse sur charge
MAE	extraction assistée par micro-ondes ( <i>microwave assisted extraction</i> )
MCX	échange de mix-mode de cations ( <i>mix-mode cation exchange</i> )
MDL	limite de détection de la méthode ( <i>method detection limit</i> )
MeOH	méthanol
mg	milligramme
min	minute
MIP	polymère à empreinte moléculaire ( <i>molecularly imprinted polymer</i> )
mL	millilitre
mM	millimole
M	masse molaire
mol	mole
MPROG	médroxyprogestérone ( <i>medroxyprogesterone</i> )
MRM	suiti de réactions multiples ( <i>multiple reaction monitoring</i> )
MS	spectrométrie de masse ( <i>mass spectrometry</i> )
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem ( <i>tandem mass spectrometry</i> )
m/v	masse par volume ( <i>mass per volume</i> )
NaCl	chlorure de sodium ( <i>sodium chloride</i> )



ng	nanogramme
NH <sub>4</sub> F	fluorure d'ammonium ( <i>ammonium fluoride</i> )
NI	ionisation négative ( <i>negative ionization</i> )
NL	perte de neutre spécifique ( <i>constant neutral loss</i> )
nm	nanomètre
NOR	Noréthindrone ( <i>norethindrone</i> )
NSERC	<i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>
Omadine	2-mercaptopyridine-N-oxide sodium salt
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PBB	polybromobiphényles ( <i>polybrominated biphenyls</i> )
PCB	polychlorobiphényles ( <i>polychlorinated biphenyls</i> )
PFAS	composés perfluorés ( <i>perfluorinated compounds</i> )
PI	ionisation positive ( <i>positive ionization</i> )
PI	mode de précurseurs ( <i>precursor ion scan</i> )
PIS	mode d'ions fragments ( <i>product ion scan</i> )
pKa	constante de dissociation d'un acide
PLE	extraction par liquide pressurisé ( <i>pressurized liquid extraction</i> )
PNEC	concentration estimée sans effets ( <i>Predicted no effect concentration</i> )
POP	polluants organiques persistants
PPCP	produits pharmaceutiques et de soins personnels ( <i>pharmaceuticals and personal care products</i> )
PROG	progestérone ( <i>progesterone</i> )
Q	quadripôle
QIT	Trappe ionique quadripolaire ( <i>quadrupole ion trap</i> )
QqQ	triple quadripôle
R	constante des gaz parfait
R <sup>2</sup>	coefficient de détermination ( <i>coefficient of determination</i> )
RSD (CV)	coefficient de variation ( <i>relative standard deviation</i> )
RF	tension alternative ( <i>radio frequency</i> )
RP	phase inverse ( <i>reverse phase</i> )

SARS-CoV-2	syndrome respiratoire aigu sévère du coronavirus 2 ( <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> )
S/N	rapport signal sur bruit ( <i>signal to noise</i> )
SBSE	extraction par sorption sur barreau magnétique ( <i>stir bar sorptive extraction</i> )
SD	écart-type ( <i>standard deviation</i> )
s	seconde
SFC	chromatographie en phase supercritique ( <i>supercritical fluid chromatography</i> )
SIM	analyse des ions sélectionnés ( <i>selected ion monitoring</i> )
SPE	extraction sur phase solide ( <i>solid-phase extraction</i> )
SPM	matière particulaire en suspension ( <i>suspended particular matter</i> )
SPME	micro-extraction sur phase solide ( <i>solid-phase micro-extraction</i> )
SRM	suivi de réaction ciblée ( <i>selected reaction monitoring</i> )
$t$	temps
TESTO	testostérone ( <i>testosterone</i> )
$t_{1/2}$	temps de demi-vie
THF	tétrahydrofurane
TOF	analyseur à temps de vol ( <i>time of flight</i> )
U	amplitude de la tension continue
UAE	extraction assistée par ultrasons ( <i>ultrasound assisted extraction</i> )
$\mu\text{L}$	microlitre
US EPA	Agence de protection de l'environnement aux États-Unis ( <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
UV	ultraviolet
V	volt
VTG	vitellogénine
% v/v	pourcentage volume par volume ( <i>volume per volume</i> )
$\omega$	fréquence angulaire
WCX	échange de cations faibles ( <i>weak cation exchange</i> )
WWTP	<i>WasteWater Treatment Plant</i>
$\Phi$	tension appliquée

*À ma femme Kim Ly*

*À mes filles Eileen et Athénaïs*

## Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement d'un long périple tant géographique que personnel. Il n'est pas chose aisée que de remercier tous les acteurs de cette aventure tant il y a de personnes qui ont apporté leur pierre à l'édifice.

Je remercie les membres du jury composé des professeurs Pierre Chaurand, Patrick Hayes et Zhe Lu de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ces travaux de doctorat inclus dans le présent manuscrit.

Mes remerciements s'adressent bien entendu à celui sans qui bien des choses n'auraient pu se produire, le Professeur Sébastien Sauvé. Depuis le début de ce parcours vous avez su m'aiguiller, m'appuyer et m'aider à me perfectionner dans une branche de la chimie qui me passionnait et qui me passionne encore et toujours. Vous m'avez accompagné dans bien des étapes importantes de ma vie montréalaise et m'avez fait un très grand honneur en m'incluant dans ce magnifique projet de MOOC sur les contaminants émergents; merci infiniment!

Un merci tout spécial à ma co-directrice, la Professeure Michèle Prévost pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet durant toutes ces années et d'avoir contribué à l'élaboration et l'édition des articles de cette thèse.

Je tiens à remercier mes amis et collègues du laboratoire de chimie analytique environnementale du professeur Sébastien Sauvé, Juan Manuel Montiel-Leon, Marc-Antoine Vaudreuil, Hermann Kaboré et Jean-Christophe Picard pour toutes les discussions et brèves de comptoir qui m'ont aidé de près ou de loin mais qui, dans tous les cas furent bénéfiques. Un immense merci à Sung Vo Duy pour l'incroyable dévouement à nous faire avancer, nous améliorer et nous faire aller le plus loin possible; sans toi, la tâche aurait été bien plus difficile à réaliser, càm on! J'adresse mes remerciements à Gabriel Munoz pour tout l'appui, les conseils et les suggestions donnés et portés par l'excellence de tes connaissances. Tu es une personne remarquable et je suis plus qu'heureux de te compter dans notre entourage, de faire partie de la famille; Athénaïs remercie déjà son parrain d'être présent pour son papa.

Un grand merci à ma famille pour le soutien qu'elle m'a apporté. Merci à mon père Laurent Goeury et merci à ma mère Marynia Falk pour leur support et leurs encouragements.

Il m'est impossible d'omettre mes chers amis Pascal Patron, Simon Martin, Martin Laroche et Laurence Brillant-Poirier pour leur support depuis notre rencontre à l'ITHQ. La sommellerie nous a réuni et a donné naissance à de magnifiques amitiés qui m'ont fait grandir. Merci à mes collègues et amis du Collège de Bois de Boulogne, Rachid Kerboua, Soufiane Bechaouch, Isabelle Garneau, Véronique Leblanc-Boily et tous les autres membres du Département de chimie. Depuis que je vous ai rejoint il y a déjà trois ans, vous avez toujours été présents et à mon écoute.

Bien sûr, je ne peux oublier mes amis Arek Keuchguerian et Frédéric D'Anjou. Vous faites partie de ma vie depuis tant d'années, vous avez été présents pour chacune des étapes de mon parcours professionnel et personnel et représentez à vous deux un soutien indéfectible. Merci d'être dans nos vies; vous comptez énormément pour moi, pour Kim Ly et bien sûr pour Eileen.

Enfin, aucun remerciement ne pourrait être complet sans parler de celles qui partagent ma vie au quotidien. Tout d'abord merci à ma femme, Kim Ly Nguyen, pour le soutien inconditionnel et indéfectible dont elle fait preuve en toute circonstance. Cela n'a pas été facile, loin de là, mais nous y sommes arrivés et après tous ces efforts nous pouvons enfin dire : « ça y est, c'est vrai et on l'a fait ». Tu as toujours dit que tout arrive pour une raison et bien tu avais raison, tous ces efforts et ce dur labeur ont été faits pour qu'aujourd'hui nous soyons heureux et épanouis dans ce que nous faisons. Si j'en suis là aujourd'hui c'est en grande partie grâce à toi et je t'en serai toujours reconnaissant. Tu m'as toujours poussé à aller jusqu'au bout de mes projets, à faire preuve de combativité, de ténacité et de courage dans les moments de doute et d'angoisse. Merci de m'avoir amené à me surpasser et à tenir coûte que coûte jusque dans mes derniers retranchements. Il est des événements de la vie qui ne peuvent nous rendre que plus forts et plus déterminés que jamais tel que la naissance d'un enfant. La naissance de notre petite Eileen puis de notre petite Athénaïs ont été des jours merveilleux et c'est pour cela que je tiens à remercier ces petits êtres qui, sans le savoir, rendent une personne plus heureuse qu'elle ne l'aurait espéré. Mes filles, je vous remercie pour tout ce que vous m'apportez chaque jour qui passe.

# Chapitre 1 – Introduction générale et mise en contexte

## 1.1 Contaminants « émergents » ou « d'intérêt émergent » ?

C'est en 1962 que la notion de contamination environnementale a été rendue accessible au grand public grâce à Rachel Carson et son ouvrage intitulé *Le Printemps Silencieux* (« Silent Spring ») dans lequel elle lançait un cri d'alarme quant aux effets d'un pesticide alors largement répandu et utilisé, le DDT. Ce dernier présentait notamment un impact sur l'épaisseur de la coquille d'œuf de certains rapaces engendrant une baisse inquiétante des populations [1]. C'est à partir de ce moment que le mouvement dit environnementaliste a connu un certain essor. Il faut dire que la notion de contamination est assez récente car elle suppose un niveau de connaissance et de compréhension global de notre environnement. Un contaminant émerge lorsque son usage se répand et s'intensifie, le rendant ubiquitaire. Par ailleurs, depuis l'Antiquité, il faut rappeler que certains éléments ont été utilisés à grande échelle par les Grecs et les romains notamment et il est possible de corrélérer cette utilisation avec leur présence dans l'environnement comme le plomb dans les carottes glaciaires pour ne citer que cet exemple. Un contaminant émergent ne suscite pas nécessairement un intérêt particulier au moment où il devient émergent. Pour qu'un contaminant soit qualifié « d'intérêt émergent », une condition *sine qua non* est nécessaire : un intérêt de la part de la communauté scientifique. C'est ainsi que certains composés font l'objet de recherches importantes durant une période donnée et qu'il faut attendre un élément déclencheur pour voir une résurgence de l'intérêt qu'on leur porte. Certains composés toxiques comme les toxines de cyanobactéries sont naturels et ne sont donc par essence pas émergents. Les concentrations retrouvées dans l'environnement et leur ubiquité le sont. Si l'on reprend l'exemple du plomb, on peut aisément observer les variations historiques des concentrations dans l'atmosphère grâce aux carottes glaciaires prélevées au Groenland. Les résultats montrent que ce contaminant est devenu émergent dès l'époque gréco-romaine car il était employé dans de nombreux domaines. Après une période de stagnation durant le Moyen Âge, la Révolution industrielle a provoqué une progression exponentielle des niveaux de plomb; son usage dans l'essence jusqu'aux années 1970-1980 l'a même rendu ubiquitaire à l'échelle du globe. Cependant, les niveaux tendent à diminuer depuis l'arrêt de son

utilisation massive aussi bien dans les carburants que dans la peinture ou autres usages domestiques. Il est donc nécessaire de comprendre ces deux notions bien distinctes que sont la notion de contaminant émergent et celle de contaminant d'intérêt émergent.

### **1.1.1 Origine, usages et intérêt**

Quoiqu'un certain nombre de contaminants soient d'origine naturelle, la plupart des contaminants environnementaux problématiques à l'heure actuelle sont d'origine anthropique ou bien ont une ubiquité liée à l'activité anthropique. Si l'on prend par exemple les pesticides organiques de synthèse, ces molécules ont été largement épandues sur les cultures à l'échelle du globe depuis les années 1940 dans le but premier d'accroître la production [2,3].

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides organochlorés sont devenus les pesticides les plus utilisés [4]. Cette famille de contaminants se subdivise en plusieurs catégories comme les herbicides (atrazine, métolachlor) utilisés sur les plantations de soja ou de maïs, les fongicides (tébuconazole, carbendazim) pour lutter contre les champignons et les moisissures et les insecticides (néonicotinoïdes, organophosphates, etc.) utilisés pour tuer ou repousser les insectes [5]. Autre groupe de composés dont l'utilisation massive implique des impacts environnementaux : les produits pharmaceutiques et de soin personnel. Leurs usages s'étendent des traitements du cancer (chimiothérapie) aux traitements des troubles mentaux et dépression (antidépresseurs, régulateurs d'humeur) en passant par la composition des pilules contraceptives (hormones), les thérapies de remplacement hormonal (hormones), les traitements des inflammations bénignes (ibuprofène, paracétamol) et le traitement des maladies d'origine bactérienne (antibiotiques) pour ne citer que ceux-ci. Les produits de soin corporels comme les cosmétiques, les désinfectants, les parfums et les crèmes solaires peuvent également être une source importante de contaminants émergents dans l'environnement [6,7]. Les composés perfluorés représentent un groupe de molécules massivement employées depuis des décennies et ont été responsables de nombreux effets délétères pour l'environnement et la santé humaine. Ils interviennent dans la fabrication d'enduits protecteurs (papiers et cartons d'emballage alimentaires par exemple). Dans l'industrie textile, ils sont utilisés comme imperméabilisants et employés dans la fabrication

de tissus techniques. Leurs propriétés tensioactives en font de bons agents pour les mousses extinctrices et divers détergents industriels. Ces composés exclusivement d'origine anthropique ont attiré l'attention compte tenu de leur ubiquité et de leur toxicité [8–10]. Les agents ignifuges bromés (*brominated flame retardants, BFR*) dont les représentants historiques sont les polybromodiphényléthers (PBDE) sont utilisés à partir des années 1970 comme additifs dans les plastiques, mousses, résines et adhésifs pour ralentir la propagation du feu. Ils sont de ce fait, devenus des contaminants émergents dont l'ubiquité n'est plus à démontrer [11,12]. Ces composés sont d'ores et déjà en voie d'être remplacés par d'autres appelés NBFRs (*novel brominated flame retardants*) ce qui laisse présager de nouveaux enjeux environnementaux [13,14].

La plupart des travaux menés depuis plusieurs dizaines d'années sur la contamination environnementale ont porté leur attention sur des molécules qui rentrent pour l'immense majorité dans la catégorie des polluants organiques persistants (POPs). Il est aujourd'hui admis que ces derniers, essentiellement d'origine anthropique, peuvent parcourir de très longues distances dans l'atmosphère, les cours d'eau ou autres vecteurs et qu'ils sont bien souvent bioaccumulables [15,16]. Leurs impacts ne sont bien compris que *a posteriori* : baisse de natalité, hausse des incidences de cancers, perturbation endocrinienne voire disparition des populations exposées telles que les oiseaux, les poissons et les mammifères. L'intérêt que leur porte la communauté scientifique n'est pas nouvelle puisqu'elle a commencé dès les années 1970 et découle directement de l'impulsion créée par la publication du livre de Rachel Carson mais le qualificatif « d'émergent » est relativement récent et ne fait pas toujours l'unanimité [17,18].

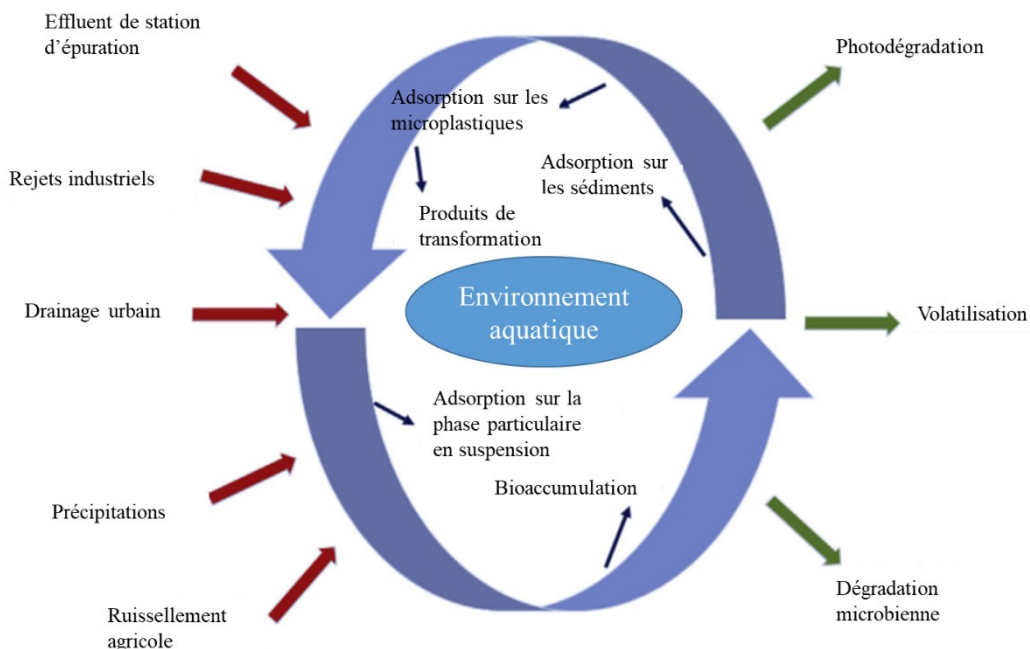
Les techniques analytiques ont évolué et permettent désormais d'atteindre des limites de détection bien plus basses que celles qui étaient atteignables dans le passé. Le gain en sensibilité est d'ailleurs estimé entre 1000 et 100 000 au cours des 50 dernières années [19]. Il est possible de se rendre plus aisément compte de l'ampleur de la contamination environnementale due à tous ces usages de composés organiques persistants et pour certains volatils. Leur émergence provient non seulement de leur mise sur le marché mais également de notre capacité à les détecter dans l'environnement. Il est donc nécessaire de mettre en place des dispositifs et des techniques analytiques performants, efficaces et sensibles afin de



pouvoir comprendre de manière plus exhaustive la présence, le comportement et le devenir de ces molécules qui peuvent non seulement perdurer mais aussi se transformer en sous-produits parfois plus nocifs que les molécules dont elles sont issues. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour vocation essentielle de mettre en place des méthodes analytiques permettant l'analyse ultra-trace de perturbateurs endocriniens sélectionnés (hormones et bisphénol A) dans l'environnement.

### **1.1.2 Contamination environnementale et risques associés**

Les contaminants émergents se retrouvent dans l'environnement selon plusieurs voies de distribution. Par ailleurs, ce sont leurs propriétés physicochimiques (volatilité, polarité, solubilité dans l'eau) qui déterminent en partie leur devenir environnemental. Les contaminants émergents sont majoritairement rejetés dans l'environnement via les stations d'épuration de par leur faible capacité à éliminer les micropolluants organiques, les rejets industriels, le drainage urbain (toits, pavés, routes et trottoirs). Les précipitations et le transport atmosphérique en augmentent la mobilité [20–23]. La **figure 1-1** rend compte du devenir environnemental des contaminants émergents d'origine industrielle ou domestique. L'occurrence de ces substances suscite de plus en plus d'intérêt de la part de la communauté scientifique et se vérifie année après année [24].



**Figure 1.1** Sources, dégradation, devenir et transport des contaminants émergents dans l'environnement d'après Wilkinson et al [25].

Il existe une quantité incommensurable de produits chimiques disponibles sur le marché à travers le monde. Sur ces millions de molécules, 30 000 sont utilisées de manière significative ( $> 1$  tonne/an). Une étude portant sur 3193 produits pharmaceutiques dont font partie les hormones a révélé que 275 d'entre eux ont été détectés dans l'environnement [26,27]. Avec plusieurs dizaines de milliers de ces composés disponibles sur le marché ayant pour vocation de prévenir ou de traiter les maladies humaines ou animales, il est aisé de constater que leur présence n'est pas à remettre en question et que leurs impacts n'en sont que décuplés [28,29]. Bien des polluants organiques persistants (POPs) ont fait l'objet de réglementations internationales en matière d'environnement. Par exemple, la Convention de Stockholm de 2001 a interdit ou restreint l'utilisation et le rejet de 28 groupes de POP halogénés [30]. Quoique certains aient été bannis depuis plusieurs décennies, les molécules initiales et leurs sous-produits de dégradation peuvent perdurer dans les écosystèmes aquatiques et terrestres et ainsi présenter des effets à long terme qui sont encore relativement méconnus. Il s'agit là d'une préoccupation majeure que les scientifiques ont d'ores et déjà commencé à traiter et sur laquelle ils devront continuer à se pencher [31].

L'activité humaine est responsable de nombreux rejets de molécules organiques et inorganiques dans l'environnement. Avec l'utilisation massive de certains métaux comme le plomb ou de certaines substances comme les produits pharmaceutiques, les composés perfluorés et les pesticides pour ne citer que ceux-ci, les sociétés développées sont parvenues à les rendre ubiquitaires à l'échelle de la planète. Ces polluants peuvent ainsi se retrouver tant dans les environnements aquatiques, terrestres qu'atmosphériques; certains se propagent à l'ensemble des niveaux de la chaîne trophique. Dans des matrices dites propres, telles que l'eau potable ou l'eau embouteillée, les concentrations de contaminants émergents organiques sont en général très faibles ( $< 1 \text{ ng L}^{-1}$ ) voire impossible à détecter compte tenu des limites de détection des méthodes [32–34]. Dans l'eau des rivières, lacs et réservoirs, les concentrations sont plus élevées bien que de grandes variations soient observables dépendamment de la classe de molécules, le lieu, la saison, l'activité humaine et d'autres variables. Ces niveaux s'étendent du sub  $\text{ng L}^{-1}$  à plusieurs centaines de  $\text{ng L}^{-1}$  avec des concentrations moyennes situées entre 0,10 et  $10 \text{ ng L}^{-1}$  [7,35–38]. Beaucoup de substances susceptibles d'être des contaminants émergents sont utilisées par les humains dans leur domicile ou leur lieu de travail. Les produits pharmaceutiques ou les produits de soins corporels par exemple sont employés dans une vaste gamme d'applications et sont souvent excrétés en tout ou en partie dans les urines. Ces dernières sont transportées dans le réseau d'eau usée et traitées dans les stations d'épurations prévues à cet effet. Cependant, les usines de traitement ne sont pas toutes pourvues du même type de traitement de l'eau. Certaines effectuent la chloration ou l'ozonation de l'eau dans le meilleur des cas. D'autres ne font qu'un traitement physique et biologique basé sur la filtration, la floculation et la décantation des matières en suspension. Dans bien des pays qui ne sont pas en mesure de se pourvoir en stations de traitement, les eaux usées sont directement rejetées dans l'environnement (rivières, fleuves et océans). Dans une partie des cas, les molécules organiques ne sont de toutes façons que peu retenues ou insuffisamment dégradées lors des traitements et sont de ce fait, déversées dans les écosystèmes [22,39–42]. Elles ne sont pas toutes persistantes mais le fait d'être utilisées et par conséquent rejetées en continu leur confère une pseudo-persistance responsable d'une forte perturbation des écosystèmes aquatiques mais également des populations humaines avoisinantes.

Il est quelque peu difficile de faire une généralisation quant à la toxicité des contaminants émergents pour l'environnement et la santé humaine mais il est tout de même pertinent d'en brosser le portrait global. Leurs effets délétères sont nombreux tant sur les espèces aquatiques, les vertébrés et les invertébrés, les mammifères et les bactéries que sur la faune dans sa globalité. Bien que les concentrations retrouvées dans l'eau de surface soient situées à de faibles niveaux ( $\approx 1 \text{ ng L}^{-1}$ ), celles-ci sont assez élevées pour impacter de façon durable les écosystèmes [43,44]. Nous y reviendrons plus en détail par la suite dans la section prévue à cet effet. Cependant, le manque de recul sur l'exposition chronique à certains composés, le manque de données quant à la possible synergie lors d'une exposition à un mélange de composés et l'impossibilité d'analyser la totalité des espèces présentes sont autant de facteurs limitant notre compréhension de la toxicité des substances impliquées [45,46]. Il est également difficile d'apprécier avec exactitude les impacts des contaminants environnementaux sur les humains.

## **1.2 Les perturbateurs endocriniens (EDCs)**

### **1.2.1 Notions importantes et fonctionnement**

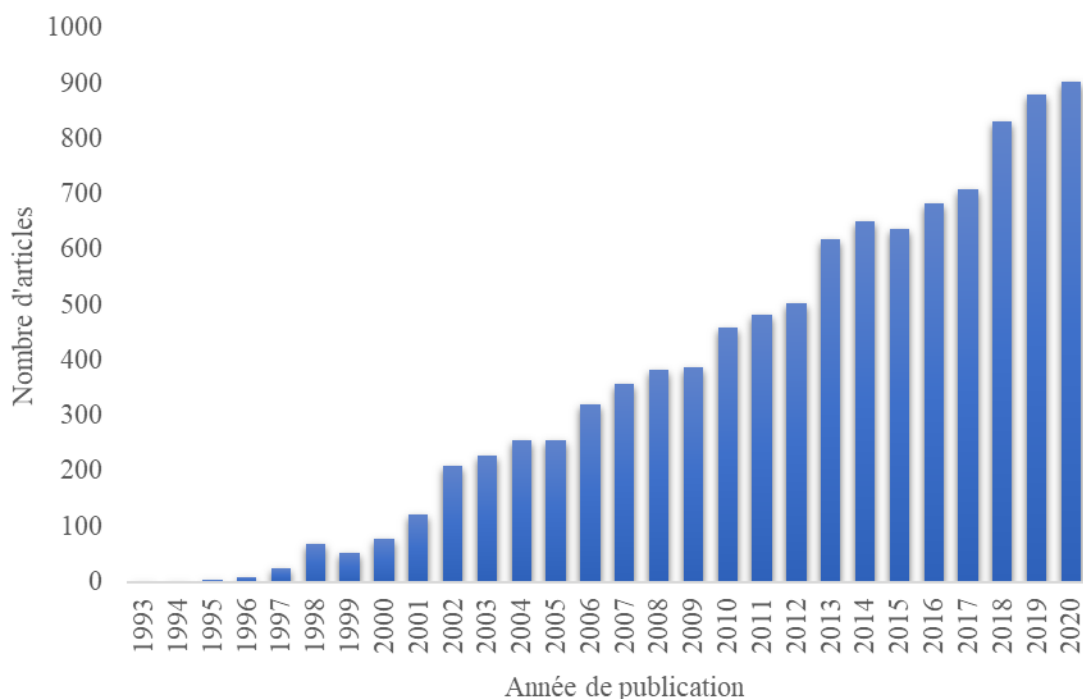
Les perturbateurs endocriniens (*Endocrine Disrupting Compounds, EDC*) ont été définis par l'US EPA comme étant des substances qui peuvent interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la ligation ou encore l'élimination d'une hormone naturelle dans l'organisme responsable de la maintenance de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ou encore du comportement. Dans un cadre plus général, les perturbateurs endocriniens sont des substances ou des mélanges de substances capables de perturber le bon fonctionnement du système endocrinien ou du système hormonal [47].

#### **1.2.1.1 D'où viennent-ils ?**

Les perturbateurs endocriniens peuvent être subdivisés en deux catégories distinctes : les EDCs qui sont produits de façon naturelle que ce soit au sein des végétaux (p. ex., phytoestrogènes, zéaralénone, isoflavones) ou chez les êtres vivants (p. ex., estradiol et

progestérone) et ceux qui sont produits de façon synthétique. Dans cette dernière catégorie, ressortent les exemples suivants : les biphényles polychlorés (PCBs), les biphényles polybromés (PBBs), les dioxines, les plastiques, les plastifiants, les pesticides, les fongicides et certains produits pharmaceutiques [48]. Les perturbateurs endocriniens peuvent également être classés selon leurs origines. En effet, on dénombre quatre catégories que sont les hormones naturelles et synthétiques (phytoestrogènes, pilules contraceptives, etc.), les médicaments ayant des effets indésirables sur le système hormonal (naproxen, etc.), les produits industriels et à usage domestique (p. ex., alkylphénols, retardateurs de flamme, plastifiants, phtalates, PCBs) et enfin, les sous-produits industriels ou domestiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs ou PAHs), dioxines, etc.) [49].

La plupart des EDCs proviennent des produits utilisés pour lutter contre les indésirables tels les pesticides, les fongicides et rodenticides, les produits synthétiques utilisés dans l'industrie du plastique (bisphénols ou phtalates), une variété de matériaux de construction, matériaux d'isolation (HAPs, PCBs) ou encore de l'industrie pharmaceutique (résidus de médicaments, hormones synthétiques). S'agissant des perturbateurs endocriniens, l'attention est essentiellement mise sur les effets d'une exposition à long terme à faibles doses puisque c'est dans cette zone que se situent la problématique et les enjeux majeurs [50]. C'est en juillet 1991, lors de la conférence organisée par Theo Colborn et ses collaborateurs au *Wingspread Conference Center* de Racine au Wisconsin que la recherche sur les « perturbateurs endocriniens » a réellement débuté [51,52]. Avec près de 10 000 articles disponibles lorsque le terme « perturbateur endocrinien » est inscrit dans un moteur de recherche (ISI Web of Science), il apparaît clairement que la recherche sur ces substances s'est intensifiée au cours des trente dernières années. La **figure 1-2**, illustre l'évolution du nombre de publications reliées à ce sujet depuis la fameuse publication de Colborn, pionnière en la matière.



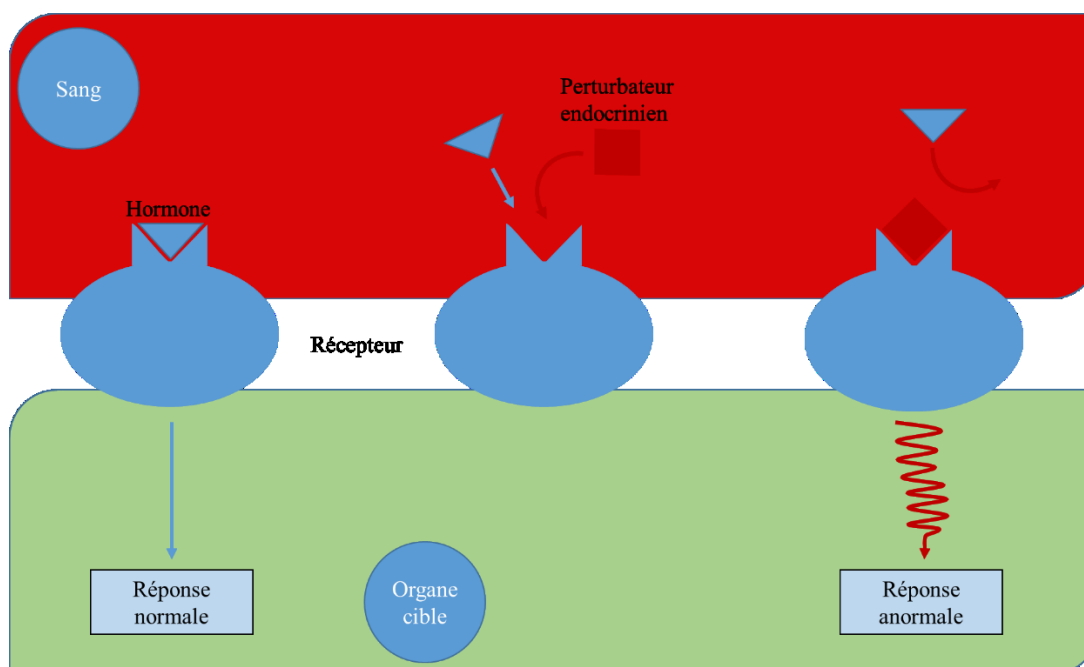
**Figure 1.2** Nombre de publications annuelles faisant référence aux perturbateurs endocriniens lorsque les mots-clefs « perturbateur endocrinien » sont inscrits dans le moteur de recherche ISI Web of Science

La publication de Colborn en 1992-1993 n'est toutefois pas le point de départ mais seulement la mise en avant de la recherche sur les perturbateurs endocriniens. En effet, ce dernier a rassemblé une myriade d'informations disséminées à travers la recherche scientifique afin d'y donner plus de visibilité et de clarté. Les premières recherches sur le sujet apparaissent dès les années 1940 faisant suite au début de l'utilisation massive de certaines molécules telles que l'éthinylestradiol, le mestranol ou la norethynodrel, employées en tant que contraceptifs et en traitement de certaines maladies. En ce qui concerne l'environnement, la présence d'hormones naturelles avait déjà été mentionnée dans les effluents d'eaux usées aux États-Unis dès 1965 tandis que les hormones synthétiques furent détectées dès 1970 [53]. À la lumière des éléments susmentionnés, il apparaît que les perturbateurs endocriniens représentent une part de plus en plus importante de la recherche scientifique. Par conséquent, il est primordial d'en maîtriser plusieurs points tels que leurs modes d'action.

### 1.2.1.2 Quels sont leurs modes d'action dans les organismes ?

Que ce soit chez l'humain ou chez les autres organismes vivants, les EDCs peuvent affecter les récepteurs hormonaux de différentes façons. En effet, les récepteurs hormonaux ou homéostatiques peuvent être sensibles à des molécules structurellement analogues à celles assurant le bon fonctionnement d'un organisme en termes de communication et de réponse adéquate à son environnement. Il est possible de classer les EDCs selon leur mode d'action :

- i) Ils peuvent imiter partiellement ou en totalité les hormones naturelles présentes dans le corps comme les androgènes, les œstrogènes et l'hormone thyroïdienne; ii) Certains EDCs agissent comme des antagonistes, c'est-à-dire qu'ils agissent à l'intérieur des cellules en se liant avec le récepteur des hormones endogènes et induisent une défaillance du signal dans le récepteur hormonal ce qui, *a posteriori*, implique une défaillance au niveau de l'organisme; iii) Ils peuvent également interférer avec les hormones naturelles pour atteindre les récepteurs ce qui a pour conséquence une altération du métabolisme naturel et par extension une modification des concentrations d'hormones naturelles libérées [54].



**Figure 1.3** Illustration de la perturbation endocrinienne sur un organe cible. Le perturbateur endocrinien bloque complètement ou en partie le site de reconnaissance du récepteur modifiant ainsi sa fonction.

### 1.2.1.3 Des effets toxicologiques difficiles à appréhender

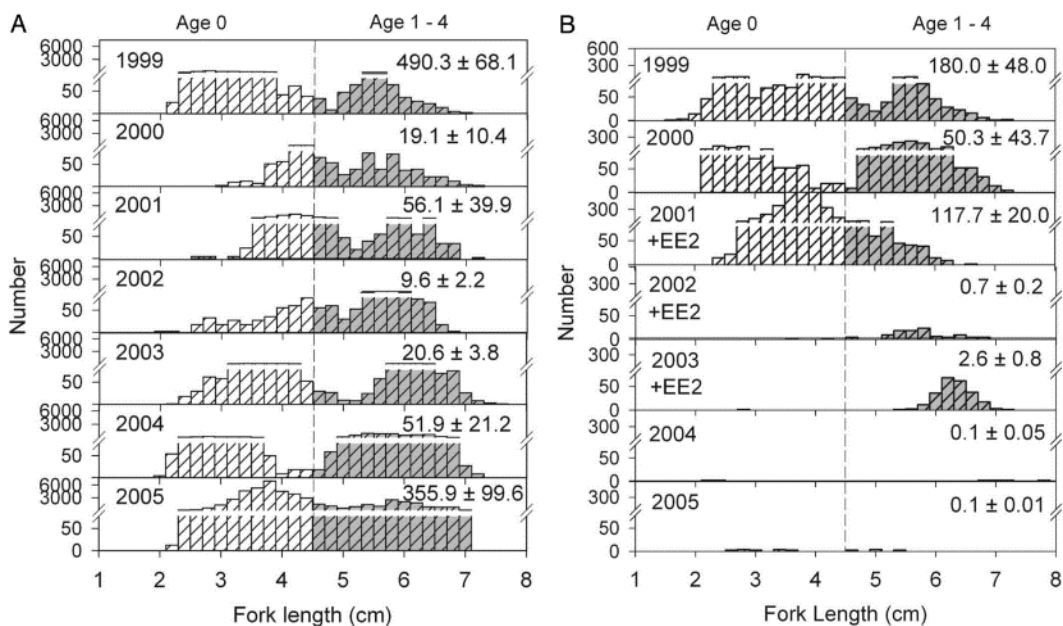
Dans notre quotidien, nous sommes exposés à une panoplie de perturbateurs endocriniens. Ces derniers sont présents dans l'air que nous respirons, dans l'eau que nous buvons et même dans le sol dans lequel sont cultivés les aliments que nous consommons. Les perturbateurs endocriniens sont reconnus pour leur capacité à altérer le système hormonal et homéostatique des êtres vivants. Le système hormonal et homéostatique est d'une importance capitale dans la mesure où ils sont impliqués dans plusieurs processus tels que le métabolisme, le développement sexuel, la production et l'utilisation de l'insuline, la croissance, la réponse au stress, le ratio mâle/femelle, la reproduction et surtout le développement fœtal. Ceci est valable pour l'ensemble du règne animal, y compris les humains.

Quelques études peuvent être évoquées à titre d'exemple de ce qu'un perturbateur endocrinien est susceptible de provoquer comme effets sur un organisme de façon prénatale ou postnatale. La première consistait en une exposition prénatale à faible dose (1 mg/L dans l'eau potable) au bisphénol A (BPA) sur le rat. Les effets mesurés étaient nombreux : puberté précoce, poids corporel plus élevé, altération des glandes mammaires, altération des voies génitales féminines et modification structurale et fonctionnelle de la prostate chez les rats mâles [55]. Il est ressorti d'une autre étude d'exposition au BPA réalisée de façon postnatale chez la souris qu'on a observé une diminution de la fertilité et de la fécondité, une masculinisation des comportements et des structures cérébrales chez les souris femelles et enfin, une diminution de la fertilité chez les souris mâles [56].

Une autre étude retentissante a démontré les effets d'une exposition à long terme (7 années) d'une espèce de poisson, le méné à tête de boule (*Pimephales promelas*), à l'éthinylestradiol, une hormone synthétique qui rentre dans la composition des pilules contraceptives. Pour ce faire, l'équipe de recherche a utilisé deux lacs de la zone des lacs expérimentaux (*Experimental Lakes Area*, Ontario, Canada) : l'un faisant office de lac témoin et l'autre dans lequel une quantité d'éthinylestradiol y a été ajoutée pour atteindre une concentration d'environ 5 ng L<sup>-1</sup> [57]. L'ajout a été répété trois années durant dans ce dernier lac et la population de poisson s'est effondrée dès la deuxième année. Les résultats de cette expérience démontrent qu'un apport faible mais continu d'œstrogènes synthétiques peut



diminuer la capacité de reproduction et ainsi menacer la pérennité de l'espèce. Il a été démontré qu'une exposition chronique du méné tête-de-boule à une faible concentration d'un puissant œstrogène synthétique a conduit à la féminisation des mâles par production d'ARNm et de vitellogénine (VTG), une protéine précurseur du jaune d'œuf. La production continue de VTG chez les femelles au-delà de la saison de reproduction normale, induit des impacts sur le développement gonadique, comme en témoigne l'intersexualité chez les mâles et une altération de l'ovogenèse chez les femelles et une quasi-extinction de cette espèce du lac (Figure 1-4.).



**Figure 1.4** Comparaison entre le lac témoin (A) et le lac contaminé (B) avec 5-6 ng L<sup>-1</sup> d'éthinylestradiol. Mesure effectuée au niveau de la fourche sur une durée de 7 ans. D'après Kidd *et al* [57].

Ces deux exemples illustrent sans commune mesure les impacts réels des perturbateurs endocriniens sur les espèces aquatiques ou terrestres présentes dans l'environnement. Les études sont nombreuses et il serait difficile de les détailler de façon exhaustive. C'est pourquoi le tableau suivant (**Tableau 1-1.**) résume un panel d'effets attribués aux EDCs basés sur plusieurs études d'êtres vivants présents dans l'environnement. Masculinisation, malformation au niveau de l'appareil reproducteur, hyperactivité,

augmentation de l'agressivité, abandon des sites de nidation, consommation de nourriture, motivation, sont autant d'effets observés sur des organismes exposés à des concentrations suffisamment élevées de Bisphénol A, de BPCs, d'alkylphénols et d'autres perturbateurs endocriniens notoires.

**Tableau 1-1.** Principaux effets observés des EDCs sur les êtres vivants présents dans l'environnement.

Espèce	Paramètre comportemental	Altération	EDCs incriminés	Source
Poissons				
Gambusie, <i>Gambusia affinis holbrooki</i>	Comportement reproducteur  Dominance	Masculinisation des femelles Précocité et agressivité chez les mâles  Accrue chez les mâles	effluents	[58]
Oiseaux				
Aigle, <i>Haliaeetus leucocephalus</i>	Nidation Parade Comportement reproducteur	Inhabituels	DDT	[1,59]
Pélican brun, <i>Pelecanus occidentalis</i>	Comportement reproducteur	Aberrant	Hydrocarbures chlorés	[60]

Faucon Cooper, <i>Accipiter cooperi</i>	Comportement	Perturbé	Métabolites du DDT	[60]
Hirondelle bicoloré, <i>Tachycineta bicolor</i>	Construction du nid Comportement parental	Qualité de construction faible Abandon des œufs	BPCs	[61,62]

#### Invertébrés

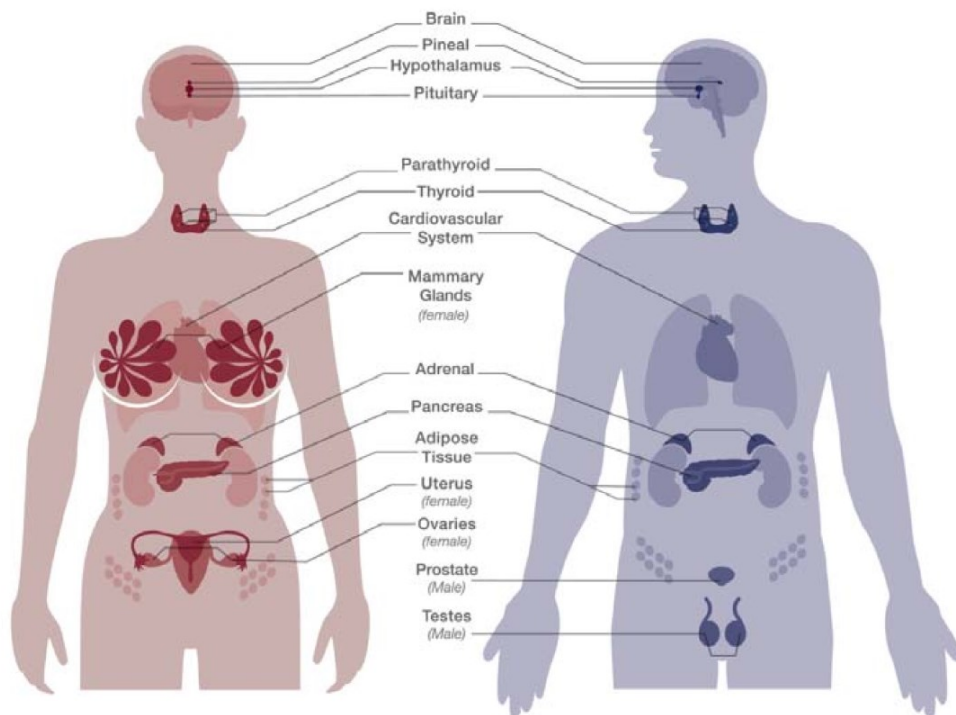
Escargots, <i>Marisa cornuarietis</i>	Comportement sexuel et reproducteur	Masculinisation Formation d'organes sexuels féminins Malformation des oviductes	Bisphénol A Octylphénol	[63,64]
--	-------------------------------------	---	----------------------------	---------

#### Mammifères

Rats norvégien, <i>Rattus norvegicus</i>	Réaction aux chocs, à la réduction du nombre de récompense et à un nouvel environnement	Hyperactivité	BPCs, DDT, mercure, dioxine	[65,66]
	Consommation de nourriture	Diminuée	Nonylphénol	[67]
	Motivation	Diminuée (femelles) Diminuée (mâles)	Carbaryl	[68]
	Ingestion de liquide			

Activité locomotrice	Puberté	Retardée (mâles)	Méthoxychlor	[69,70]
----------------------	---------	------------------	--------------	---------

Bien que la plupart de ces effets affectent d'ores et déjà l'environnement à large échelle, les effets sur les humains sont également étudiés [71]. En effet, même s'il est difficile d'atteindre le recul nécessaire ou d'obtenir la durée d'exposition suffisante, les rapports scientifiques laissent entrevoir la toxicité de bon nombre de perturbateurs endocriniens passés ou présents. Les perturbateurs endocriniens peuvent pénétrer dans le corps humain par diverses voies, par simple consommation orale de nourriture et d'eau ou en utilisant une voie intraveineuse plus compliquée notamment dans le cadre des traitements contre le cancer. Ils affectent le système endocrinien (**Figure 1-5.**) et les organes qui s'y trouvent.



**Figure 1.5** Composition du système endocrinien chez la femme (à gauche) et chez l'homme (à droite) d'après Gore *et al.* [72]

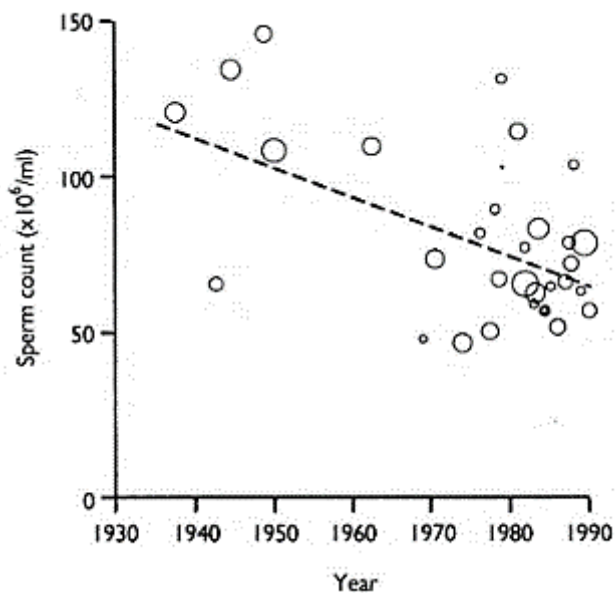
Les différentes études ont démontré que les adultes sont exposés aux EDC principalement par l'ingestion d'eau potable contaminée, de viande, de produits laitiers gras (lipophilie des EDCs non négligeable) mais aussi par inhalation d'air pollué. En ce qui concerne les nourrissons, les sources de contamination classiques sont l'allaitement, le contact avec les produits pour bébés mais également l'inhalation de poussières intérieures et d'air pollué. La consommation orale de nourriture ou d'eau est la première source d'exposition aux EDCs. En effet, les aliments ou l'eau contaminés sont directement ingérés et s'il advient que ces derniers soient contaminés, les EDCs peuvent pénétrer dans le corps humain de la même façon que les aliments.

Les BPCs, les dioxines, les composés perfluorés, les pesticides ou encore les phtalates sont de bons exemples de molécules pouvant être incorporées de cette façon. La voie par absorption dermale concerne notamment les pesticides (p. ex., lors d'une exposition professionnelle), les produits de soins corporels couramment appliqués sur la peau ou encore les retardateurs de flamme et autres composés industriels fréquemment utilisés dans l'ameublement domestique et autres équipements (p. ex., sièges auto pour enfant). Une autre voie d'exposition et non des moindres : le transfert à travers le placenta ou bien via le lait maternel. En effet, l'exposition aux EDCs peut intervenir de façon prénatale de la mère à l'enfant [72]. C'est d'ailleurs ce mode de transfert qui est à l'origine d'un des plus grands scandales du XX<sup>ème</sup> siècle. Le diéthylstilbestrol (DES) était administré aux femmes enceintes entre les années 1940 et 1970 dans le but de prévenir les fausses-couches ainsi que plusieurs complications possibles liées à la grossesse. L'effet inattendu fut qu'un nombre important de filles développèrent une forme rare de cancer vaginal à la puberté. Ceci fut directement relié au DES et ce dernier fut retiré du marché par la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1971 [47].

De multiples perturbations du système hormonal sont imputées aux EDCs. Il n'est pas toujours aisé d'établir un lien de cause à effet mais le nombre d'études et leurs corrélations tendent à démontrer les impacts toxicologiques de ces derniers. Les parabènes ont été pour leur part incriminés dans le développement du cancer du sein chez l'humain et le triclosan à quant à lui été considéré comme étant responsable de l'altération de l'hormone thyroïdienne et impliqué dans le même type de cancer [73,74]. La liste pourrait être bien plus

longue mais les impacts les plus pertinents et qui illustrent le mieux la perturbation endocrinienne (concentrations de l'ordre du ng/g de tissu) chez l'humain sont ceux de la puberté précoce, des troubles du système reproducteur, des perturbations thyroïdiennes ainsi que la baisse de la fertilité chez l'homme depuis plusieurs décennies. En effet, plusieurs études ont démontré que durant le siècle dernier, l'âge des premières menstruations est passé de 16-17 ans à moins de 13 ans. Cette diminution de l'âge peut être reliée à la prévalence de plusieurs autres troubles tels que la résistance à l'insuline ou les cancers du sein ou de l'appareil reproducteur. Des études ont également démontré que l'insuffisance ovarienne primaire (*primary ovarian failure, POF*) était étroitement liée à une exposition aux EDCs et qu'elle touche à ce jour près de 1% des femmes de moins de 40 ans. De plus, la capacité des perturbateurs endocriniens à interférer dans la régulation hormonale du cycle menstruel provoque des irrégularités dans ce dernier. L'impact indirect serait donc une baisse de la fécondité par l'apparition de cycles menstruels plus longs qu'à l'ordinaire. Enfin, chez la femme, un autre problème est associé à l'exposition aux EDCs, le syndrome des ovaires polykystiques (*polycystic ovary syndrome, PCOS*). Il s'agit d'un syndrome endocrinien répandu chez la femme qui s'exprime par des phénomènes d'anovulation, d'hyperandrogénie et d'une association à une prévalence plus élevée de l'obésité, de la résistance à l'insuline et aux anomalies métaboliques [75–77].

Si les femmes sont affectées par les EDCs, les hommes ne sont pas en reste pour autant. Des études ont montré que les organes sexuels masculins pouvaient aussi souffrir de dysfonctionnements tels que les anomalies du sperme, les hypospadias ou encore de testicules ectopiques [78–80]. De telles anomalies peuvent être causées notamment lors d'une exposition aux perturbateurs endocriniens lors de la gestation (exposition du fœtus). Depuis de nombreuses années la recherche a également porté sur le déclin de la qualité du sperme. Des études remontant jusqu'aux années 1930 indiquent une baisse de la qualité du sperme, du nombre de spermatozoïdes normaux ainsi que du volume de sperme dans plusieurs pays [81,82]. Une méta analyse réalisée par Carlsen et al. en 1992 a également montré que la quantité de spermatozoïdes par millilitre avait décru de plus de 40% au cours de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle [83]. Une autre étude réalisée en Grèce entre 1977 et 1993 par Adamopoulos et al. et menée sur un échantillon de 23 850 participants, est arrivée à la même conclusion : une baisse du volume et du nombre de spermatozoïdes [84].



**Figure 1.6** Évolution de la densité moyenne de sperme d’après un ensemble de 61 publications parues entre 1938 et 1990. Le diamètre du cercle est proportionnel à la taille de l’échantillon [83].

Bien que ces études montrent une décroissance certaine du nombre de spermatozoïdes, d’autres tendent à démontrer le contraire. La méthodologie des études plus anciennes, la saisonnalité de la concentration du sperme, les nombreuses variations en terme d’environnement, de niveau de vie, de caractéristiques socio-économiques sont autant de paramètres qui rendent la tâche des scientifiques ardue [85–88]. Cette problématique reste à ce jour sujette à controverse et des investigations supplémentaires à long terme et à grande échelle seront nécessaires pour comprendre avec certitude les liens de causalité entre le nombre de spermatozoïdes et l’environnement auquel sont exposés les humains. Il est plausible que certaines substances qualifiées de perturbateurs endocriniens puissent être incriminées mais encore là, aucune étude n’est parvenue à statuer clairement et de manière définitive sur cette hypothèse [89–91]. Il est admis que la fertilité a diminué au cours des dernières décennies dans plusieurs pays tels que la France, le Royaume-Uni ou le Danemark [92,93]. Des études ont démontré qu’une exposition dans le milieu de travail ou dans l’environnement à des niveaux élevés de produits chimiques peut altérer la fertilité mais là

encore les conclusions sont divergentes et ne permettent pas d'affirmer avec certitude s'il s'agit de perturbation endocrinienne ou non [94].

Les perturbations thyroïdiennes sont également une conséquence de l'exposition aux perturbateurs endocriniens. En effet, il a été démontré qu'un grand nombre de composés organiques sont susceptibles d'affecter l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (HPT). Ces derniers ont pour effet de diminuer de manière significative les niveaux d'hormones thyroïdiennes induisant alors un dérèglement du système. Parmi ces composés on peut y retrouver les biphényles polychlorés (BPC), les diphényles éthers polybromés (PBDEs), le perchlorate, le BPA, les phtalates, les dioxines et bien d'autres molécules exogènes [95]. Chez l'humain, les pathologies thyroïdiennes sont très fréquentes. Par exemple, l'hyperthyroïdie concerne approximativement 2% des femmes et 0,2% des hommes ce qui en fait un enjeu de santé publique non négligeable [96]. Un nombre important de pathologies thyroïdiennes peuvent être causées, tout ou en partie, par des xénobiotiques ayant un rôle sur l'homéostasie [97]. En premier lieu, l'hypothyroïdie est synonyme d'un fonctionnement amoindri de la thyroïde qui voit alors sa production d'hormones thyroïdiennes (T3 et T4) réduite dans des quantités qui ne sont plus suffisantes. Les symptômes associés à ce dysfonctionnement sont divers et parfois non spécifiques tels que l'intolérance au froid ou à la chaleur, l'état léthargique, les crampes musculaires, l'hyper-irritabilité, les troubles du sommeil, la perte de poids sans lien avec une modification du régime alimentaire, la constipation, ou encore l'apparition de retards mentaux [98]. Il est également avéré qu'une exposition à long terme à des perturbateurs endocriniens, peut conduire à l'apparition de tumeurs [99]. L'hyperthyroïdie pourrait également être provoquée par l'exposition à des xénobiotiques. Aussi, plusieurs études ont démontré que des maladies thyroïdiennes auto-immunes pouvaient être provoquées à la suite d'expositions environnementales, par une modification des interactions entre cellules de la glande thyroïde et système immunitaire [95,100].

Il faut aussi considérer les possibles effets additifs lorsqu'un organisme est exposé à un mélange de perturbateurs endocriniens. En effet, les effets synergiques ou additifs sont très difficiles à évaluer et rendent la tâche complexe pour ce qui est de la détermination de la toxicité et des mécanismes d'actions sur les récepteurs et l'impact sur l'environnement [101].



Lorsque des évaluations des risques toxicologiques sont menées (ERA), il devient alors indispensable d'appliquer une démarche scientifique adéquate qui tend à prendre en compte le plus de paramètres mesurables afin d'être le plus représentatif possible.

### **1.3 Les hormones stéroïdiennes et le bisphénol A**

Comme évoqué dans les sections précédentes, un grand nombre de substances sont considérées comme étant des perturbateurs endocriniens. Parmi ces molécules, un groupe se distingue particulièrement : les hormones stéroïdiennes (HS). En effet, qu'elles soient naturelles ou synthétiques, elles sont caractérisées par une activité ostrogénique élevée surtout en ce qui concerne les hormones stéroïdiennes ostrogéniques. C'est d'ailleurs cette qualité qui fait de l'estradiol, une hormone de référence lorsqu'il est question d'évaluer le potentiel ostrogénique d'une molécule suspectée d'être un perturbateur endocrinien. L'étude des HS revêt une importance majeure puisque qu'une multitude d'études ont permis de déterminer des niveaux significatifs de ces molécules dans l'environnement et notamment dans le milieu aquatique. De plus, leur potentiel de perturbation sur certains organismes a été démontré à de faibles concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$ . À ce jour, il existe des normes et recommandations en ce qui concerne la législation des hormones stéroïdiennes dans l'environnement à l'image de celles instiguées dans l'Union Européenne mais elles ne concernent qu'un nombre limité de matrices et de molécules. Le bisphénol A, quant à lui, fait partie de la famille des bisphénols et représente une des molécules organiques les plus utilisées dans l'industrie (précurseur de polymères), ce qui explique aussi son occurrence globale dans l'environnement.

Afin d'évaluer les risques potentiels ou avérés de niveaux de contaminations aussi bas que le  $\text{ng L}^{-1}$ , il est indispensable de développer des méthodes analytiques qui sont sensibles, robustes, efficaces et polyvalentes. En effet, il devient nécessaire d'optimiser et de valider l'entièreté du processus analytique (préconcentration, purification, extraction, etc.) afin d'atteindre des limites de détection les plus basses possibles. La motivation d'un développement de méthode aussi sensible réside dans l'atteinte de limites de détection en adéquation avec les normes établies si tant qu'elles puissent l'être.

### 1.3.1 Retour historique et origines

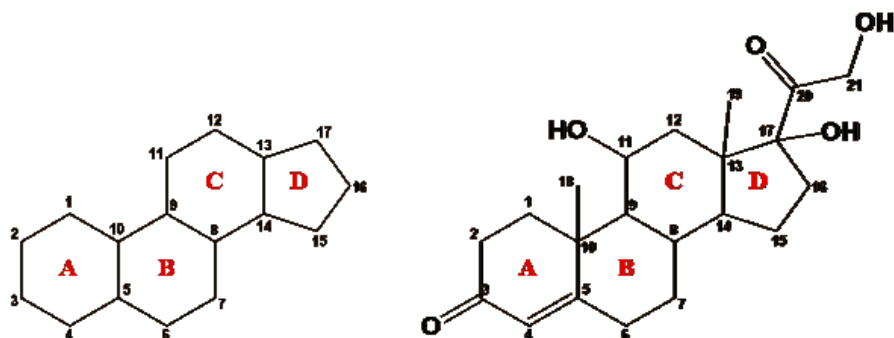
Bien que certaines hormones soient des molécules endogènes naturellement produites par les organismes vivants, leur identité ne fut connue qu'à la charnière des XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècle. En effet, c'est en 1902 que William Bayliss et Ernest Starling découvrirent qu'en réponse à une production d'un fluide acide de l'estomac à l'intestin, une sécrétion interne, la sécrétine était libérée dans le sang à partir des cellules endocriniennes du duodénum. Ils affirmèrent également que cette molécule était capable de stimuler la production de bicarbonate dans le pancréas afin de neutraliser la substance acide présente dans l'intestin. La notion de molécule « messagère » capable de transmettre une information dans l'organisme était née [102]. C'est en 1905 qu'Ernest Starling mentionna pour la première fois le mot « hormone » (du grec ὁρμάω, mettre en mouvement, diriger ; suivi du suffixe –one caractéristique de la chimie). Durant les années qui suivirent, beaucoup d'hormones ont été identifiées et l'intérêt suscité par ces molécules s'accrut fortement dans les domaines de la chimie, de la biochimie et de l'ensemble de ce qui a trait aux hormones (cycle reproducteur, chirurgies liées au système endocrinien, etc.). C'est en 1912 que le terme « endocrinologie » est donné à cette nouvelle spécialité médicale. En 1916, l'Association pour l'étude des sécrétions internes (*Association for the Study of Internal Secretions*) fut créée et est actuellement connue sous le nom de Société Endocrinienne (*Endocrine Society*). C'est en 1921 que Frederick Banting et Charles Best menèrent à bien plusieurs expériences qui permirent l'identification de l'insuline. En 1929, Corner et Willard Myron Allen découvrirent une autre hormone, la « progestine » (progestérone). C'est dans les années 1930 que les premières hormones furent extraites de tissus animaux telles que l'estrone (1932) ou encore la progestérone (1934). En 1935, ce sont Messieurs Butenandt et Hanisch qui parvinrent à synthétiser la testostérone [103]. Butenandt reçut par ailleurs quelques années plus tard (1939) le prix Nobel (partagé avec Leopold Ruzicka) pour leur identification des hormones sexuelles telles que les œstrogènes, la progestérone et l'androstérone. Dès 1938, ce sont les premiers estrogènes de synthèse qui furent fabriqués à l'image du diéthylstilbestrol (DES) ou encore l'éthinylestradiol (EE2) elle-même synthétisée par Hans Herloff Inhoffen et Walter Hohlweg dans les laboratoires Schering à Berlin [104]. En 1960, après de nombreuses recherches ayant prouvé que de fortes doses d'androgènes, d'œstrogènes ou de progestérone

inhibaient l'ovulation, la FDA approuva la mise sur le marché de l'Enovid en tant que moyen de contraception [105]. Dans les années 1970, la recherche connaît une avancée majeure avec la découverte des récepteurs hormonaux situés à la surface ou à l'intérieur des cellules constituant leurs tissus cibles [106]. Depuis, les recherches en génomique ont fait un bond considérable. En effet, plusieurs équipes de recherche ont démontré l'existence d'un lien entre la présence d'hormones spécifiques et la réponse génique induite. Désormais, les récepteurs hormonaux sont divisés en deux catégories : les récepteurs nucléaires et les récepteurs cellulaires membranaires. L'intérêt porté à ces derniers reste d'ailleurs très actuel puisque plusieurs centaines de publications traitant de ce sujet paraissent chaque année [107].

Le Bisphénol A a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Alexander Dianin et c'est en 1905 que la synthèse fût publiée par Theodor Zincke [108,109]. En 1936, les biochimistes britanniques Edward Charles Dodds et Wilfrid Lawson recherchaient des substances à effet oestrogénique car les molécules endogènes étaient trop chères à extraire de l'urine des juments gestantes. Après plusieurs tests, ils en ont déduit que le bisphénol A était une substance ayant de faibles effets œstrogéniques. Cependant, ils ont rapidement découvert des œstrogènes synthétiques beaucoup plus efficaces, de sorte que le bisphénol A n'était plus utilisé pour l'hormonothérapie [110].

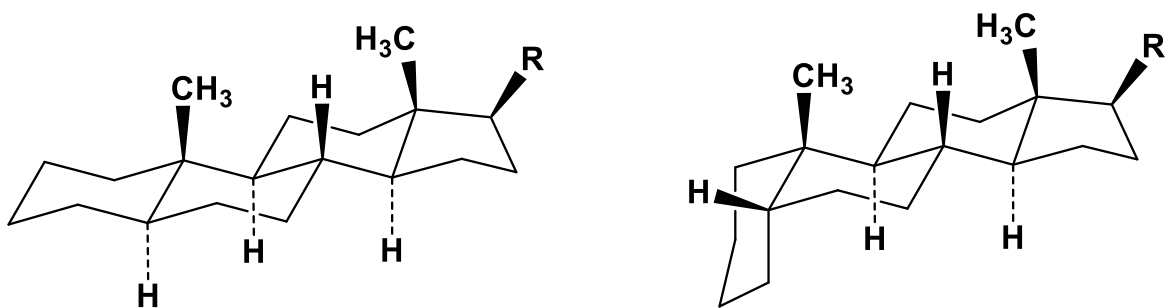
### 1.3.2 Structure et mode de fonctionnement

Les hormones stéroïdiennes (HS) sont caractérisées par la présence d'un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné. Ce noyau est constitué de trois cycles à six carbones et d'un cycle à cinq carbones. Des groupements méthyles sont généralement présents sur les carbones C-10 et C-13. Une chaîne alkyle latérale peut également être présente sur le carbone C-17. Les cycles du squelette stérane sont lettrés de A à D tandis que les carbones sont numérotés tel que présenté en **Figure 1.7**. Les propriétés et caractéristiques physicochimiques des différentes hormones dépendent des substituants présents sur les différents carbones et substituants.



**Figure 1.7** Représentation de la structure du noyau stérane (à gauche) et du cortisol (à droite) en fonction de l'identification des cycles et de la numérotation des carbones.

Bien que les hormones soient représentées en général de façon plane, la réalité est quelque peu différente. En effet, hormis les atomes de carbone ou d'oxygène possédant une hybridation  $sp^2$  (géométrie triangulaire plane ; angles de  $120^\circ$ ) l'ensemble des atomes de carbones sont hybridés  $sp^3$  (géométrie tétraédrique ; angles de  $109,5^\circ$  environ). Bien que la présence de cycles rigidifie la structure, la molécule, du fait des géométries mentionnées, ne peut donc être plane. De façon générale, le squelette stérane est représenté en traits pleins dans le plan de la feuille et seuls les substituants attachés aux carbones sont représentés soit en avant du plan de la feuille (liaison pleine) soit en arrière de la feuille (liaison hachurée). On parlera respectivement de liaison  $\beta$  et de liaison  $\alpha$  (**Figure 1.8**).



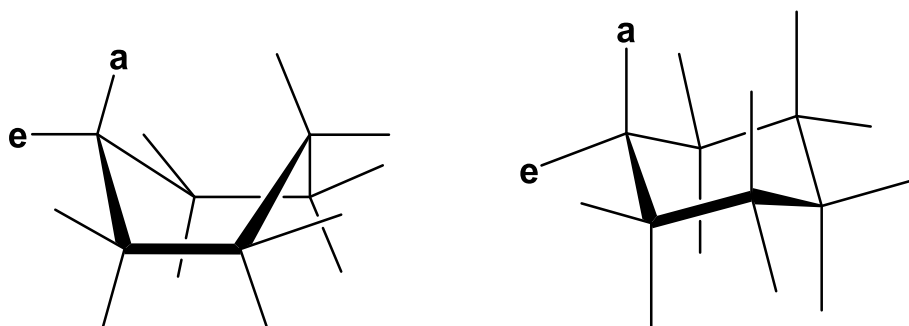
**Figure 1.8** Représentation d'une structure de type  $\alpha$  (à gauche) et de type  $\beta$  (à droite) en fonction de la position de l'atome d'hydrogène sur le carbone 5

La structure des hormones stéroïdienne est à l'origine même de leur spécificité et de leur mode d'action envers un récepteur particulier. En effet, l'enchevêtrement de cycles à six carbones et d'un cycle à cinq carbones permet de multiples isomérisations qui vont avoir un impact dans le rôle endocrinien des hormones. Les cycles A, B, C et D possèdent plusieurs centres stéréogènes pouvant donner lieu à plusieurs configurations appelées cis- et trans-. Lorsqu'à la jonction des cycles A et B, le groupement méthyle se retrouve du même côté que l'hydrogène en  $\beta$ , la configuration est dite cis- tandis que si ces deux substituants sont situés en anti l'un de l'autre on parlera de configuration trans- tel que représenté sur la **Figure 1-9**.



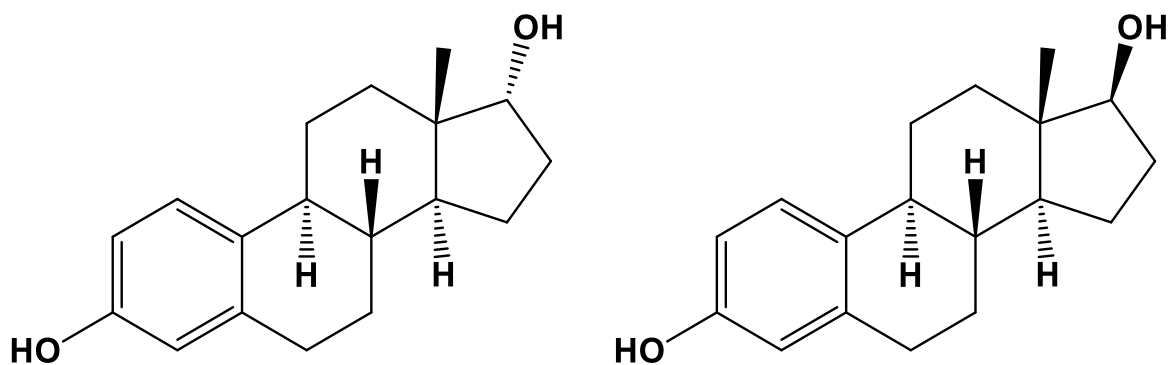
**Figure 1.9** Représentation des deux conformations possible trans- (à gauche) et cis- (à droite) à la jonction de deux cycles non-aromatiques dans le squelette stérane.

Avec trois jonctions (A-B; B-C; C-D) et deux carbones asymétriques par jonctions, huit isomères sont possibles. Toutefois, l'encombrement stérique causé par certains groupements peut favoriser certaines conformations au détriment d'autres. Par exemple, il est rare que la conformation « bateau » d'un cycle soit préférée par rapport à une conformation « chaise » qui permet moins d'encombrement notamment entre les groupements axiaux et équatoriaux (**Figure 1-10**). Enfin, en ce qui concerne les œstrogènes, l'isomérisation cis-trans n'est pas possible entre les cycles A et B puisque le premier est aromatique (**Figure 1-11**) [111].



**Figure 1.10** Représentation des deux conformères possibles pour le cyclohexane à savoir la configuration « bateau » à gauche et la configuration « chaise » à droite. Les lettres « a » et « e » représentent respectivement les groupements situés dans le plan axial et ceux situés dans le plan équatorial.

Du fait du nombre de cycles, de substituants et autres ramifications des chaînes carbonées, il est d'usage d'appeler les hormones par leurs noms triviaux et non pas par leur nom IUPAC. Par exemple, un œstrogène bien connu, l'estradiol, a pour nom systématique *estra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\alpha$ -diol* ou *estra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\beta$ -diol* dépendamment du stéréoisomère dont il est question.

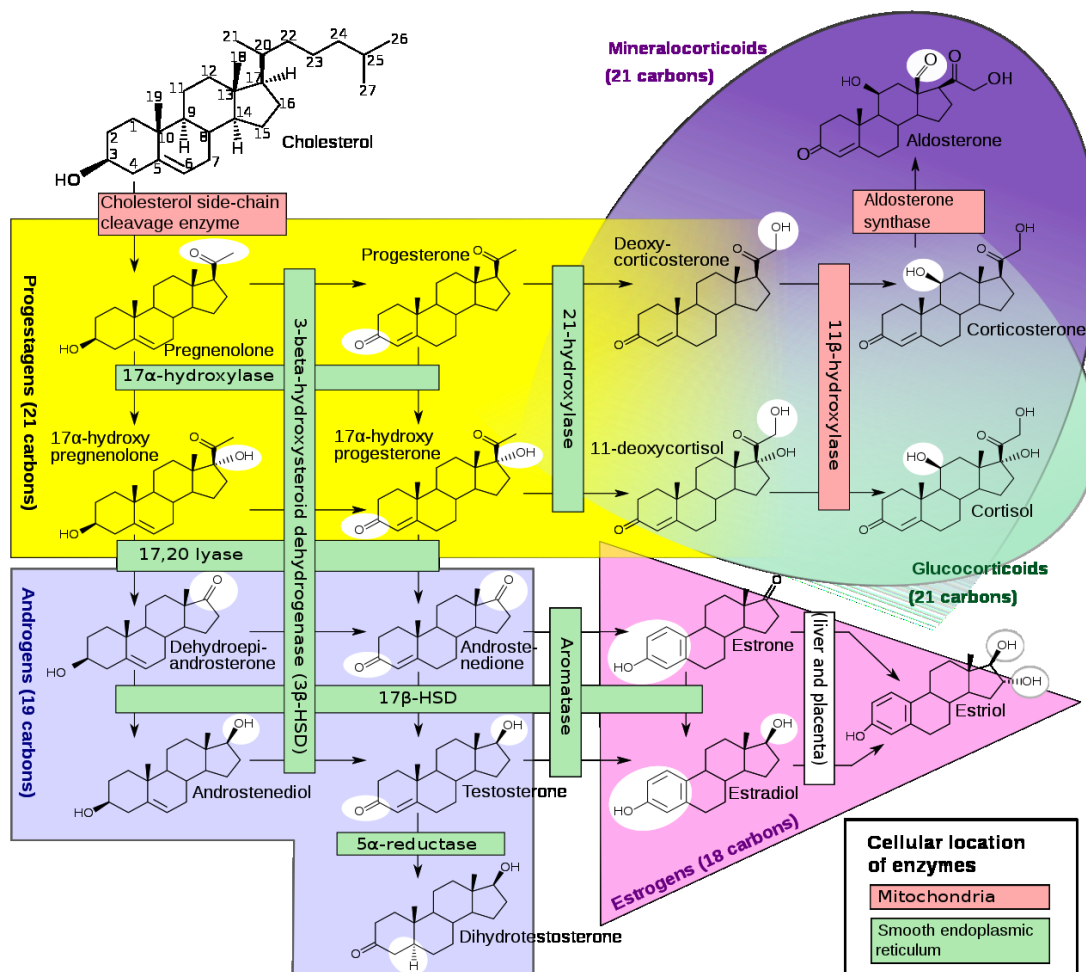


**Figure 1.11** Représentation du 17 $\alpha$ -estradiol / *estra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\alpha$ -diol* (à gauche) et du 17 $\beta$ -estradiol / *estra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\beta$ -diol* (à droite) en fonction de la configuration absolue du carbone 17.

**Tableau 1-2.** Noms triviaux et systématiques d'hormones stéroïdiennes de premier plan

Noms triviaux	Noms systématiques	CAS
Androstérone	3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one	53-41-8
Cholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	57-88-5
Cortisol	11 $\beta$ ,17,21-trihydroxypregn-4-ène-3,20-dione	50-23-7
Cortisone	17,21-dihydroxypregn-4-ène-3,11,20-trione	53-06-5
17 $\beta$ -estradiol	estra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\beta$ -diol	50-28-2
Estriol	estra-1,3,5(10)-triène-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol	50-27-1
Estrone	3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trièn-17-one	53-16-7
Progestérone	pregn-4-ène-3,20-dione	57-83-0
Testostérone	17 $\beta$ -hydroxyandrost-4-èn-3-one	58-22-0

Il existe six classes majeures d'hormones stéroïdiennes présentes chez les mammifères identifiées selon le type et la position des substituants : les œstrogènes, les androgènes, les progestatifs, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et la vitamine D. Leurs rôles sont spécifiques et peuvent se décliner de plusieurs façons. Les œstrogènes sont responsables du développement sexuel tandis que les androgènes stimulent ou contrôlent le développement et le maintien des caractères mâles. Les progestatifs sont quant à eux impliqués dans la régulation du cycle menstruel et dans le maintien de la gestation. Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans la régulation métabolique énergétique (glucides) ainsi que dans la réaction immunitaire et inflammatoire. Les minéralocorticoïdes participent à la régulation des sels tels que le sodium et le potassium. Enfin, la vitamine D permet l'absorption du calcium et du phosphore dans les intestins et les reins. La plupart des HS mentionnées précédemment sont synthétisées à partir du cholestérol au sein même des cellules (**Figure 1-12.**). Elles sont ensuite transportées dans le sang par les protéines afin d'atteindre leurs tissus cibles.



**Figure 1.12** Schématisation des mécanismes impliqués dans la stéroïdogenèse à partir du cholestérol. Les enzymes et leur localisation sont représentées dans les différents encadrés [112].

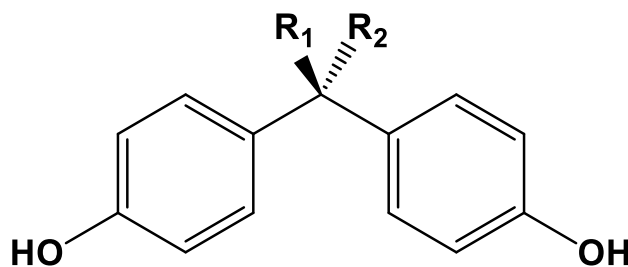
Plusieurs modes de communication sont possibles pour le transport de messagers chimiques. On distingue la communication paracrine qui est utilisée pour les transports à courte distance (p. ex., la cholécystokinine libérée à proximité d'une cellule intestinale par un neurone entérique). La communication autocrine repose sur la communication au sein même de la cellule qui a synthétisé les hormones (p. ex., épithéliums glandulaires). La communication juxtacrine est un type de signalisation s'effectuant entre cellules adjacentes impliquant des oligosaccharides, des lipides ou encore des protéines de la membrane



cellulaire. La communication intracrine implique des messagers qui agissent à l'intérieur même de la cellule où ils ont été synthétisés et ceci sans interagir avec des récepteurs situés à la surface de la cellule. Enfin, la communication endocrine est un type de signalisation effectuée via le sang sur des récepteurs distants.

Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle de premier ordre dans le développement et le maintien de l'organisme et de l'homéostasie. Le système endocrinien quant à lui permet la synthèse et la libération de ces molécules dans l'organisme selon les besoins. Le processus est sensiblement le même chez l'ensemble des mammifères : les hormones sont véhiculées par le sang jusqu'à atteindre les cellules cibles via leurs récepteurs spécifiques. Rappelons que la reconnaissance hormone-récepteur est essentiellement due à la conformation de la molécule et que c'est dans cette propriété que se trouve le potentiel de perturbation endocrinienne induit par des hormones synthétiques ou d'autres EDCs. En effet, le caractère aromatique des œstrogènes leur confère une planéité qu'ils partagent avec de nombreuses autres molécules (pesticides tels que l'atrazine ou encore des produits de soins corporels tels que les parabènes) qui peuvent de ce fait être reconnues par les récepteurs hormonaux spécifiques.

Le bisphénol A fait partie de la famille des bisphénols. Ce sont des composés basés sur un squelette diphenylméthane (**Figure 1-13.**) sur lequel un ou plusieurs substituants remplacent les hydrogènes portés par l'atome de carbone central (**Tableau 1-3.**). Dans le cas du bisphénol A, il s'agit de deux groupements de type méthyle.



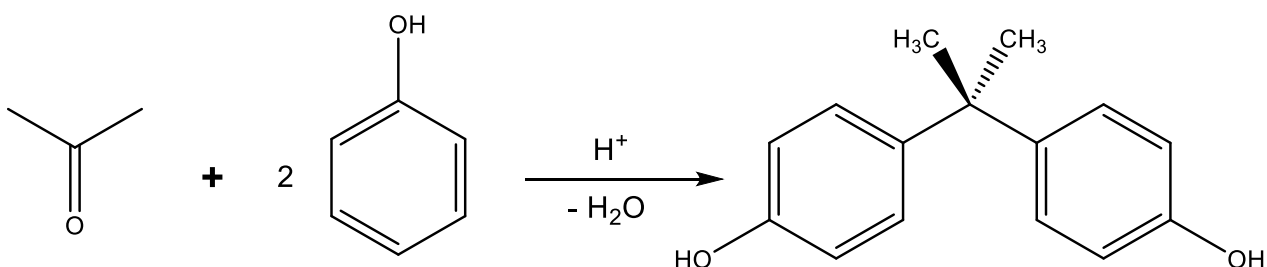
**Figure 1.13** Structure générale d'un bisphénol (squelette diphenylméthane).

**Tableau 1-3.** Exemples de bisphénols selon leurs substituants sur le carbone central.

Nom	Substituant $R_1$	Substituant $R_2$
Bisphénol A	— CH <sub>3</sub>	— CH <sub>3</sub>
Bisphénol AF	— CF <sub>3</sub>	— CF <sub>3</sub>
Bisphénol AP	— CH <sub>3</sub>	— Ph (phényle)
Bisphénol B	— CH <sub>3</sub>	— C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Bisphénol E	— CH <sub>3</sub>	— H
Bisphénol F	— H	— H

### 1.3.3 Synthèse chimique pour la production des hormones synthétiques et du bisphénol A

Une voie de synthèse industrielle est largement suivie pour la fabrication du bisphénol A. Celle-ci repose sur une réaction de condensation d'une cétone ou d'un aldéhyde avec deux équivalents de phénol (**Figure 1-14.**). Cette réaction est généralement catalysée en milieu acide très concentré (acide chlorhydrique, HCl; acide sulfurique, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), par des argiles activées par un acide, ou encore par des polystyrènes sulfonés et réticulés. Il est possible de recourir aux thiols ou à des mercaptoacides afin d'augmenter la vitesse de réaction. Les solvants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques et chlorés ou l'acide acétique glacial sont souvent employés dans cette synthèse [113].



**Figure 1.14** Voie de synthèse industrielle du Bisphénol A. Réaction de condensation de l'acétone sur 2 équivalents molaires de phénol.

Le bisphénol A est ensuite couramment utilisé comme monomère dans la synthèse industrielle des polymères plastiques de type « polycarbonates »

Les hormones stéroïdiennes telles que les progestatifs de synthèse sont produits via des processus de modification de certaines fonctions présentes sur les progestatifs naturels. Par exemple, la noréthindrone est un dérivé de la testostérone (progestatif C19) tandis que le lévonorgestrel est un dérivé de la progestérone (progestatif C21). Il n'est pas facile que d'identifier une voie de synthèse précise car certains procédés sont soumis à des brevets et d'autres ne donnent que des informations partielles. Cependant, de multiples institutions telles que les universités, les instituts de recherche ou encore les laboratoires industriels (Syntex, Merck, Schering, etc) ont mis au point des procédés largement employés dans la fabrication de pilules contraceptives depuis la synthèse de la norethindrone en 1951 qui fut le premier progestatif de synthèse à être produit via une synthèse totale [114].

#### **1.3.4 Classification des hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestatifs et androgènes) et du bisphénol A**

Parmi les différentes classes d'hormones stéroïdiennes répertoriées, trois ont été étudiées dans les présents travaux. Les œstrogènes (E1,  $\alpha$ -E2,  $\beta$ -E2, E3, EE2, EQUI, EQUIL), les progestatifs (LEVO, NORE, MPROG, PROG et ALTRE) et les androgènes (ANDRO et TESTO) ont été sélectionnés pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ce sont des substances qui sont pour la plupart endogènes et se retrouvent donc dans l'environnement via plusieurs voies possibles. Pour celles qui ne sont pas naturelles mais synthétiques, il est intéressant et pertinent de les étudier puisque ces molécules sont d'une part, consommées en grande quantité et d'autre part, elles ont un potentiel de perturbation endocrinienne élevé. Aussi, ces classes d'HS sont largement documentées, notamment les œstrogènes, ce qui permet de s'appuyer sur une base solide afin d'en approfondir l'étude. En effet, plusieurs de ces composés à l'image du lévonorgestrel ou encore l'éthinylestradiol, sont prescrits depuis des décennies à des fins thérapeutiques ou contraceptives. De nos jours, on estime à 100 millions le nombre de femmes qui consomment des contraceptifs oraux [115]. Au Québec, le nombre de pilules contraceptives prescrites chaque année est de 128 millions tandis qu'il est de 107 millions pour ce qui est des doses annuelles prescrites dans le cadre de thérapies de remplacement hormonal [116]. Ce chiffre important basé sur une population d'environ 8 millions d'individus laisse présager d'une occurrence importante des hormones dans

l'environnement. Dans les dernières années, les HS ont été détectées dans la plupart des matrices environnementales des eaux de surfaces aux eaux souterraines, en passant par les eaux usées [117]. Leur présence est également suspectée dans l'eau du robinet ce qui peut impliquer une problématique supplémentaire en termes de santé publique [118]. Pour toutes ces raisons, il était intéressant de porter un regard attentif à ces molécules présentes dans notre quotidien mais surtout dans l'environnement.

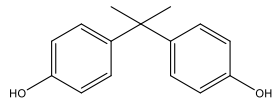
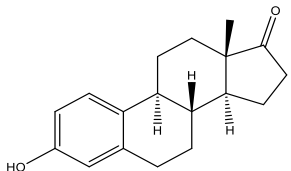
Molécule d'origine exclusivement anthropique, le bisphénol A est produit massivement depuis des décennies. Utilisé dans l'industrie des polymères (polycarbonates, résines époxy, et.) sa production mondiale est passée de 1 million de tonnes dans les années 1980 à plus de 2,2 millions en 2009 [119,120]. Pour les seuls États-Unis, sa consommation est estimée à 856 000 tonnes [121]. À l'instar des HS, le BPA est détecté dans la plupart des matrices environnementales mais également biologiques ce qui peut laisser supposer un impact sur la santé humaine et l'environnement [122].

#### 1.3.4.1 Propriétés physicochimiques

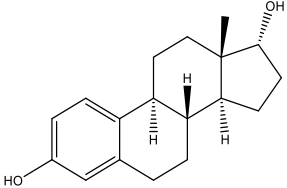
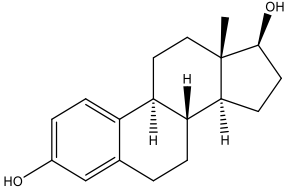
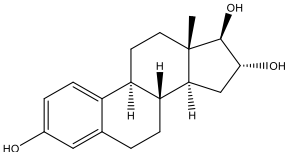
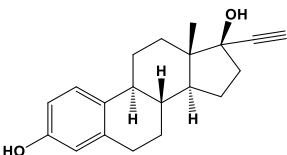
Afin de comprendre le comportement des hormones stéroïdiennes et du BPA dans l'environnement, il est indispensable d'étudier leurs propriétés physicochimiques. Avec de telles connaissances, il est alors plus aisé de prédire et d'évaluer leur devenir environnemental. La solubilité est un paramètre important à considérer puisqu'elle détermine la facilité avec laquelle les molécules peuvent être retrouvées dans la phase dissoute. En ce qui concerne les HS et le BPA, leur solubilité est relativement faible puisque les valeurs à 20°C s'étendent de 1,14 mg/L pour l'équiline à 558 mg/L pour l'estriol [123]. Il faut noter que ces valeurs sont approximatives et dépendant des conditions de pH, de la force ionique, de la pression et de la température. Autre paramètre important à considérer, le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) permet de prédire l'affinité qu'aura un composé pour l'eau mais également sa propension à être bioaccumulé. En effet, en passant à l'échelle logarithmique (décimale), des molécules ayant une valeur de  $\log K_{ow}$  inférieure à 1 sont considérées comme hydrophiles, auront une solubilité accrue et un potentiel de bioaccumulation plus faible que d'autres ayant une valeur de  $\log K_{ow}$  supérieure à 4 qui seront, pour leur part, considérées comme hydrophobes et dont le potentiel de bioaccumulation et de bioamplification sera plus

important [124]. De telles molécules auront également tendance à s'adsorber sur la matière particulaire en suspension (SPM), les sols et les sédiments. Concernant les composés étudiés dans le cadre de cette thèse, les valeurs de  $\log K_{ow}$  s'étendent de 2,45 (E3) à 4,01 (E2). Enfin, ce qui concerne la pression de vapeur, c'est-à-dire la capacité d'une substance à se volatiliser ainsi que la constante de Henry, c'est-à-dire la capacité d'une substance à se volatiliser lorsqu'elle est en solution, les valeurs caractéristiques sont très faibles. La pression de vapeur se situe entre  $10^{-3}$  et  $10^{-12}$  kPa tandis que la constante de Henry oscille entre  $10^{-7}$  et  $10^{-12}$  Pa  $m^3/mol$  [125,126]. Ces valeurs laissent à penser que les hormones et le bisphénol A ont une faible aptitude à se volatiliser et donc à se déplacer dans l'atmosphère sur de longues distances.

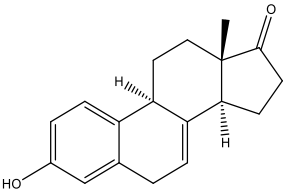
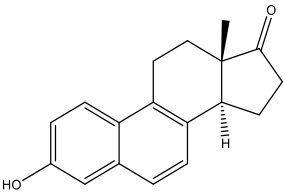
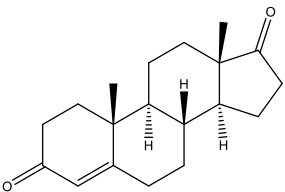
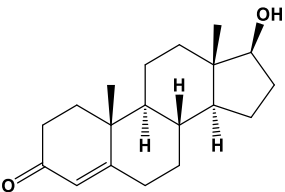
**Tableau 1-4.** Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (\*) sont des hormones synthétiques.

Noms (acronymes, CAS et masse molaire en g mol <sup>-1</sup> )	Structure moléculaire	pKa	Log K <sub>ow</sub>	Solubilité (mg/L)	Pression de vapeur (kPa)	Constante de Henry (Pa m <sup>3</sup> /mol)
<i>Bisphénols</i>						
Bisphénol A (BPA)		9,8	3,32	120 <sup>a</sup>	2,7 x 10 <sup>-7</sup>	9,2 x 10 <sup>-12</sup>
80-05-7 228,29						
<i>Oestrogènes</i>						
Estrone (E1)		10,4	3,13	30 <sup>a</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	6,2 x 10 <sup>-7</sup>
53-16-7 270,37						

**Tableau 1-4.** Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (\*) sont des hormones synthétiques.

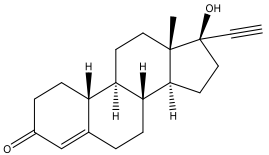
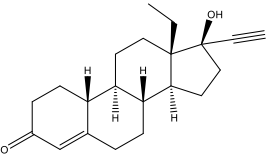
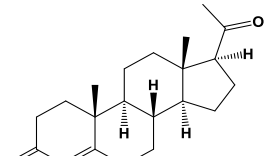
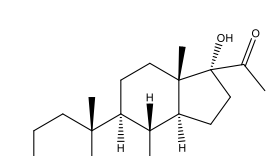
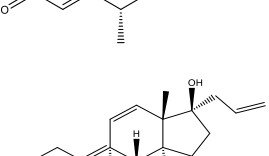
<p><math>\alpha</math>-Estradiol (<math>\alpha</math>-E2) 57-91-0 272,38</p>		10,4	4,01	3,6 <sup>a</sup>	$3 \times 10^{-8}$	$6,3 \times 10^{-7}$
<p><math>\beta</math>-Estradiol (<math>\beta</math>-E2) 50-28-2 272,38</p>		10,4	4,01	3,6 <sup>a</sup>	$3 \times 10^{-8}$	$6,2 \times 10^{-7}$
<p>Estriol (E3) 50-27-1 288,38</p>		10,3	2,45	558 <sup>a</sup>	$9 \times 10^{-13}$	$2,0 \times 10^{-11}$
<p>Ethinylestradiol* (EE2) 57-63-6 296,40</p>		10,5	3,67	116 <sup>a</sup>	$6 \times 10^{-9}$	$3,8 \times 10^{-7}$

**Tableau 1-4.** Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (\*) sont des hormones synthétiques.

Equiline (EQUI) 474-86-2 268,36		9,4	3,35	1,14 <sup>a</sup>	1,1 x 10 <sup>-8</sup>	3,9 x 10 <sup>-10</sup>
Équilénine (EQUIL) 517-09-9 266,34		9,8	3,93	1,52 <sup>a</sup>	1,8 x 10 <sup>-9</sup>	2,7 x 10 <sup>-11</sup>
<i>Androgènes</i>						
Androstènedione (ANDRO) 63-05-8 286,41		-	2,75	57,8 <sup>a</sup>	1,7 x 10 <sup>-6</sup>	3,7 x 10 <sup>-8</sup>
Testostérone (TESTO) 58-22-0 288,42		-	3,32	30,0 <sup>a</sup>	1,7 x 10 <sup>-8</sup>	3,5 x 10 <sup>-9</sup>



**Tableau 1-4.** Propriétés physicochimiques du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs et des androgènes ciblés. Les molécules marquées d'un astérisque (\*) sont des hormones synthétiques.

<i>Progestatifs</i>						
Noréthindrone* (NOR)		-	2,97	7,04 <sup>a</sup>	2,4 x 10 <sup>-9</sup>	5,8 x 10 <sup>-10</sup>
68-22-4						
298,42						
Lévonorgestrel* (LEVO)		-	3,48	35,9 <sup>a</sup>	1 x 10 <sup>-9</sup>	7,7 x 10 <sup>-10</sup>
797-63-7						
312-44						
Progestérone (PROG)		-	3,87	8,84 <sup>a</sup>	2,7 x 10 <sup>-6</sup>	6,5 x 10 <sup>-8</sup>
57-83-0						
314,46						
Medroxyprogestérone (MPROG)		-	3,50	4,47 <sup>a</sup>	1,9 x 10 <sup>-10</sup>	1,3 x 10 <sup>-8</sup>
71-58-9						
386,52						
Altrénogest* (ALTRE)		-	3,94	14,8 <sup>a</sup>	2,3 x 10 <sup>-9</sup>	3,3 x 10 <sup>-9</sup>
850-52-2						
310,44						

<sup>a</sup> mesurée à 25 °C [127,128]

#### 1.3.4.2 Sources et devenir environnemental

Les sources d'hormones sont nombreuses et sont impliquées dans des processus aux mécanismes complexes. Certaines hormones sont produites naturellement par le corps (E1, E2, E3, TESTO, PROG, etc.) et sont communes à la plupart des mammifères. Il existe des HS synthétiques massivement utilisées dans le cadre de thérapies de remplacement hormonal ou bien de mesures de contraception à l'image de l'éthinylestradiol (EE2) et du lévonorgestrel (LEVO). Qu'elles soient naturelles (endogènes) ou de synthèse (exogènes), les hormones stéroïdiennes sont excrétées quotidiennement sous forme conjuguée dans l'urine ou les matières fécales. Ces conjugués oestrogéniques comprennent l'estradiol-17-sulfate (E2-17S), l'estradiol-3-sulfate (E2-3S), l'estrone-3-sulfate (E1-3S), l'estradiol-3-glucuronide (E2-3G) ainsi que l'estrone-3-glucuronide (E1-3G), qui peuvent être convertis en d'autres œstrogènes conjugués ou libres par hydrolyse et transformation biotique [129].

Leur devenir environnemental sera détaillé ci-après. Les œstrogènes sont présents et voyagent notamment via les élevages de bétail. En effet, les élevages bovins, porcins et ovins sont considérés comme d'importantes sources d'œstrogènes dans l'environnement. Les hormones relarguées en plus grande quantité sont l'estrone (E1), les deux isomères de l'estradiol ( $\alpha$ -E2 et  $\beta$ -E2) ainsi que plusieurs métabolites qui peuvent varier selon les espèces. Une étude de Johnson et al. a montré qu'une vache pouvait excréter quotidiennement 0,306  $\mu$ g de E1 et 0,140  $\mu$ g de  $\beta$ -E2 [130]. Il a également été démontré que les volailles excrètent naturellement du E1, du  $\beta$ -E2 et du E3 [131]. Aux États-Unis, la production annuelle d'œstrogènes est estimée entre 45 et 65 tonnes pour les bovins, 3,44 tonnes pour les gallinacés, entre 0,83 et 1,2 tonnes pour les porcins, et 92 kg pour les ovins [132]. Si l'on considère le nombre d'animaux d'élevage à travers le monde, il va sans dire que ces valeurs doivent être revues à la hausse. En ce qui concerne la population humaine mondiale, on estime à 34 tonnes la quantité d'œstrogènes naturels (E1,  $\beta$ -E2 et E3) excrétés annuellement [133]. Les estimations pour la Chine sont bien plus élevées puisque l'on avance des valeurs de 33,9 tonnes par an excrétées par les humains et de 1280 tonnes par an pour les animaux pour ces mêmes composés pour ce seul pays [134].

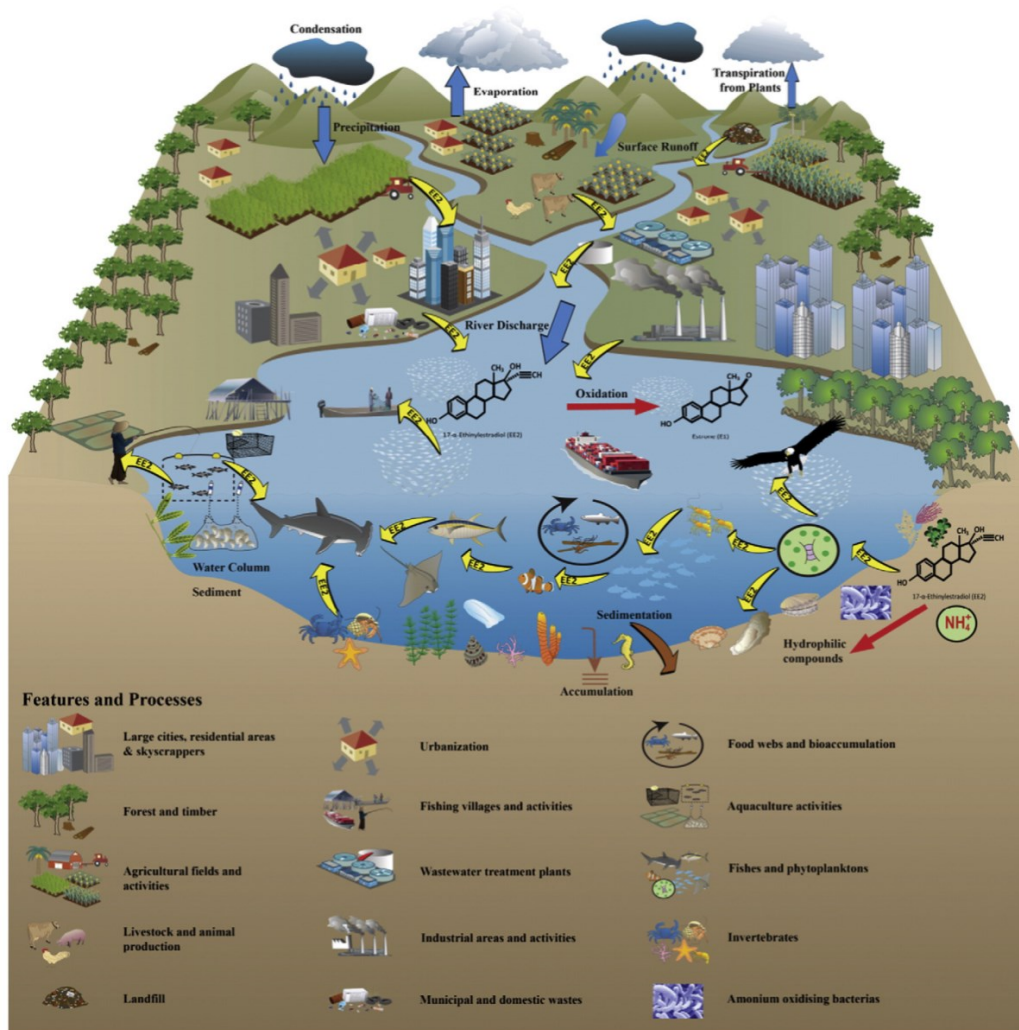
Si les animaux d'élevage excrètent des HS endogènes, ils excrètent également des hormones qui leur sont administrées comme stimulateurs de croissance. Ces dernières à

l'image du  $\beta$ -E2, du E2-benzoate-progestérone, du E2-benzoatétestostérone, l'acétate de E2-benzoate-trenbolone (TBA) et du E2-TBA sont susceptibles de modifier la quantité d'œstrogènes excrétés quotidiennement [135]. Des études ont par ailleurs étudié le potentiel de bioaccumulation de certaines hormones telles que EE2. Ces travaux menés sur plusieurs espèces aquatiques telles que le poisson rouge (*Carassius Auratus*) et la carpe sauvage (*Hemiculter Leucisculus*) ont démontré que cette hormone était bioaccumulable. En effet, des valeurs comprises entre 16000 et 20000 ont été rapportées alors qu'une substance est considérée bioaccumulable lorsque cette valeur dépasse 5000. D'après ces valeurs de bioaccumulation, il est permis de supposer que les hormones stéroïdiennes telles que l'éthinylestradiol possèdent un réel potentiel de bioamplification. D'autres études ont toutefois rapportés des valeurs bien plus basses pour le méné tête de boule (*Pimephales Promelas*) comprises entre 610 et 660 ce qui suggère un potentiel de bioaccumulation très variable d'une espèce à une autre [124,136,137].

Les stations d'épuration domestiques sont également responsables d'un rejet important d'œstrogènes et de progestatifs dans l'environnement. En effet, bon nombres d'HS synthétiques sont ingérées puis excrétées par les humains (p. ex., EE2, NOR, LEVO). Dès lors, ces molécules se retrouvent dans le circuit d'eau usée et sont acheminées vers les stations d'épurations. Cependant, toutes ces stations ne sont pas efficaces et ne permettent pas de traiter de façon adéquate ce type de substances [138]. En résulte un rejet important dans les eaux traitées dans l'environnement, directement dans les eaux de surface [117,139–142]. De plus, il est important de mentionner que toutes les municipalités ne disposent pas de stations d'épuration et donc certaines rejettent directement leurs eaux usées dans les cours d'eau. D'ailleurs, tous les pays ne sont pas situés sur un pied d'égalité à ce propos. En effet, dans certains pays ne disposant pas d'infrastructures suffisantes, les eaux usées y sont largement déversées dans l'environnement sans aucun traitement [39].

Combinés aux eaux usées industrielles et autres types d'effluents, ces rejets contribuent au transport et à l'occurrence des HS dans les écosystèmes tels que les eaux des rivières, des lacs, des estuaires et des océans ainsi que des eaux souterraines. À ceci, il faut ajouter les possibles phénomènes de surverses, les ruissellements des surfaces agricoles, les

précipitations ainsi que les fuites dans les réseaux d'égouts ou des fosses septiques qui peuvent également contribuer à la présence des HS dans l'environnement.



**Figure 1.15** Sources et devenir environnemental de l'éthinylestradiol (modèle applicable aux autres hormones oestrogéniques, androgéniques et progestatifs) [143]

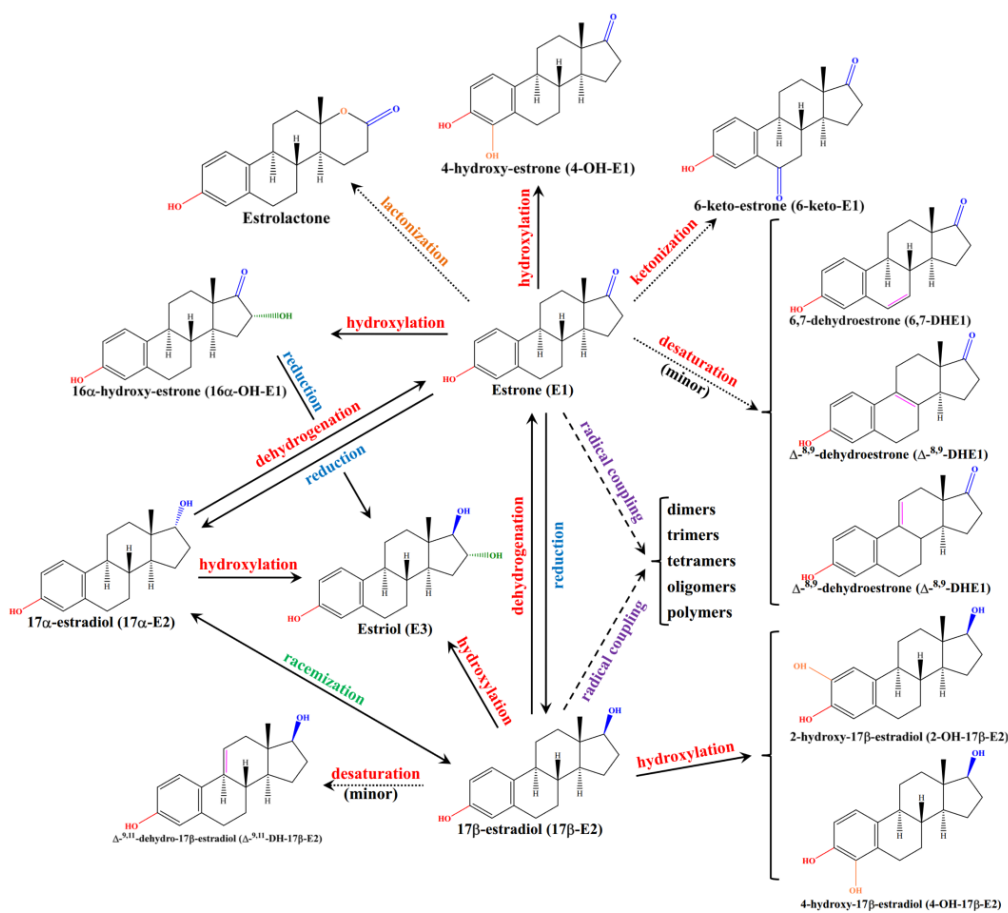
Le temps de demi-vie des hormones peut nous aider à comprendre le comportement des HS dans l'environnement. Plusieurs études en ont déterminé la valeur dans différentes matrices environnementales allant des sédiments aux eaux de surfaces en passant par les matières solides en suspension. Les temps de demi-vie dans les sédiments s'échelonnent entre 0.22 et 11 jours pour le  $\beta$ -E2, 0.61 et 8.3 jours pour E1, 0.7 et 1.7 jours pour E3 et 330 jours pour EE2 [144–146]. Notons que la valeur indiquée pour l'EE2 est bien plus élevée et se justifie par le log  $K_{ow}$  bien plus important de cette HS. Pour les eaux de surfaces, les valeurs

sont de l'ordre de quelques heures et il en va de même pour les progestatifs [147,148]. Cela signifie que la persistance des hormones dans l'environnement n'est pas tant due à leurs propriétés physicochimiques qu'à leur rejet permanent et constant par les humains et les animaux.

Après leur introduction dans l'environnement, les hormones stéroïdiennes sont soumises aux conditions climatiques, aux variations de pH, de températures ainsi qu'aux aléas induits par la présence d'autres molécules. De ce fait, leur dégradation peut se faire par différents processus physiques ou chimiques tels que l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse ou la photolyse (abiotique) ou bien par des processus complexes liés aux bactéries (biotique). Tout d'abord, les HS, qui ne sont que peu hydrophiles, ont tendance à s'adsorber sur les particules en suspension ou bien les sédiments et ce jusqu'à une dizaine de jours [149]. Elles sont également capables de se lier aux acides humiques [150]. Les proportions dans lesquelles elles peuvent s'adsorber ou se lier dépendent de l'humidité et de la température. De plus, la salinité de l'eau (présence de NaCl) induit une augmentation de la floculation et de l'agrégation pouvant ainsi favoriser l'adsorption [151]. Le partitionnement de ces molécules entre la phase particulaire, les sédiments et la phase dissoute va également dépendre de la concentration en phase particulaire dans la colonne d'eau, de la taille des particules et de la nature de ces dernières [152]. Ces phénomènes ainsi que la faible solubilité et volatilité des hormones vont ainsi limiter leur mobilité. En effet, plusieurs études ont rapporté des concentrations élevées aux abords des fermes d'élevage. Ces niveaux étaient d'autant plus hauts lorsque le lisier était épandu sur les sols agricoles. Ceci témoigne d'une grande affinité des hormones pour la matière organique et les sols.

Les hormones peuvent également être dégradées par différents organismes tels que les bactéries capables de les métaboliser ou encore de les oxyder [153–156]. De nombreuses équipes de recherche se sont afférées à comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus et ont étudié les différents traitements appliqués dans les usines de traitement des eaux usées. Il a été démontré qu'un traitement en milieu anaérobique (privé d'oxygène) pouvait éliminer 80% des hormones tandis qu'un traitement en milieu aérobique (en présence d'oxygène) était capable d'en éliminer près de 95% [157,158]. D'ailleurs, dans l'environnement, ce sont les transformations en milieu aérobique qui sont plus fréquentes

[159]. De nouveau, les conditions de température, d'humidité et d'activité biologique influencent le potentiel de biotransformation [160]. L'étude de la biotransformation des œstrogènes a révélé que de nombreux composés œstrogéniques sont facilement interconvertis en d'autres composés œstrogéniques. Les voies de la biotransformation des œstrogènes sont complexes en raison des divers intermédiaires et produits qui dépendent de nombreux facteurs. Il a par exemple été démontré que l'E1 est un intermédiaire du  $\beta$ -E2 et qu'il est ensuite minéralisé en CO<sub>2</sub> [161–163]. Aussi, l'E3 a également été identifiée en tant que métabolite résultant de la biotransformation de l'E1 et de l' $\alpha$ -E2 [164] (**Figure 1-15**). Toutefois, ces métabolites étant instables, ils sont facilement dégradés par les micro-organismes. Ceci n'est qu'un aperçu des innombrables mécanismes et processus proposés pour la dégradation des HS et il faut également prendre en compte les processus des hormones conjuguées [165,166].

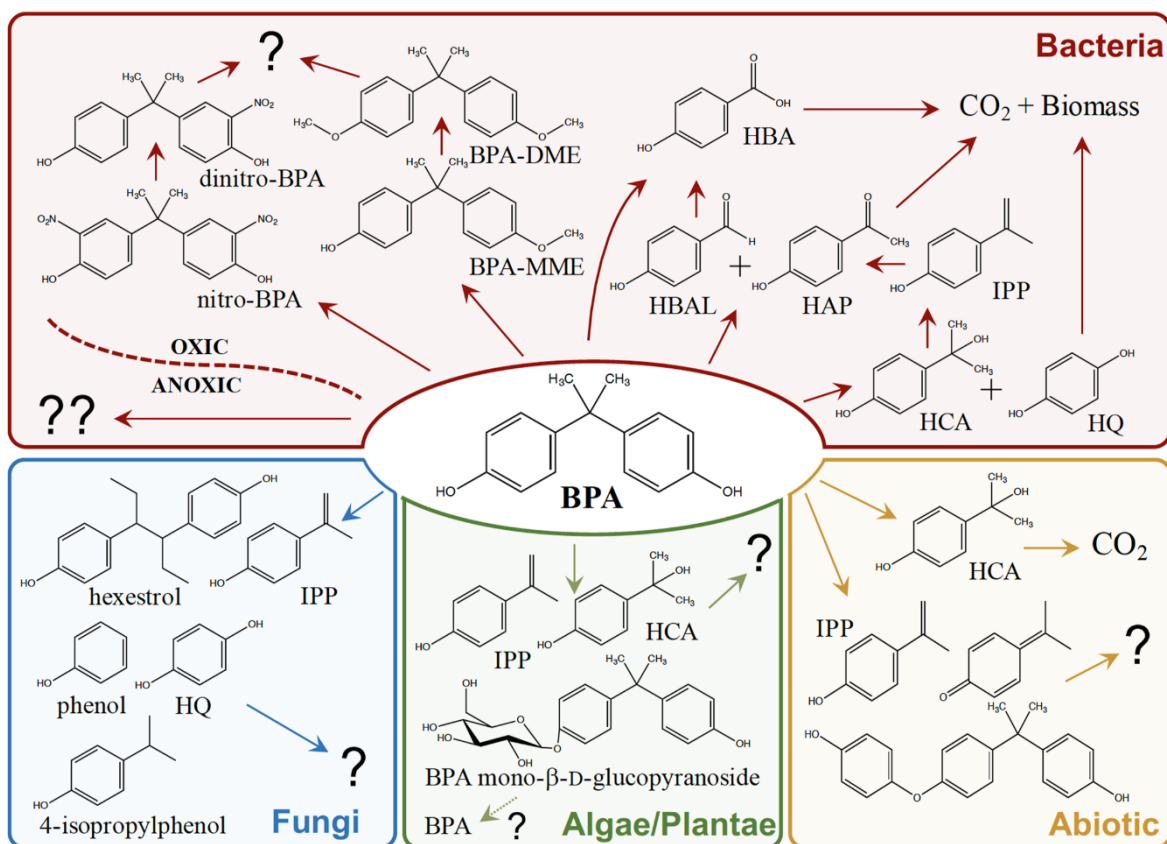


**Figure 1.16** Processus (proposé) de biotransformation des œstrogènes dans l'environnement [167]

D'autres processus de type abiotiques sont impliqués dans la dégradation des HS. La photodégradation des hormones est affectée par les substances humiques sous la lumière solaire simulée [168,169]. Dans une étude récente, il a été démontré que 60,2% de l'E1, 89,0% du  $\beta$ -E2 et 87,6% du E3 étaient éliminés en présence de manganèse (II) après 3 jours d'irradiation à la lumière visible [170,171]. Chen et al. ont observé des phénomènes de photodégradation directe et indirecte (principalement via des OH hydroxylation) de E3 en phase dissoute [168]. La photodégradation directe se produit lorsque des photons d'énergie spécifique sont absorbés par un composé tandis que la photodégradation indirecte a lieu lorsque des radicaux libres sont produits par d'autres molécules organiques [172,173]. L'oxydation est une autre réaction possible qui peut se produire naturellement dans l'environnement. En effet, l'oxygène présent dans l'air est un puissant oxydant pouvant par exemple oxyder du  $\beta$ -E2 en E1 [174]. D'autres éléments tels que le manganèse ou le fer sont également de bons oxydants [175]. On remarque par ailleurs que la dégradation de différents œstrogènes en E1, justifie en partie son occurrence plus fréquente et plus marquée. Plusieurs études ont également mis en avant des réactions de couplage radicalaire entre certaines hormones comme le  $\beta$ -E2 et E1 sous la lumière UV. En résultent des dimères, trimères, tétramères, oligomères ou encore des polymères [176,177]. La formation de telles espèces pourrait leur conférer une stabilité supérieure et donc impacter l'environnement de façon plus durable. Enfin, certaines études ont rapporté que les œstrogènes présents dans les sols pouvaient également être assimilés par la végétation via les racines [178,179]. Ces dernières pourraient subséquemment être dégradées par les métabolismes de la plante ou bien être phototransformées à la surface des feuilles [180]. Peu d'informations sont disponibles quant à la dégradation des progestatifs et des androgènes dans l'environnement mais il semblerait que les voies soient sensiblement les mêmes et que la progestérone serait susceptible de se dégrader en testostérone [181].

Si les hormones stéroïdiennes disposent d'un grand nombre de voies de dégradation possibles, le BPA est également sujet à des transformations biotiques et abiotiques. Plusieurs études ont catalogué et répertorié des sous-produits de dégradation du BPA selon les mécanismes impliqués (**Figure 1-17.**). Au vu d'un temps de demi-vie relativement court et

de ces possibles dégradations, l'occurrence de ce composé provient de son rejet constant et permanent par les activités humaines [182].



**Figure 1.17** Sommaire des processus de dégradation/transformation du BPA selon les différents milieux. Seuls les intermédiaires sont ici représentés [182].

La liste non exhaustive de sources et de voies de dégradation possibles pour les hormones et un bisphénol (BPA) rend compte de la difficulté et de la complexité à évaluer de façon adéquate les niveaux de contaminations et les risques associés tant sur la santé humaine que sur l'environnement dans son intégralité. Afin de combler les lacunes de connaissances, la recherche se porte depuis des décennies sur l'occurrence environnementale des hormones stéroïdiennes et autres perturbateurs endocriniens. Ce foisonnement de travaux permet d'établir un aperçu général de la situation.



### 1.3.5 Occurrence dans l'environnement

L'utilisation massive des hormones stéroïdiennes se traduit par une occurrence systématique à proximité des centres de population humaine. De nombreuses études ont évalué la présence de ces molécules dans plusieurs matrices environnementales et essentiellement aquatiques (eau potable, eau de surface et eaux usées). D'autres se sont focalisées sur l'étude des matrices solides telles que les sédiments ou bien la phase particulaire. Dans cette section, une revue de littérature sera faite afin de dresser le portrait le plus complet possible des concentrations d'hormones détectées et quantifiées.

#### 1.3.5.1 Présence dans l'eau du robinet

L'eau du robinet est une matrice dite « propre » puisque destinée à la consommation humaine. Cette eau traitée par les stations de traitement de l'eau potable est par la suite envoyée dans le circuit de distribution et est employée à diverses fins domestiques. Les probabilités d'y retrouver des hormones ou d'autres perturbateurs sont relativement faibles bien qu'il soit possible d'en retrouver certaines traces. Il n'est pas pertinent d'affirmer que ces substances ne sont pas présentes car cela dépend des limites de quantification et de détection des méthodes instrumentales employées mais leurs concentrations restent très basses. Une étude de Torres et al. a montré qu'au seuil de détection de leur méthode (0,3 – 0,7 ng L<sup>-1</sup>) les HS telles que E1, E2, E3, EE2, PROG et TESTO n'étaient pas détectées [183]. Des niveaux d'œstrogènes très faibles ont également été détectés à d'autres endroits du globe. Une étude a rapporté des concentrations maximales de 1,7 ng L<sup>-1</sup> en E1 et de 0,1 ng L<sup>-1</sup> en E2 dans l'eau potable de Chine avec une concentration moyenne de 0,4 et 0,05 ng L<sup>-1</sup> respectivement [118]. Les valeurs retrouvées pour ces mêmes composés aux États-Unis étaient inférieures à 0,5 ng L<sup>-1</sup>, tandis que des valeurs allant jusqu'à 0,6 ng L<sup>-1</sup> pour E1 et jusqu'à 2,1 ng L<sup>-1</sup> pour E2 ont été recensées en Allemagne [184,185]. Bien que ces concentrations soient faibles et que l'étude ne soit que partielle, un impact potentiel des HS sur la santé humaine n'est pas à écarter. De ce fait il est important de développer des méthodes analytiques efficaces, sélectives et sensibles.

### 1.3.5.2 Présence dans l'eau de surface

L'eau de surface fait partie des matrices aquatiques environnementales dans laquelle on retrouve une multitude de composés dont font partie les HS. Les eaux de surface, qu'il s'agisse d'un lac, d'une rivière, d'un fleuve ou d'un réservoir, sont des masses d'eau en contact avec l'activité humaine du fait des effluents de tous types. Il est donc important de pouvoir y quantifier les contaminants émergents de manière à évaluer les risques pour les espèces présentes. La plupart des études portées sur l'analyse des différentes classes d'HS se rejoignent sur les niveaux de concentrations observées. En effet, les concentrations d'œstrogènes ne dépassent que dans de très rares cas des concentrations de 10 ng L<sup>-1</sup>. Ces niveaux semblent relativement bas mais il est de bon aloi de rappeler que des concentrations aussi faibles que 0,5-1,0 ng L<sup>-1</sup> peuvent provoquer des effets sur les espèces animales présentes dans les milieux aquatiques [186,187]. Les concentrations totales sont bien entendu au-delà de ces faibles valeurs et leurs potentiels effets synergiques ne doivent pas être écartés. Les concentrations d'androgènes et de progestatifs ne diffèrent que très rarement de ces observations. Pour ce qui est des hormones de synthèse, il est intéressant d'observer que leurs niveaux ne sont pas plus élevés que ceux des hormones naturelles. D'après les schémas de dégradation évoqués précédemment, il est fort probable que ces dernières se dégradent en d'autres hormones telles que E1 ou E2. Un bilan similaire peut être dressé pour le BPA dans la mesure où les concentrations retrouvées dépassent rarement les 20 ng L<sup>-1</sup>.

**Tableau 1-5.** Concentrations relevées dans les eaux de surface

Classes	Composés	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Site et pays	Référence
<i>Estrogènes</i>	E1	ND – 3,4	Rhin et Meuse, Pays Bas	[188]
		3,4 – 6,6	Lac Kasumigaura, Japon	[189]
		5,0 – 12,0	Tibre, Italie	[190]
		1,4 – 12,9	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
		0,2 – 0,8	Tamise, Angleterre	[192]
		30,0 – 51,2	Lacs et rivières, divers pays	[193]
	α-E2	ND	Grands Lacs, Canada	[194]

β-E2	ND – 5,5	Grands Lacs, Canada	[188]
	0,6 – 1,0	Lac Kasumigaura, Japon	[189]
	2,0 – 6,0	Tibre, Italie	[190]
	ND – 8,8	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
	ND – 7,1	Tamise, Angleterre	[192]
E3	2,0 – 5,0	Tibre, Italie	[190]
	ND – 3,3	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
	ND – 3,1	Tamise, Angleterre	[192]
	ND – 1,7	Prague, République Tchèque	[195]
	ND – 51	États-Unis	[196]
EE2	0,01 – 2,00	Hamadan, Iran	[197]
	11,7 – 14,0	Buyukcekmece, Turquie	[198]
	ND – 25,00	Rio de Janeiro, Brésil	[199]
	ND – 0,70	Rivière Würm, Allemagne	[200]
	ND – 5,98	Rivière Jiulong, Chine	[201]
EQUI	0,22 – 2,7	Hokkaido, Japon	[202]
	ND	Rivière Ibaizabal, Espagne	[203]
	1,9 – 5,5	Miami River, États-Unis	[204]
EQUIL	0,65 – 1,2	Hokkaido, Japon	[202]
	ND	Rivière Ibaizabal, Espagne	[203]

---

<i>Progestatifs</i>	LEVO	5,3 – 7,0	Rhône-Alpes, France	[205]
		3 – 6	Rhône-Alpes, France	[206]
		38	Rivière Langat, Malaisie	[207]
NOR	1		Rivières Tonghui et Qing, Chine	[208]
		2	Rhône-Alpes, France	[206]
		ND	Bobai, Chine	[209]
PROG	2060	1,4 – 4,2	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
			Fenholloway River, États-Unis	[210]
		0,06 – 0,09	Rivière Koyama, Japon	[211]
		ND – 119	États-Unis	[196]

		0,4 – 11	Rhône-Alpes, France	[206]
		1,2 – 2,5	Réservoir Liuxi, Chine	[212]
	MPROG	ND	Rivière Blanice, République Tchèque	[213]
		ND – 1,0	Lacs et rivières, divers pays	[193]
	ALTRE	ND	Rivière Blanice, République Tchèque	[213]
<hr/>				
<i>Androgènes</i>	ANDRO	ND – 21	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
		0,28 – 0,46	Rivière Koyama, Japon	[211]
		40	Fenholloway River, États-Unis	[210]
		0,1 – 6,4	Osaka, Japon	[214]
	TESTO	ND – 1,8	Elkhorn River, Nebraska, États-Unis	[191]
		ND – 214	USA	[196]
		0,4 – 5,6	Jourdain, Israël	[215]
<hr/>				
<i>Bisphénols</i>	BPA	6,5 – 21	Japon, Chine, Corée et Inde	[216]
		ND – 7,6	Rivière Langat, Malaisie	[122]

### 1.3.5.3 Présence dans les eaux usées

Les eaux de surfaces sont chargées en contaminants provenant de plusieurs sources. L'une d'entre-elles sont les rejets des stations d'épurations. Il est donc pertinent de porter l'attention sur l'eau en provenance des systèmes d'eaux usées qui arrive dans ces stations. Cette matrice est particulièrement chargée en perturbateurs endocriniens puisque qu'elle est constituée essentiellement de l'eau évacuée des habitations et autres structures urbaines et rurales. Les niveaux d'œstrogènes que l'on y retrouve sont très variables. Tabak et al. ont rapporté des niveaux de E1 pouvant rester sous la barre des 100 ng L<sup>-1</sup> tandis que d'autres telles que l'étude de Clara et al. ont montré qu'ils peuvent atteindre des valeurs de plusieurs centaines de ng L<sup>-1</sup> [217,218]. De telles variations peuvent provenir des habitudes de vie, du nombre d'habitants, du climat et de tout autre facteur environnemental pouvant influencer sur ces concentrations. Le profil de concentration reste similaire pour ce qui est des autres œstrogènes usuels naturels (β-E2 et E3). Dans le cas des œstrogènes moins usités (α-E2,

EQUI et EQUIL), les niveaux restent très en dessous des 100 ng L<sup>-1</sup>. En ce qui concerne l'EE2, cette hormone de synthèse présente des niveaux similaires quoiqu'ils soient légèrement inférieurs. Beaucoup de paramètres peuvent influencer ces concentrations mais d'après les différentes voies de dégradations, il est probable que cette molécule se dégrade en d'autres substances durant son parcours. Les niveaux d'androgènes et de progestatifs naturels ou synthétiques détectés dans bon nombre d'études dépassent les 100 ng L<sup>-1</sup>. On remarque également une grande variabilité des concentrations détectées allant d'une valeur non détectable à un maximum de 284 ng L<sup>-1</sup> dans une étude de Zhang et al. [219]. Enfin, les niveaux de BPA retrouvés sont bien plus élevés que les niveaux d'HS puisqu'ils dépassent allègrement le millier de ng L<sup>-1</sup>. Une fois que ces eaux usées arrivent dans les stations d'épuration, elles y sont traitées. Cependant, tel que discuté précédemment, les traitements appliqués ne sont pas totalement efficaces et les effluents restent contaminés en HS et BPA.

**Tableau 1-6.** Concentrations relevées dans les affluents de stations d'épuration.

Classes	Composés	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Site et pays	Référence
<i>Estrogènes</i>	E1	259 – 326	Japon	[220]
		25 – 132	Rome, Italie	[221]
		44	Rome, Italie	[222]
		29 – 670	Autriche	[218]
		ND – 70	Chine	[217]
		57,8 – 83,3	Pennsylvanie, États-Unis	[223]
		19 – 78	Canada	[224]
		15 – 60	Tibre, Italie	[190]
		ND – 33	Canada	[225]
		α-E2	ND – 15	Pays-Bas
	β-E2	ND – 57	Japon	[220]
		4 – 25	Rome, Italie	[221]
		11	Rome, Italie	[222]
		35 – 125	Autriche	[218]

	ND – 20	Chine	[217]
	11,2 – 161,6	Pennsylvanie, États-Unis	[223]
	2,4 – 26	Canada	[224]
	10 – 31	Tibre, Italie	[190]
	ND – 11	Canada	[225]
E3	ND	Japon	[220]
	24 – 188	Rome, Italie	[221]
	72	Rome, Italie	[222]
	23 – 660	Autriche	[218]
	10 – 200	Chine	[217]
	79,7 – 259,2	Pennsylvanie, États-Unis	[223]
	23 – 48	Tibre, Italie	[190]
	ND – 22	Canada	[225]
EE2	9,6 – 17,3	Pretoria, Afrique du Sud	[227]
	155	Beijing, Chine	[228]
	47,0 – 180,0	Séville, Espagne	[229]
	30,0	Pietermaritzburg, Afrique du Sud	[230]
	3 – 70	Autriche	[218]
EQUI	ND	Royaume-Uni	[231]
	14	Bakio et Galindo, Espagne	[232]
EQUIL	1,88 – 2,40	Royaume-Uni	[231]
	ND	Bakio et Galindo, Espagne	[232]

---

<i>Progestatifs</i>	LEVO	ND – 16	Rhône-Alpes, France	[205]
		41,3 – 89,6	Gdansk, Pologne	[233]
	NOR	224	Rhône-Alpes, France	[234]
		3,07 – 3,59	Shanghai, Chine	[235]
	PROG	ND – 20	Chine	[217]
		ND – 14	Japon	[236]
		3,1 – 10	Saitama, Japon	[237]

		9,0 – 20,0	Turquie	[238]
		5 – 100	Belgique	[239]
		5,8 – 6,4	Lacs et rivières, divers pays	[193]
	MPROG	ND – 16,85	Divers pays	[240]
	ALTRE	0,35	République Tchèque	[213]
<hr/>				
<i>Androgènes</i>	ANDRO	21 – 100	Japon	[236]
		69 – 164	Japon	[211]
		1,54 – 267,1	Chine	[241]
		6,21 – 284	Province de Guangdong, Chine	[219]
		53,6 – 56,2	Lacs et rivières, divers pays	[193]
	TESTO	ND – 30	Chine	[217]
		ND – 95	Canada	[225]
		19,4 – 75,2	États-Unis	[242]
		ND - 11	Japon	[236]
		7,9 – 15	Japon	[211]
		2,08 – 262,3	Chine	[241]
		ND – 29,7	Province de Guangdong, Chine	[219]
		13,1 – 13,5	Lacs et rivières, multiples pays	[193]
<hr/>				
<i>Bisphénols</i>	BPA	160	Grèce	[243]
		55,6 – 5850	Xiamen, Chine	[244]
		595 – 2469	Inde	[245]
		ND – 2376	Autriche	[218]
<hr/>				

Les affluents d'eaux usées sont chargées en contaminants et vont être traités en tout ou en partie au sein des stations d'épuration dépendamment des traitements appliqués. Globalement, les niveaux détectés dans les eaux usées traitées (effluents) sont bien inférieurs à ceux des affluents mais il est intéressant d'en évaluer l'importance. Les niveaux d'œstrogènes que l'on y retrouve sont également variables. Certaines études ont rapporté des niveaux de E1 allant de quelque ng L<sup>-1</sup> à des valeurs supérieures à 100 ng L<sup>-1</sup>. De telles variations peuvent provenir de plusieurs facteurs environnementaux mais également des concentrations de départ, du taux d'abattement et par extension de l'efficacité du traitement. Le profil de concentration diffère légèrement pour les autres œstrogènes courants naturels puisque les niveaux de β-E2 restent relativement faibles tandis qu'une valeur proche de 300 ng L<sup>-1</sup> a été relevée pour E3. Dans le cas des œstrogènes moins courants à l'image de α-E2, EQUI ou EQUIL, les niveaux restent largement en deçà des 100 ng L<sup>-1</sup> voire en dessous des limites de détection. En ce qui concerne l'EE2, cette hormone de synthèse présente des niveaux ne dépassant pas les quelques unités (en ng L<sup>-1</sup>). Beaucoup de paramètres (activité microbienne au sein des bassins de traitement, température, exposition à la lumière, pH, etc.). Les niveaux d'androgènes et de progestatifs naturels ou synthétiques détectés reflètent ceux des œstrogènes dans la mesure où il est bien rare de constater que les concentrations dépassent les quelques dizaines de ng L<sup>-1</sup>. Seule une étude mentionnée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1-7.**) fait ressortir une valeur de 288 ng L<sup>-1</sup> pour la noréthindrone, ce qui est supérieur à la normale. On remarque à nouveau une grande disparité des concentrations détectées. Les niveaux de BPA retrouvés dans cette matrice sont encore une fois bien plus élevés que ceux des HS puisqu'ils peuvent dépasser le millier de ng L<sup>-1</sup>. À ce point de la discussion, il convient de rappeler que des niveaux aussi bas que quelques dixièmes de ng L<sup>-1</sup> peuvent engendrer des impacts considérables sur la faune aquatique. À la lumière de ces observations, il apparaît évident que des effets sur les organismes seront observables à proximité du point de rejet des stations d'épuration.

**Tableau 1-7.** Concentrations relevées dans les effluents de stations d'épuration.

Classes	Composés	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Site et pays	Référence
---------	----------	--	--------------	-----------



<i>Estrogènes</i>	E1	8,1 – 8,9	Lacs et rivières, divers pays	[193]
		2,5 – 8,2	Rome, Italie	[221]
		1 – 96	Canada	[224]
		8,6 – 22,4	Midlands, Royaume-Uni	[246]
		6,3 – 49,1	Pennsylvanie, États-Unis	[223]
		70,7 – 115,9	Pretoria, Afrique du Sud	[227]
	α-E2	ND	Pays-Bas	[226]
		3	Corée	[247]
		ND	Corée	[247]
	β-E2	0,35 – 3,5	Rome, Italie	[221]
		ND – 30	Autriche	[218]
		0,2 – 14,7	Canada	[224]
		0,9 – 3,9	Midlands, Royaume-Uni	[246]
		1,4	Wuxi, Chine	[248]
		0,8	Chine	[249]
	E3	0,43 – 18	Rome, Italie	[221]
		ND – 275	Autriche	[218]
		ND – 4,9	États-Unis	[242]
		2,9	Wuxi, Chine	[248]
		2,4	Chine	[249]
	EE2	ND – 1,7	Rome, Italie	[221]
		ND – 2,6	Pays-Bas	[226]
		ND – 5	Autriche	[218]
ND – 4,1		États-Unis	[242]	
EQUI	0,3 – 0,5	Midlands, Royaume-Uni	[246]	
	ND	Royaume-Uni	[231]	
EQUIL	18,0	Bakio et Galindo, Espagne	[232]	
	0,32 – 0,54	Royaume-Uni	[231]	
	ND	Rivière Ibaizabal, Espagne	[203]	
<i>Progestatifs</i>	LEVO	ND – 0,4	Espagne	[250]

		30	Québec, Canada	[251]
		17,9	Rhône-Alpes, France	[234]
	NOR	3,3 – 6,5	Beijing, China	[252]
		41	Rhône-Alpes, France	[234]
		188	Rivière Langat, Malaisie	[207]
	PROG	3 – 33	Belgique	[239]
		9 – 17	Lacs et rivières, divers pays	[193]
		0,8 – 2,3	Guangdong, China	[253]
		6	Beijing, China	[252]
		ND – 4,03	Divers pays	[240]
	MPROG	ND – 4,788	Divers pays	[240]
		15	États-Unis	[254]
		0,23	Rivière Blanice, République Tchèque	[213]
	ALTRE	0,15	Rivière Blanice, République Tchèque	[213]
<hr/>				
<i>Androgènes</i>	ANDRO	3,2 – 3,6	Lacs et rivières, divers pays	[193]
		5,1 – 5,3	Japon	[211]
		ND – 2,32	Chine	[255]
		1,0 – 3,5	Corée	[256]
	TESTO	ND – 1,68	Chine	[241]
		ND – 5,83	Divers pays	[240]
		ND – 3,57	Province de Guangdong, Chine	[219]
		ND – 20	Chine	[217]
		ND – 21	Canada	[225]
		ND – 26	Pietermaritzburg, Afrique du Sud	[230]
<hr/>				
<i>Bisphénols</i>	BPA	220	Grèce	[243]

ND – 123	Tokyo, Japon	[257]
2 – 450	Ontario, Canada	[258]
16 – 1840	Croatie, Serbie, Bosnie et Herzégovine	[259]

#### 1.3.5.4 Présence sur la phase particulaire dans l'eau

À notre connaissance, peu d'études se sont portées sur l'analyse des HS et du BPA dans la phase particulaire des eaux de surfaces et encore moins des eaux du robinet. Pour cette dernière, l'étude de molécules organiques telles que les HS est très difficile puisqu'il n'y a que très peu ou pas de phase particulaire et que les concentrations retrouvées dans la phase dissoute sont elles-mêmes très faibles. Pour détecter ces composés dans une telle matrice il est nécessaire de disposer d'une méthode analytique extrêmement sensible et d'un volume d'échantillon très élevé, ce qui n'est pas aisé. En ce qui concerne l'eau de surface, quelques études ont tenté de déterminer la concentration de HS dans la phase particulaire (*Suspended Particulate Matter*, SPM). Bien qu'elle ne soit pas exhaustive, la liste de HS présentée dans le tableau suivant (**Tableau 1-8.**) rend compte des concentrations susceptibles d'être déterminées dans la SPM de l'eau de surface. Les œstrogènes E1,  $\beta$ -E2, E3 et EE2 ont été détectés à des niveaux s'étalant de quelques  $\text{ng g}^{-1}$  à plus de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ . Les progestatifs LEVO, NOR, PROG et MPROG ont quant à eux été détectés à des niveaux s'étalant de quelques dizaines de  $\text{ng g}^{-1}$  à plus de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ . Enfin, le BPA a été détecté dans à des concentrations allant de 10 à  $760 \text{ ng g}^{-1}$  ce qui à nouveau, reflète une occurrence bien plus marquée pour ce composé possiblement due à son usage massif bien que son temps de demi-vie soit faible (2,5 – 5,0 jours) [260].

**Tableau 1-8.** Concentrations relevées dans la phase particulaire de l'eau de surface.

Classes	Composés	Concentration ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Site et pays	Référence
<u>Estrogènes</u>	E1	2 – 13	Estuaire du Yangtze, Chine	[261]

	$\beta$ -E2	134 - 164	Québec, Canada	[262]
	E3	5 – 12	Estuaire du Yangtze, Chine	[261]
	EE2	65 – 75	Québec, Canada	[262]
<hr/>				
<i>Progestatifs</i>	LEVO	24 – 32	Québec, Canada	[262]
	NOR	26 – 32	Québec, Canada	[262]
	PROG	82 – 112	Québec, Canada	[262]
	MPROG	ND	Québec, Canada	[262]
<hr/>				
<i>Bisphénols</i>	BPA	10 – 760	Lac Taihu, Chine	[263]
<hr/>				

#### 1.3.5.5 Normes et recommandations

La législation sur les hormones stéroïdiennes et en général sur les perturbateurs endocriniens dans l'environnement est assez limitée. En effet, aucun pays ou organisation n'a pour le moment défini des seuils à ne pas dépasser pour l'ensemble des hormones étudiées dans ces travaux. Cependant, il existe des valeurs pour certaines molécules qui pourraient servir de porte-étendards pour une législation plus large et plus exhaustive. Basée sur plusieurs études, la Colombie-Britannique a émis une recommandation en matière de présence de l'EE2 dans les eaux de surface. À la lumière des concentrations minimales d'impacts observés (LOEC) de 1 ng L<sup>-1</sup>, le gouvernement de cette province canadienne a établi que le niveau de cette hormone ne devrait pas dépasser les 0,5 ng L<sup>-1</sup> dans cette matrice. Autre entité de premier plan, l'Union Européenne a quant à elle établi des recommandations plus sévères puisque la limite pour EE2 dans les eaux de surface a été fixée à 0,035 ng L<sup>-1</sup> lors d'une proposition de la Commission Européenne en 2013. Au-delà de ces normes, aucune législation n'existe à ce jour pour les autres matrices aquatiques et environnementales mais aux vues des effets observés à de très faibles concentrations il serait important d'établir de telles recommandations et de parvenir à un consensus international.

# Chapitre 2 – Préparation des échantillons et analyse des hormones

## 2.1 Mise en contexte

Les hormones, qu'elles soient d'origine naturelle ou synthétique, forment une famille de molécules possédant des propriétés physicochimiques variables. Lorsque l'analyse s'effectue dans des matrices environnementales pouvant être complexes, la détection multi-résiduelle de ces composés au niveau ultra-trace peut s'avérer difficile. Pour parvenir à détecter des quantités aussi infimes, il devient alors indispensable de les extraire, de les purifier et de les analyser au moyen de techniques analytiques performantes.

De nombreuses techniques et méthodes analytiques permettent l'analyse des hormones dans les matrices aqueuses mais il est toujours indispensable de parfaire ces méthodes en les actualisant et en les perfectionnant. Afin de broser le portrait le plus fidèle possible des méthodes analytiques existantes, une revue de littérature a été réalisée en se basant sur un ensemble de 21 articles scientifiques publiés entre 2000 et 2020. Ces publications ont été sélectionnées, dans la mesure du possible, en fonction des analytes ciblés communs avec ceux étudiés dans notre étude. Les principaux paramètres liés au développement analytique pour les hormones (composés à l'étude, solvant d'extraction, technique d'extraction, rendement, matrices, volume d'échantillon, méthode chromatographique, détecteur, limites de détection et de quantification) sont résumés dans le **Tableau 2-1**. Cette revue de littérature a servi de support à la section suivante dans laquelle les techniques analytiques employées dans cette thèse ainsi que certaines autres largement répandues seront détaillées.

## 2.2 Échantillonnage et préservation des échantillons

Les propriétés physicochimiques des hormones et leur stabilité implique des conditions de stockage particulières que l'on doit optimiser dès l'échantillonnage. En effet, plusieurs études ont démontré que les hormones ne sont guère stables dans l'eau et qu'il est nécessaire d'amender la matrice dans laquelle elles se trouvent avec des composés permettant de limiter la prolifération bactérienne ou encore contrôler les conditions de pH. Labadie et Budzinski ont mis en avant cette instabilité en déterminant le temps de demi-vie de certaines hormones stéroïdiennes dans l'eau telles que PROG (8h), E3 (12 jours), E1 (87 heures) et E2 (69h) et la perte significative de signal qui peut en découler lors du stockage [264]. L'étude de Baronti et al. va également dans ce sens [265]. Le formaldéhyde utilisé permet d'inhiber la prolifération bactérienne dans des matrices chargées telles que l'eau de surface ou encore les eaux usées. L'acidification du milieu permet de bloquer l'activité biologique mais causes de lourds problèmes quant aux effets matrices dus à la coélution de cette dernière. La méthode qui a été utilisée dans ce projet de thèse est celle de l'US EPA. L'utilisation de la 2-mercaptopyridine-N-oxide (Omadine) fut privilégiée afin de limiter la prolifération bactérienne et ainsi stabiliser l'échantillon. L'ajout de ce composé était complété par celui du chlorure de sodium (NaCl). L'Omadine et ce sel étaient ajoutés lors de la prise d'échantillon directement dans la bouteille ambrée qui était destinée au stockage. Selon les directives de l'agence américaine, il était primordial de procéder à l'analyse dans une intervalle de 28 jours après l'échantillonnage à condition d'avoir pris soin de conserver le contenu de la bouteille à une température de 4°C [266].

Durant l'analyse de composés comme le BPA, des problèmes de contamination des blancs peuvent se révéler être un écueil important. En effet, ce dernier rentre dans la composition de nombreux plastiques utilisés dans la fabrication des instruments, des tubes et autres connections faisant partie de la chaîne analytique. Il n'est donc pas surprenant de le retrouver dans des concentrations non négligeables lors de l'analyse de blancs de procédure ou de blancs instrumentaux. L'évaluation de cette possible contamination est nécessaire afin d'orienter la marche à suivre : dans un cas où celle-ci n'est pas très élevée et reste peu variable, il est alors possible de retrancher la contribution du blanc à l'échantillon afin

d'éviter les faux positifs. Le cas échéant, il est important de suivre une procédure rigoureuse permettant de diminuer drastiquement la présence de BPA dans les blancs [267].

**Tableau 2-1.** Résumé de différentes techniques analytiques employées dans le cadre de l'analyse des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans les matrices aquatiques

Classes	Composés	Solvants d'extraction	Extraction	Séparation	Détecteurs	Matrices	Rendement (%)	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Référence
Œstrogènes	E1, E2, EE2, E3	DCM, MeOH (50:50; v/v)	Off-line SPE : Oasis HLB	HPLC C <sub>18</sub> : ACN et H <sub>2</sub> O	ESI-MS/MS (-)	Eau de surface, affluents, effluents	89 – 100	0,1 – 7,0	[190]
Œstrogènes	E1, α-E2, β-E2, EE2, E3	DCM puis MeOH	Off-line SPE : C <sub>18</sub> et NH <sub>2</sub> en série	HPLC C <sub>18</sub> : ACN et H <sub>2</sub> O	ESI-MS (-)	Eau de surface	81 – 101	0,28 – 1,23	[268]
Œstrogènes Progestatifs	E1, E2, EE2, E3 PROG, LEVO, NORE	ACN	Off-line SPE : C <sub>18</sub>	HPLC C <sub>18</sub> : ACN et H <sub>2</sub> O	ESI-MS (-)	Eau de surface, affluents, effluents	79 - 100	2 – 500	[269]
Œstrogènes Progestatifs	E1, E2, EE2, E3 PROG, LEVO	/	On-line SPE : Oasis HLB	HPLC C <sub>18</sub> : ACN et H <sub>2</sub> O	DAD (200, 225, 240 nm)	Eau potable, eau de surface, effluents	90 – 101	10 – 20	[270]
Œstrogènes Progestatifs	E1, E2, EE2, E3 PROG, NOR	MeOH	Off-line SPE : Oasis HLB	GC : HP5-MS	qMS	Eau de surface, effluents	71 – 109	0,3 – 8,0	[264]
Œstrogènes	E1, α-E2, β-E2, EE2, E3	/	On-line SPE : C <sub>18</sub>	HPLC C <sub>18</sub> : ACN, MeOH et H <sub>2</sub> O	ESI-MS/MS (-)	Eau de surface, effluents	71 – 95	0.15 – 0.95	[271]



<b>Œstrogènes (bisphénols)</b>	BPA, E1, $\alpha$ -E2, $\beta$ -E2, EE2, E3	EtOAc	Off-line SPE : Oasis HLB	HPLC C <sub>18</sub> : H <sub>2</sub> O-MeOH (A), ACN-MeOH- H <sub>2</sub> O (B)	ESI-MS/MS (-)	Eau de surface	70 – 102	0,8 – 2,4	[272]
<b>Œstrogènes</b>	E1, $\beta$ -E2, EE2, E3	MeOH et MeOH; 2% AF v/v	Off-line SPE : Oasis WCX	HPLC Acquity BEH C <sub>18</sub> : CAN/MeOH; 90:10 v/v (A), H <sub>2</sub> O (B)	ESI-MS/MS- QqLIT (-)	Affluents et effluents	70 – 90	0,02 – 10	[273]
<b>Progestatifs</b>	PROG								
<b>Androgènes</b>	TESTO								
<b>Œstrogènes</b>	E1, $\alpha$ -E2, $\beta$ -E2, EE2, E3	MeOH	Off-line SPE : Oasis HLB	GC : HP5-MS	GC-MS/MS	Eau potable, eau de surface et effluents	89 – 106	0,7 – 7,5	[274]
<b>Progestatifs</b>	LEVO								
<b>Androgènes</b>	TESTO, ANDRO								
<b>Œstrogènes</b>	E1, $\alpha$ -E2, $\beta$ -E2, EE2, E3	MeOH/ACN, 50:50 v/v	SBSE	LDTD	APCI-MS/MS (+/-)	Eau potable, affluents	60 – 96	0,1 x 10 <sup>3</sup> – 480 x 10 <sup>3</sup>	[275]
<b>Progestatifs</b>	LEVO, PROG, MPROG, NOR								
<b>Œstrogènes</b>	EE2			HPLC : ZORBAX SB- C18 : H <sub>2</sub> O, 0,1% HFBA (A), ACN/MeOH 66:34, v/v (B) + 10,0 mM d'acétate d'ammonium dans A et B	ESI-MS/MS (+)	Eau de surface, effluents	59 – 87	4 – 162	[207]
<b>Progestatifs</b>	LEVO, NOR	MTBE/MEOH, 90 :10 v/v	Off-line SPE : Oasis MCX						

<b>Œstrogènes</b>	E1, β-E2, EE2, E3							18,2 x 10 <sup>3</sup>	
<b>Progestatifs</b>	PROG	MeOH	MIPs	HPLC : SG-CHOLIC : MeOH/H <sub>2</sub> O 53:47 v/v	DAD	Eau potable	92 – 105	– 89,8 x 10 <sup>3</sup>	[276]
<b>Androgènes</b>	TESTO								
HPLC									
<b>Progestatifs</b>	LEVO, PROG	MeOH	Off-line SPE : Strata C18-E	C <sub>18</sub> : H <sub>2</sub> O + AF 0,01 % v/v (A); ACN + AF 0,01 % v/v (B)	ESI-MS/MS (+)	Eau de surface	81 – 95	0,003 – 0,01	[277]
<b>Œstrogènes</b>	E1, β-E2, EE2, E3	MeOH	Off-line SPE : Oasis HLB	GC : Rtx-5	qMS	Eau de surface, effluents	58,2 – 106,8	3,4 – 8,7	[278]
<b>Œstrogènes (+ bisphénols)</b>	E1, β-E2, EE2, BPA	DCM/MeOH 50:50 v/v	Off-line SPE : Oasis HLB	GC : TR-5MS	qMS	Eau de surface	n.d	2,4 – 4,4	[279]
<b>Œstrogènes</b>	E1, α-E2, β-E2, EE2, E3								
HPLC									
<b>Progestatifs</b>	PROG, NOR, MPROG, LEVO	MeOH	Off-line SPE : Oasis HLB	Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub> : H <sub>2</sub> O + AF 3,3 mM (A); ACN (B)	ESI-MS/MS (+)	Eau potable, eau de surface	81 – 105	0,02 – 1,60	[280]
<b>Androgènes</b>	ANDRO, TESTO								

**Tableau 2-2.** Résumé des différentes techniques analytiques employées dans le cadre de l'analyse des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase particulaire

Classes	Composés	Solvants d'extraction	Extraction	Séparation	Détecteurs	Matrices	Rendement (%)	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	Référence
<b>Phtalates</b>	BPA	Acétone	Off-line SPE : RP- C <sub>18</sub>	HPLC C <sub>18</sub> : HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> dans H <sub>2</sub> O et HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> dans ACN/MeOH (1 :1)	MS/MS	SPM dans l'eau de surface	84	20	[281]
<b>Œstrogènes et phtalates</b>	E1, β-E2, EE2, E3, BPA	MeOH	extracteur assisté par solvant (ASE)	GC : DB5-MS	qMS	SPM Sédiments (dans l'eau de surface)	/	0,15 – 0,44 0,93 – 3,15	[282]
<b>Phtalates</b>	BPA	hexane-chlorométhane (1 :4 v/v)	Ultrasons	HPLC C <sub>18</sub> : et NH <sub>4</sub> OH et ACN	ESI-MS/MS (-)	SPM dans l'eau de surface	68 - 80	0.2	[283]
<b>Œstrogènes</b>	E1, E2, EE2	dichlorométhane	Ultrasons	HPLC C <sub>18</sub> : ACN et H <sub>2</sub> O	UV	sédiments dans l'eau de surface	42 – 80	40 – 100 μg g <sup>-1</sup>	[284]
<b>Œstrogènes</b> <b>Progestatifs</b>	E1, E2, EE2, E3 PROG, MPROG, NOR, LEVO, TESTO	MeOH/Acétone (3:1 v/v)	Ultrasons suivis d'un nettoyage sur cartouche STRATA C18-E SPE	/	LDTD-APCI-MS/MS	sédiments dans l'eau de surface SPM dans les affluents et effluents d'eaux usées	73 – 111	23 – 44	[285]

## 2.3 Un large panel de méthodes d'extraction

Dans tout processus analytique, le traitement de l'échantillon prend une part importante puisqu'il représente à lui seul environ 60% pour du temps nécessaire depuis le traitement de l'échantillon jusqu'au traitement de données. Il existe une très grande variété de méthodes d'extraction possédant chacune des qualités indéniables et des limites [286]. Les méthodes de traitement de l'échantillon développées récemment aspirent à diminuer les coûts, le temps de traitement et à être automatisées. De plus, la considération de l'aspect environnemental conduit à l'élaboration de procédés consommant moins de solvants et générant un minimum de déchets. Dans le cadre de l'analyse de contaminants environnementaux à l'état de trace telles que les hormones, des méthodes faciles d'usage et adaptées aux petits volumes d'échantillons gagnent en popularité, mais restent contraintes par le défi analytique de performance pour des exigences de limites de détection très sensibles.

### 2.3.1 Extraction basée sur des méthodes instrumentales

Un grand nombre de techniques d'extraction sont disponibles pour l'analyse des hormones présentes dans les échantillons solides tels que les sédiments ou encore la phase particulaire (*SPM*). On distingue deux catégories : les techniques manuelles à l'image du Soxhlet ou de l'extraction solide-liquide et les techniques instrumentales. Dans cette dernière on retrouve plusieurs techniques comme l'extraction liquide-liquide en continue (*continuous liquid-liquid extraction, CLLE*) l'extraction par liquide pressurisé (*pressurized liquid extraction, PLE*) également appelée extraction accélérée par solvant (*accelerated solvent extraction, ASE*), ou encore l'extraction assistée par micro-ondes (*microwave assisted extraction, MAE*).

La première technique instrumentale détaillée ici est la PLE ou ASE. Il s'agit d'une technique d'extraction récente qui permet l'extraction d'une large gamme de composés dans de nombreuses matrices. Elle se base sur des températures supérieures au point d'ébullition des solvants utilisés à des pressions élevées. Dans ces conditions, la viscosité et la tension de surface du solvant vont être diminuées et vont ainsi permettre une meilleure

pénétration du solvant dans la matrice. De plus, effectuer une extraction dans de telles conditions a pour conséquence d'augmenter la solubilité des analytes dans le solvant. En revanche, si cette propriété est bénéfique pour extraire les composés d'intérêts, elle conduit également à l'extraction de certains co-constituants présents dans la matrice. Une étape de purification subséquente pourra ainsi s'avérer indispensable afin de diminuer les effets matrice potentiels. Enfin, l'utilisation de cette technique repose sur l'analyse de molécules thermostables puisqu'il ne faut pas les dégrader lors de l'extraction. C'est une technique éprouvée pour l'analyse des hormones dans les sédiments et la phase particulaire [261,281,287–289].

Autre technique d'extraction des composés organiques présents dans les matrices environnementales : l'extraction assistée par micro-ondes (MAE). Elle repose sur le chauffage de l'échantillon à une température légèrement plus élevée que la température d'ébullition du solvant par l'emploi de micro-ondes. Ces dernières vont alors avoir un impact sur la conduction ionique et la rotation dipolaire des molécules. De ce fait, la solubilité des analytes dans le solvant en sera accrue avec, en général, un rendement d'extraction supérieur. Il est important de choisir pour cette technique un solvant adéquat possédant un facteur de dissipation et une constante diélectrique élevée mais surtout de s'assurer que les analytes ne sont pas thermosensibles au risque de les dégrader [290]. La MAE est d'ailleurs largement utilisée pour l'extraction des hormones dans les matrices solides environnementales [291–293].

### **2.3.2 Extraction par ultrasons**

La préparation de l'échantillon est une étape primordiale du processus analytique. L'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction Soxhlet en sont les représentants classiques encore utilisés pour la préconcentration et la purification des échantillons environnementaux. Cependant, ces techniques nécessitent de longs temps de préparation des échantillons et de grandes quantités de solvants organiques et de verrerie. L'extraction assistée par ultrasons (*ultrasound assisted extraction, UAE*) s'est développée afin de remédier en partie à ces problèmes [294–296]. Lorsqu'il est transmis à travers un milieu, le rayonnement ultra-sonore génère une perturbation qui, si elle est répétée périodiquement,

créée des cycles d'expansion et de compression. Lorsque l'intensité des ultrasons est suffisamment élevée (20 – 60 kHz), des bulles ou des cavités sont créées pendant le cycle d'expansion et vont pénétrer dans l'espace interstitiel de la matrice. La cavitation est le processus par lequel les bulles se forment puis subissent un effondrement implosif permettant de dissoudre l'analyte dans le solvant d'extraction [297].

La technique d'extraction solide-liquide la plus simple consiste à soniquer des échantillons solides avec un solvant organique approprié. L'effet mécanique des ultrasons induit une plus grande pénétration du solvant dans les matrices solides et une érosion mécanique des solides, y compris la rupture des particules, ce qui améliore le transfert de masse, conduisant à une efficacité d'extraction des échantillons améliorée. La sonication assure un contact efficace entre le solide et l'agent d'extraction, ce qui se traduit généralement par des pourcentages de récupération élevés [298]. Le processus est réalisé le plus souvent en utilisant un bain à ultrasons permettant l'extraction de plusieurs échantillons en même temps de manière simple et économique sans utiliser de quantité importante de solvant. Les hormones étant des composés moyennement hydrophobes ou polaires, les solvants organiques sont souvent utilisés pour les extraire afin de les décrocher de la phase solide de l'échantillon et ici dans la phase particulaire. De plus, il est indispensable de s'assurer qu'aucune trace d'eau n'est présente dans l'échantillon puisque la présence d'eau peut affecter l'efficacité de l'extraction et par conséquent le rendement de l'extraction.

Il est également possible voire souhaitable de répéter plusieurs cycles d'extraction afin de maximiser la récupération des composés. En effet, ces extractions étant soumises à des équilibres entre deux phases, il est possible de déplacer ce dernier en récoltant une première fraction d'extraction et de poursuivre avec 1 ou 2 autres cycles afin de récupérer les portions restantes de composé d'intérêt [292].

### **2.3.3 Extraction sur phase solide**

Une multitude de méthodes d'extraction sont disponibles pour effectuer l'analyse des hormones. Outre la phase stationnaire polymérique qui sera détaillée ci-après, d'autres

phases basées sur différents types d'interactions sont disponibles. Il est possible d'effectuer cette étape au moyen d'une phase stationnaire greffée avec des anticorps spécifiques immobilisés sur cette dernière [299]. Il est possible d'atteindre de très bons rendements et LOD bien que la spécificité des anticorps puisse être un inconvénient du fait du nombre restreint d'analytes pouvant être convenablement extraits avec un seul type d'immunoabsorbant [300]. Un autre obstacle notoire à l'usage de cette technique est la difficulté à l'utiliser en routine. En effet, le temps d'attente entre chaque utilisation de cartouche (environ 24 heures) peut être problématique pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Le principal inconvénient des adsorbants SPE dits conventionnels est leur manque de sélectivité résultant de la co-extraction des interférents présents dans la matrice, ce qui peut affecter le rendement d'extraction ainsi que la quantification. Comparativement à la SPE classique, une meilleure sélectivité peut être obtenue en utilisant des adsorbants à base de polymères à empreinte moléculaire (*molecular imprinted polymers, MIP*). Ce type d'adsorbant repose sur des matériaux synthétiques possédant un réseau tridimensionnel généré artificiellement qui est capable de se lier spécifiquement à un analyte cible, ou une classe de composés structurellement apparentés. Les MIPs présentent de multiples avantages tels qu'une très bonne sélectivité et d'une très grande rentabilité. De plus, ils ne sont pas sensibles aux conditions de stockage et aux différents solvants organiques. Leur usage dans le processus d'extraction ou d'élimination des perturbateurs endocriniens s'est donc développé au cours des dernières années [301,302]. Tout comme l'extraction sur phase solide ou encore la micro-extraction sur phase solide (*solid phase micro extraction, SPME*), l'extraction par sorption sur barreau magnétique (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) repose sur la sorption et la désorption de l'analyse sur une phase stationnaire. Pour se faire, le barreau aimanté est recouvert d'un polymère, en général du PDMS (polydiméthylsiloxane), permettant d'adsorber le ou les analytes d'intérêt. Basée essentiellement sur le coefficient de partage octanol-eau ( $\log P$ ), c'est la valeur de ce dernier ainsi que le rapport entre le volume de polymère et la matrice qui va régir l'extraction. En ce qui concerne la désorption, elle peut être réalisée de façon thermique ou bien de façon liquide par un solvant organique (acétonitrile, méthanol, etc.). La désorption liquide est par ailleurs optimale pour des composés ayant une polarité moyenne tels que les hormones [303–305].

### **2.3.4 Méthodes d'extraction d'échantillons en phase dissoute, particulaire et solide**

L'ensemble des méthodes d'extraction mentionnées dans les précédentes sections permet d'analyser les contaminants environnementaux dans une multitude de matrices aquatiques et biologiques. Cependant, il est important de mentionner que leur usage est spécifique à un type de matrice. En effet, les méthodes d'extraction instrumentales (ASE, MAE, UAE, etc) sont en général toutes indiquées pour les matrices solides, leur objectif principal étant d'extraire les analytes du solide et de les faire migrer dans le solvant d'extraction choisis en fonction des propriétés physicochimiques des analytes. En ce qui concerne les matrices liquides telles que l'eau du robinet, de surface et souterraine, il existe un large panel de méthodes d'extraction ayant toutes comme dénominateur commun, l'utilisation d'une phase stationnaire. On retrouve ici les SPE de tout type, les SBSE et bien d'autres techniques qui n'ont pas été abordées dans cet ouvrage [286]. La matière particulaire en suspension se situe à mi-chemin entre les deux catégories de techniques d'extraction dans la mesure où cette matrice peut être considérée comme analogue aux matrices solides comme les sédiments ou les boues ou bien considérée comme une matrice liquide à l'image de la phase dissoute des eaux de surface et usées [281,283]. L'étendue des méthodes disponibles sur le marché rend l'analyse d'un grand nombre de contaminants environnementaux possible et bien plus aisée qu'elle n'a pu l'être jadis.

## **2.4 Méthodes détaillées de préparation des échantillons**

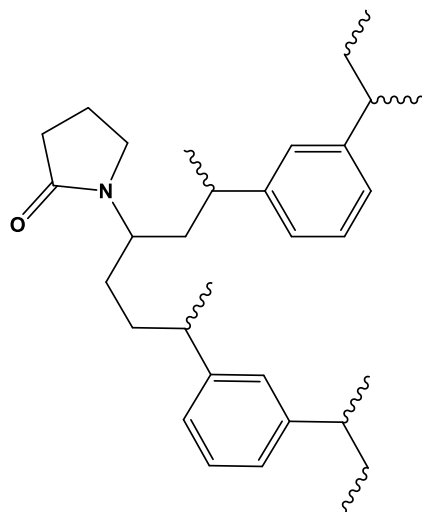
### **2.4.1 Extraction sur phase solide hors-ligne (off-line SPE)**

#### **2.4.1.1 Caractéristiques techniques et instrumentation**

Pour extraire les analytes des échantillons liquides, il est toujours possible d'effectuer une extraction liquide-liquide (*liquid-liquid extraction, LLE*). Bien qu'efficace, cette technique fut progressivement remplacée par une méthode bien plus efficace, rapide et reproductible : l'extraction sur phase solide. L'extraction sur phase solide (*solid phase*

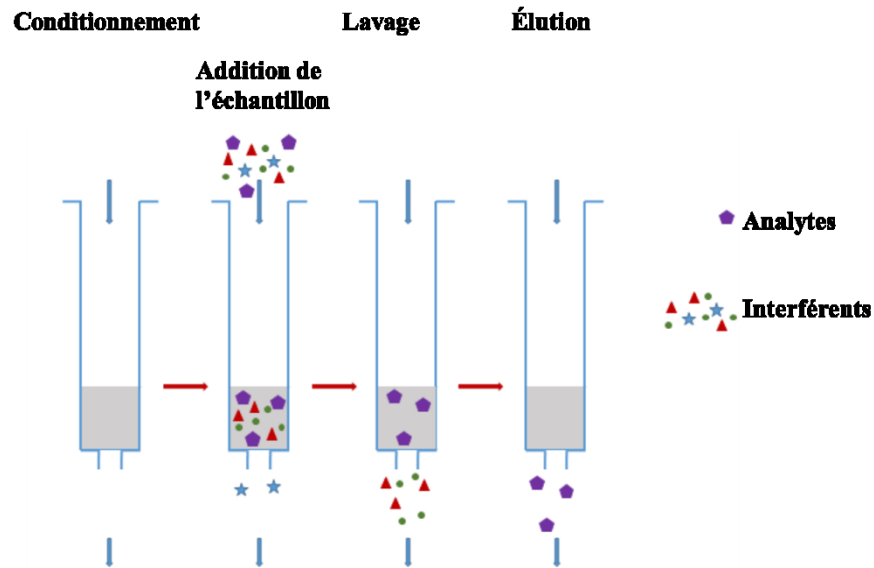


*extraction, SPE*) est une étape importante du processus de traitement de l'échantillon. Elle permet non seulement de concentrer les composés ciblés, mais également de purifier la matrice avant l'analyse instrumentale. L'extrait utilisé peut être obtenu après l'étape d'extraction d'un solide ou bien à partir d'un échantillon liquide filtré. Ce dernier est percolé à travers une cartouche constituée d'une phase stationnaire (en général 100-500 mg) dont les propriétés physicochimiques lui permettent de former des liaisons avec les analytes étudiés. Il existe une multitude de phases stationnaires disponibles sur le marché (adsorption ou phase normale, phase inverse ou échange d'ions). Plusieurs types de phases stationnaires sont utilisés pour retenir les hormones sur la cartouche bien qu'en règle générale ce sont les cartouches polymériques possédant une partie hydrophile et une partie lipophile pour la rétention d'une large gamme de composés qui sont favorisées (p. ex., Dionex HRPHS, Thermo HyperSep Retain PEP, Waters Oasis HLB, Phenomenex Strata X, etc.). Elles permettent de retenir les composés analysés en favorisant les interactions intermoléculaires  $\pi$ - $\pi$  et hydrophiles. Par exemple, la cartouche SPE « Oasis HLB » de Waters est constituée d'une phase stationnaire sur laquelle on retrouve des chaînes alkyles et des noyaux benzéniques conférant un caractère hydrophobe non polaire à celles-ci ainsi que des groupements pyrrolidone qui quant à eux, favorisent les interactions avec les substances polaires hydrophiles (**Figure 2-1.**).



**Figure 2.1** Représentation de la phase stationnaire d'une cartouche SPE Oasis HLB mettant en lumière la balance entre les interactions hydrophobes (chaînes alkyles et noyaux benzéniques) et les interactions intermoléculaires hydrophiles (pyrrolidones)

En général, la SPE se déroule en cinq étapes à savoir le conditionnement, la percolation de l'échantillon sur la phase stationnaire, le lavage, le séchage et enfin l'élution (**Figure 2-2**).



**Figure 2.2** Schéma explicatif des différentes étapes nécessaires à la purification et l'extraction dans le cadre d'une extraction sur phase solide hors-ligne (SPE off-line). Les différentes étapes y sont représentées de la gauche vers la droite : conditionnement, percolation, lavage (puis séchage) et élution.

Lors de la première étape, le conditionnement de la cartouche est effectué en deux temps. Tout d'abord, les cartouches vont être rincées avec le solvant organique qui sera utilisé ultérieurement pour éluer les hormones ciblées (e.g., méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, acétone, etc.). Cette étape permettra notamment de nettoyer la cartouche et d'ouvrir les chaînes alkyles constituant la phase stationnaire. Le conditionnement des cartouches va ensuite se poursuivre avec un solvant semblable au milieu de l'échantillon à charger. Par exemple, si ce dernier est aqueux, il sera possible de rincer la cartouche avec de l'eau ultra-pure, de l'eau à pH modifié ou encore avec des tampons.

Ensuite, l'étape de chargement de l'échantillon aqueux (typiquement 100-1000 mL) va être réalisée à un débit adéquat garantissant une bonne interaction des hormones ciblées avec la phase stationnaire, un débit de chargement non optimal pouvant induire une perte d'analytes.

L'étape de lavage lui succédant, n'est pas indispensable bien qu'elle soit fortement recommandée afin de réduire la présence en sels dans des échantillons d'eau salée par exemple, ou en matière organique et autres interférents notamment dans les matrices chargées telles que les effluents de station de traitement des eaux usées. Durant cette étape, il est possible d'utiliser alors de l'eau ultra-pure, des mélanges eau - solvant organique ou encore des mélanges eau – soluté (ammoniacal, acide acétique, etc). L'avantage de cette étape étant d'éluer de manière sélective les interférents sans pour autant décrocher les composés d'intérêt de la phase stationnaire. Avant d'éluer les analytes, l'étape de séchage (étape non-représentée dans la figure précédente) est une autre étape importante puisque qu'elle permet d'enlever l'eau résiduelle présente dans la phase stationnaire et facilite ainsi l'efficacité des étapes subséquentes d'élution et d'évaporation.

Enfin, la dernière étape d'élution va permettre d'éluer les hormones de la phase stationnaire avec une sélectivité et une efficacité optimisée. De façon idéale, l'élution va permettre de décrocher les analytes tout en évitant d'éluer les interférents résiduels encore présents dans la matrice bien que ceci ne soit pas toujours possible. Cette étape est effectuée avec le même solvant utilisé lors du conditionnement soit le méthanol ou l'acétonitrile pour leur force éluante d'une part mais pour leur capacité de sélectivité analytes/interférents. Les cartouches SPE peuvent être utilisées dans un système de SPE manuelle (cuve SPE, *Manifold*) ou bien dans un système semi-automatisé (p. ex., Dionex Autotrace) ce qui permet d'atteindre des facteurs de pré-concentration élevés (jusqu'à plusieurs milliers; 4000 dans cette thèse), nécessaires pour l'analyse ultra-trace. La SPE hors-ligne est une technique de préconcentration efficace, sensible et réputée mais son caractère chronophage et fastidieux ainsi que le risque d'erreurs de manipulation de l'opérateur peuvent être autant de facteurs influençant le choix d'une autre méthode au détriment de cette dernière. Un système SPE automatisé en ligne connecté en amont de la colonne chromatographique peut être alors considéré. Il s'agit d'un système très utile et efficace dans le cadre de l'analyse de petits volumes d'échantillons environnementaux (0,5 à 20 mL), qui présente une bonne versatilité en termes de matrice et d'analytes.

#### 2.4.1.2 Extraction des échantillons d'eau HPLC et d'eau du robinet

La matrice joue un rôle important dans la détermination du protocole et paramètres à considérer. Dans les présents travaux, une optimisation importante a été réalisé quant à l'ajustement et l'adaptation de la méthode d'extraction dépendamment des différentes matrices. L'eau HPLC et l'eau du robinet sont des matrices propres et peu chargées en substances susceptibles d'interférer dans l'analyse. En ce qui concerne l'eau HPLC, cette dernière est dépourvue de matrice en tant que telle et présente des faibles niveaux d'alcalinité et d'acide ce qui évite les interférences avec l'échantillon. L'eau du robinet est en général une matrice que l'on qualifie de propre. Cependant, elle n'est pas exempte d'éléments susceptibles d'altérer les qualités de l'extraction et *a posteriori* du signal. Plusieurs études ont d'ailleurs évalué les concentrations en éléments et composés qui se retrouvent dans l'eau du robinet. De plus, le circuit de distribution de l'eau peut à lui seul être responsable de la présence de substances interférentes. Le pH, la conductivité de ces matrices sont sensibles à la présence des ions à l'image des sulfates, des nitrates ou des phosphates [306]. Une étape de filtration et un lavage efficace sont d'autant de points à considérer lors de l'optimisation de la méthode et c'est ce qui a été réalisé dans le cadre de cette thèse.

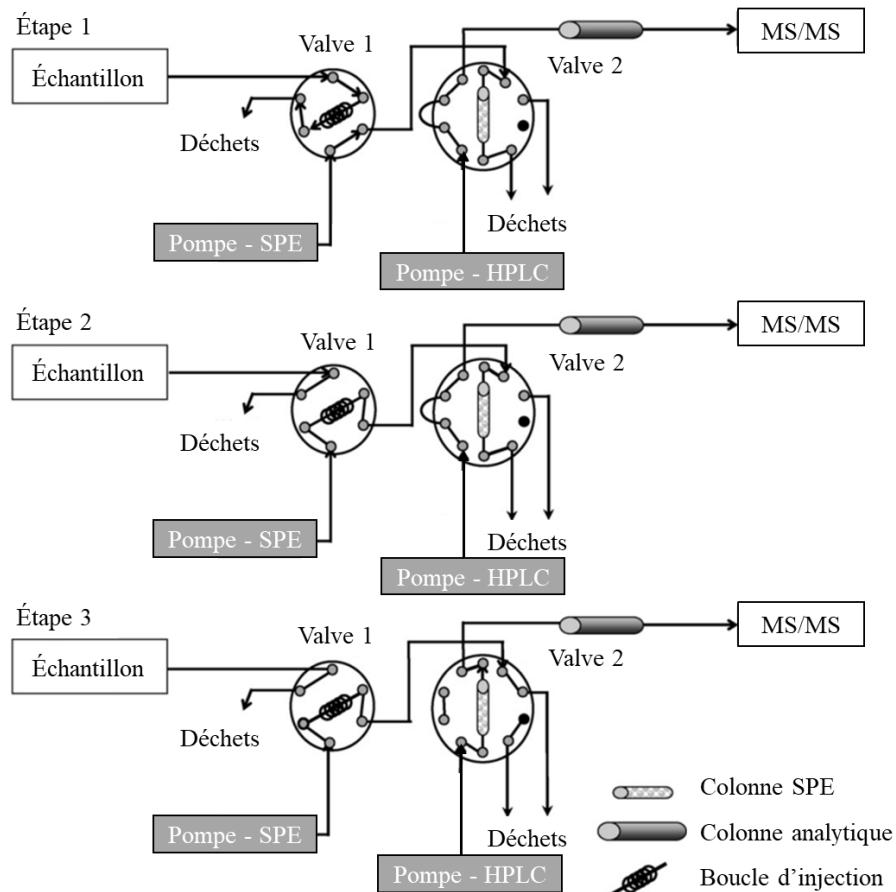
#### 2.4.1.3 Extraction des échantillons d'eau de surface et d'eaux usées

L'extraction de matrices plus chargées est bien souvent un point sensible dans l'optimisation de la méthode analytique. En effet, lorsque l'on analyse de l'eau de surface, il est indispensable de filtrer l'échantillon avant de procéder à l'étape d'extraction afin de limiter la contamination due aux substances présentes dans la matrice qui sont de nature diverse (particules, résidus biologiques, bactéries et dans une moindre mesure les molécules organiques, la matière humique, etc.). Lors de l'extraction, lors de l'étape de lavage, il est primordial d'employer le solvant, le mélange de solvants ou encore un mélange solvant-soluté capable de décrocher les interférents de la matrice sans pour autant décrocher les analytes d'intérêt. Dans bien des cas, un passage en milieu basique permet de réduire ce risque. Les matrices d'eau usée requièrent un soin particulier étant donné leur complexité. En effet, les quantités de contaminants peuvent être bien plus élevés que ceux

relevés dans l'eau de surface et il devient indispensable d'adapter la filtration et l'extraction en fonction de cela. Dans cette étude, des paramètres tels que le volume d'échantillon, le solvant de conditionnement, les conditions de pH de l'échantillon, ainsi que les conditions de lavage ont été optimisés pour ces deux matrices. De plus, une étape de lavage post-SPE a été ajoutée afin d'atteindre des limites de détection améliorées. Enfin, une étape de filtration post-reconstitution de l'échantillon a également été incorporée au protocole dans un but similaire.

#### **2.4.2 Extraction sur phase solide automatisée en ligne (on-line SPE)**

Si la SPE manuelle reste une technique très prisée pour ses nombreux avantages, à savoir des facteurs de préconcentration très élevés, une versatilité irréprochable et un panel de cartouches disponibles important, il est admis que celle-ci nécessite un temps considérable ce qui par extension allonge le temps total d'analyse. Même sa capacité à atteindre des concentrations très faibles de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  voire du  $\text{sub ng L}^{-1}$ , ne lui permet pas de rivaliser sur tous les points avec une méthode d'extraction analogue : l'extraction sur phase solide automatisée en ligne ou *on-line SPE* [271,307]. Une méthode de préconcentration par SPE automatisée en-ligne a ainsi été développée dans le cadre de cette thèse. Plusieurs avantages ont motivé ce choix tels que l'élimination de la nécessité de devoir travailler avec de grands volumes d'échantillon et la diminution du temps total de traitement et d'analyse pour chaque échantillon étudié. En ce qui concerne les étapes de SPE classique à savoir le conditionnement, la percolation, le lavage et l'élutions, ces étapes demeurent inchangées à la différence prêle qu'elles sont toutes automatisées et directement couplées à la LC-MS/MS pour ces travaux. Le système repose sur un ensemble de deux valves capables de permuter (la première valve de six voies, la seconde 10). Elles sont couplées à un auto-échantillonneur d'injection sur lequel il est possible d'installer une boucle d'injection de volume variable (0.5 à 20 mL) [308–311]. À la différence de la SPE manuelle qui implique l'utilisation de cartouches à usage unique, la SPE en ligne se distingue par l'utilisation de petites colonnes chromatographiques, en général réutilisables un grand nombre de fois (circa 100-500 injections), dépendamment du volume d'échantillon chargé et de la nature des matrices environnementales.



**Figure 2.3** Schéma de fonctionnement de la SPE automatisée en ligne couplée à la spectrométrie de masse en tandem (on-line SPE-LC-MS/MS). L'étape 1 représente l'étape de conditionnement de la colonne SPE. L'étape 2 représente le chargement de la colonne SPE. L'étape 3 représente l'éluion des analytes vers la colonne analytique et l'analyseur. Adapté de Viglino *et al.* [116]

La réduction du temps de traitement de l'échantillon (quelques minutes *vs.* plusieurs heures), un volume d'échantillon beaucoup plus faible (1-20 mL *vs.* 100 à 4000 mL), une meilleure précision et reproductibilité accrues grâce à l'automatisation et une augmentation de la cadence d'échantillons analysés par jour (près d'une centaine *vs.* 12-24 pour la SPE manuelle) sont autant de points positifs qui font de la SPE en ligne une méthode de choix dans l'analyse de contaminants environnementaux dans de nombreuses matrices. S'il est des avantages pour cette technique, il est également des inconvénients qu'il convient de

mentionner. En effet, une limitation de la SPE en ligne tient du faible nombre de solvants compatibles avec la HPLC et la spectrométrie de masse. Aussi, il est impossible d'acidifier à pH très bas ou acidifier à pH très haut (à cause des parties en métal dans le système online) et l'utilisation de sels est limitée (doit être compatible avec MS), ce qui n'est pas forcément le cas en SPE offline qui offre une plus grande latitude sur le protocole. De plus, les limites de détection sont en général plus élevées que celle obtenues avec la SPE manuelle. On retrouve sur de telles cartouches un volume de fuite plus bas dû à la masse de phase stationnaire très faible en comparaison avec la masse de phase stationnaire disponible pour la SPE hors-ligne avec cartouches. Aussi, les valeurs de rendements sont en général plus basses qu'en SPE hors-ligne (60% vs. 80-120%) [271,308]. Enfin, le type de phases stationnaires disponibles sur le marché reste limité par rapport à celles pour la SPE manuelle ; cela se limite essentiellement à des phases stationnaires adaptées pour l'analyse en phase inverse. Bien que la SPE manuelle nécessite un volume d'échantillon bien plus élevé que la SPE en ligne (100 – 4000 mL vs. 1 – 20 mL) il est admis que cette dernière ne permet pas d'obtenir des limites de détection plus basses. Le temps d'analyse LC-MS/MS entre chaque échantillon est également plus long qu'en offline, dû à l'étape de chargement et au lavage de la cartouche SPE avant élution. Enfin, il y a une limite au nombre d'échantillons qu'il est possible d'injecter dans une même séquence sans devoir changer le préfiltre : avec 10 mL injectés, il est certain que la pression risque d'augmenter relativement rapidement en cas d'accumulation de particules sur le préfiltre de la colonne. Il serait par exemple difficile de lancer 200 injections consécutivement sans changer le préfiltre pour les matrices les plus chargées (eaux usées). Le choix entre ces deux variantes de SPE doit être essentiellement motivé par les attentes que l'on peut avoir en termes de niveaux de contamination des analytes ciblés. En effet, si les concentrations attendues ne sont pas situées au niveau ultra-trace, il est pertinent de considérer la SPE en ligne plutôt que la SPE manuelle.

### 2.4.3 Extraction de la phase particulaire des échantillons d'eau (SPM)

Les particules en suspension sont produites par des actions biologiques et géophysiques sur la croûte terrestre et pénètrent dans les eaux des cours d'eau par le transport par flux, comme l'advection, les précipitations et la dispersion [312,313]. Elles ont une taille généralement comprise entre 1 nm et 5 µm et sont formées à partir d'agrégats hétérogènes de matière organique, des fragments minéraux et des fractions microbiologiques. Cela s'étend d'une grande variété d'argiles biominérales aux particules de sable de tailles différentes en passant par des organismes vivants (microbes, phyto- et zooplancton) et de la matière organique non vivante (résidus fécaux et pseudo-fécaux, détritiques et produits de décomposition de l'activité microbienne). La SPM peut aussi trouver son origine dans des minéraux d'origine physicochimique (minéraux argileux, quartz, feldspath) et biogénique (calcite, aragonite, opale). Ils sont de très petites tailles et ont une très grande surface spécifique ce qui les rend susceptible d'interagir avec divers contaminants environnementaux tels que les métaux, les composés organiques (pesticides, composés pharmaceutiques, hormones, etc.) ou avec les microorganismes comme les bactéries. La concentration de SPM est un paramètre important pour comprendre l'écosystème marin car il contrôle la turbidité de l'eau et intervient dans de nombreux processus biochimiques. La SPM peut transporter ces substances avec le flux d'eau et peut induire une altération, une dégradation ainsi qu'une libération de ces molécules dans la phase dissoute [314]. D'après toutes ces informations quant à la propension de la matière en suspension à adsorber certains contaminants environnementaux, il est pertinent de déterminer les concentrations d'hormones dans cette matrice. Peu d'études ont porté leur attention sur la SPM, comparativement aux études sur les sédiments de fond. Une méthode d'analyse des hormones a donc été développée dans ce projet afin d'améliorer la compréhension du comportement de ces analytes. Du fait de leurs propriétés physicochimiques, il n'est pas surprenant de constater que peu d'hormones se retrouvent dans la phase particulaire. En effet, avec des coefficients de partage ( $\log K_{ow} = 3-4$ ) elles sont assez facilement entraînées dans la phase dissoute. Avec des concentrations mesurées dans la phase particulaire et dans la phase dissoute, il est possible de déterminer le coefficient d'adsorption de la molécule ce qui est une donnée importante à acquérir d'un



point de vue environnemental. Une estimation de la concentration dans une seule des deux phases peut induire un biais dans les conclusions faites dans bon nombre d'études. Le coefficient de distribution eau-solide ( $K_d$ , exprimé en  $L\ kg^{-1}$ ) permet de décrire la répartition des contaminants dans l'eau de surface par exemple. Il est défini comme étant le rapport de la concentration du contaminant dans la phase solide ( $C_s$  exprimée en  $ng\ kg^{-1}$  poids sec) sur la concentration du contaminant dans la phase aqueuse ( $C_w$  exprimée en  $ng\ L^{-1}$ ) dans un système qui a atteint l'équilibre selon l'équation suivante :

$$K_d = \frac{C_s}{C_w}$$

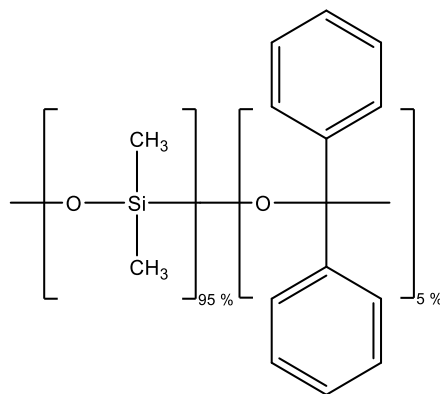
Cette grandeur est calculable dès que l'analyte est quantifié dans les deux matrices. Le protocole suivi dans les présents travaux repose sur une extraction solide-liquide réalisée à l'aide d'un solvant polaire tel que le méthanol [283,284]. Cette extraction est assistée par ultrasons afin d'en maximiser le rendement. Une fois cette étape passée, l'échantillon est centrifugé et le surnageant récupéré. Après plusieurs cycles d'extraction-centrifugation, l'échantillon nettoyé et évaporé à sec est prêt à être reconstitué et analysé.

## 2.5 Méthodes de séparation

Plusieurs critères tels que la vitesse, les limites de détection, la sensibilité, la reproductibilité et le coût de l'analyse justifient l'utilisation de certaines méthodes analytiques au détriment d'autres moins performantes. Les faibles concentrations (niveaux ultra-traces) d'hormones dans les matrices aqueuses et la complexité d'analyse inhérente aux différentes matrices sont autant de facteurs à considérer. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ayant été menés à bien grâce à la chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), cette méthode sera détaillée dans les prochaines sections. Quant aux autres méthodes existantes telles que la chromatographie gazeuse (*Gas Chromatography, GC*), l'électrophorèse capillaire (*capillary electrophoresis, CE*) ainsi que la chromatographie à fluide supercritique (*Supercritical Fluid Chromatography, SFC*), elles seront évoquées brièvement afin de ne pas diverger du sujet principal.

## 2.5.1 Diversité des méthodes de séparation pour l'analyse des hormones

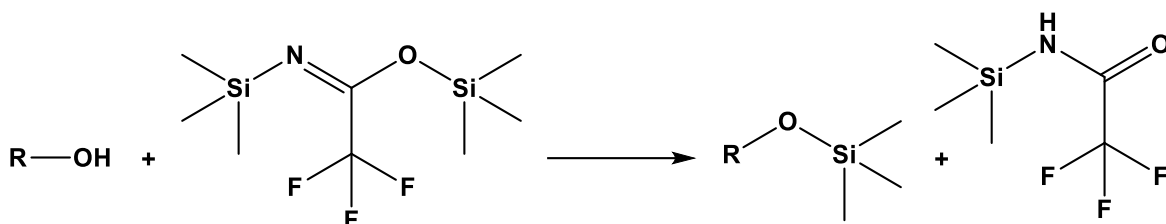
Bien des techniques existent pour l'analyse des hormones, au premier rang desquelles la chromatographie gazeuse (GC), utilisée dans un grand nombre d'études au courant des années 2000 [315–319]. Cette méthode séparative est utilisée dans le cadre de l'analyse de composés organiques volatils. Les analytes vont être introduits sous forme gazeuse à l'entrée de la colonne recouverte d'une phase stationnaire. Les analytes présents dans l'échantillon vont être ensuite transportés par le gaz vecteur à travers la colonne et être séparés en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. Cette dernière peut être un liquide peu ou pas volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). De nombreux modèles de phases stationnaires de nature peu polaire sont utilisés pour l'analyse des hormones à l'instar des colonnes de type HP5-MS (Agilent) dont le motif principal est constitué de siloxanes méthylés et phénylés (**Figure 2-4.**)



**Figure 2.4** Exemple de phase stationnaire peu polaire utilisée lors de l'analyse d'hormones par chromatographie en phase gazeuse

La colonne GC est placée dans un four afin de favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne. Deux modes sont largement rependus : le mode « isotherme », c'est-à-dire à température fixe durant toute l'analyse et le mode « gradient » avec un programme de température qui varie [320]. Pour les composés non volatils tels que les hormones, il est nécessaire de dériver les analytes. Cette étape indispensable pour

l'analyse en GC devra être réalisée avec un réactif permettant d'augmenter la stabilité thermique de l'analyte ainsi que sa volatilité. En général, une des fonctions polaires de l'analyte est convertie en une fonction moins polaire. Le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) est un composé chimique de choix pour ce type d'analyse. Il permettra de modifier un groupement hydroxyle d'un acide caboxylique ou d'un alcool en triméthylsiloxane moins polaire et dont la nature ne permet pas d'établir des ponts hydrogènes avec la phase stationnaire (**Figure 2-5**). Les rendements obtenus lors de cette réaction de dérivation sont de l'ordre de 90% - 100% [321,322]. Cette étape devra alors être comptabilisée dans le processus de traitement de l'échantillon au même titre que n'importe quelle procédure.



**Figure 2.5** Dérivation d'un groupement hydroxyle par le BSTFA en vue d'une analyse par chromatographie sur phase gazeuse

Autre technique analytique, l'électrophorèse capillaire (CE) est une technique de séparation électrochimique basée sur la séparation d'espèces de charges électriques différentes après l'application d'un champ électrique dans un liquide conducteur connu, l'électrolyte tel que l'acétate d'ammonium [323,324]. Les cations vont migrer vers la cathode - chargée négativement - tandis que les anions migreront vers l'anode chargée positivement ; les ions de charge électrique plus élevée (par exemple,  $M^{2+}$ ) migreront plus rapidement que ceux de charge inférieure (par exemple,  $M^+$ ). Pour certaines espèces chimiques, l'électrophorèse permet potentiellement d'obtenir des meilleures résolutions que l'HPLC. En CE, l'électrolyte est conservé à l'intérieur d'un tube capillaire de diamètre compris entre 25 et 75  $\mu m$ , l'échantillon étant injecté à une extrémité de ce tube. Lorsque l'échantillon migre à travers le capillaire à partir de l'application du champ électrique externe, les analytes qui s'y trouvent sont séparés et élués à des moments différents. Le

signal est observé sur un électrophérogramme qui fournit des valeurs aussi bien qualitatives que quantitatives [320].

La chromatographie en phase supercritique (SFC) est une autre technique utilisée pour l'analyse des hormones. Elle tire son originalité par l'utilisation d'un fluide à l'état supercritique comme phase mobile tel que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), ce qui améliore les séparations de composés thermolabiles ou de masses moléculaires élevées [325]. L'instrument est à mi-chemin entre la GC et l'HPLC. Il est d'ailleurs possible d'utiliser des colonnes capillaires de GC ou bien des colonnes classiques de HPLC, même si la tendance actuelle est d'opter plutôt vers l'utilisation de ces dernières. L'arrivée tardive de cette technique sur le marché a été un frein à son développement. En effet, beaucoup de méthodes étant déjà normalisées avec les autres techniques chromatographiques classiques ne laissaient que peu de place pour la SFC. Enfin, le fait que le matériel est plus complexe et son coût plus élevé, n'a pas joué en sa faveur et peu de constructeurs d'instruments d'analyse et par extension, peu de laboratoires de recherche s'y sont intéressés ce qui rend cette technique quelque peu marginale [326].

## 2.5.2 La chromatographie liquide

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la méthode d'analyse des contaminants émergents environnementaux par excellence. Elle est utilisée dans d'innombrables laboratoires et instituts à travers le monde depuis plusieurs décennies. Il s'agit d'une technique séparative qui précède l'étape d'ionisation avant l'analyse par MS. Son rôle est d'une importance capitale dans la mesure où elle permet d'isoler, autant que faire se peut, les analytes d'intérêt mais également les espèces qui pourraient causer une interférence au niveau de l'ionisation (à la source) ou bien du  $m/z$  (à l'analyseur). L'utilisation de l'HPLC surpasse de très loin la GC dans l'analyse des semi-volatils et composés organiques non volatils. Avec ses nombreuses variantes, elle permet l'étude de mélanges complexes, parfois difficiles à séparer par d'autres techniques, en particulier les mélanges de biomolécules. Une phase stationnaire (une colonne remplie par des petites particules de silice ou polymère sur lesquelles sont greffées des groupements modifiant la polarité de cette phase) et une phase mobile liquide dont les interactions avec la phase

stationnaire sont minimales, permettent de faire la séparation des composés. On parle alors de chromatographie de partage. La phase mobile joue un rôle important dans l'amélioration de la résolution et de la séparation des solutés. Il est important de souligner que le choix de la phase mobile et la phase stationnaire est basé sur la nature des analytes. Deux modes sont répandus : la chromatographie en phase normale NP-HPLC (*Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*) dans laquelle la phase stationnaire est polaire et la phase mobile apolaire et la chromatographie en phase inverse RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) qui utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire. L'élution peut être réalisée par un solvant unique ou par un mélange de composition fixe de solvants pour créer une élution dite « isocratique ». Dans le cas où il s'agit d'un mélange d'analytes plus difficiles à séparer, il est préférable d'utiliser un gradient d'élution. En phase inverse, le gradient débute avec une phase mobile riche en eau (voie A). Au cours de l'analyse, le pourcentage de solvant organique va être graduellement augmenté (voie B) ce qui va conduire à l'élution des composés polaires/hydrophiles en premier et les plus apolaires/hydrophobes en dernier. Dans ce mode de fonctionnement, la phase stationnaire apolaire est constituée d'une chaîne alkyle, de polystyrène-divinylbenzène ou encore de polysaccharides pour ne citer que ces dernières alors que la phase mobile est constituée d'un mélange eau-MeOH ou eau-ACN. D'une manière générale, les analytes (A) se distribuent selon le coefficient de partage K :

$$K = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

avec [A]<sub>s</sub> la concentration de l'analyte dans la phase stationnaire et [A]<sub>m</sub> la concentration de l'analyte dans la phase mobile. Afin de séparer deux analytes en solution, il faut qu'ils aient des coefficients de partage différents. Le principe de la rétention chromatographique repose sur l'équilibre du soluté entre les phases stationnaire et mobile. Un autre paramètre prépondérant est à considérer. Il s'agit de la hauteur du plateau théorique H qui peut être déterminé selon l'équation de Van Deemter qui le relie à la vitesse de la phase mobile (u). Une hauteur plus petite de plateau donne une meilleure résolution et revêt donc d'un intérêt majeur :

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

La hauteur théorique est contrôlée par la diffusion de Eddy (A) qui dépend de la forme des particules, du remplissage de la vitesse de la phase mobile et des différents chemins que les molécules empruntent dans la phase stationnaire. Elle dépend également de la diffusion longitudinale du soluté dans la colonne (B) qui est due à la diffusion moléculaire, elle-même induite par de légères dispersions du débit moyen. Le dernier paramètre dont dépend la hauteur théorique est la résistance au transfert de masse (C), tout en prenant en compte le débit de la phase mobile ( $u$ ). Un système chromatographique est en équilibre dynamique. Puisque la phase mobile circule continuellement, le système doit restaurer cet équilibre continuellement. Puisqu'il faut du temps pour le restaurer (résistance au transfert de masse), les profils de concentration des composants de l'échantillon entre phase mobile et phase stationnaire sont toujours légèrement décalés. Aussi, la phase mobile peut emprunter différents trajets à cause de la taille et la forme des particules à l'intérieur de la colonne pouvant affecter la largeur des pics.

La pompe est une composante importante de l'HPLC induisant une pression de 0,1 à 350 bars dont la fonction est d'assurer un débit constant et reproductible de la phase mobile à la colonne. Les colonnes sont généralement en acier inoxydable avec des longueurs allant de 10 à 30 cm et diamètres intérieurs entre 2 et 5 mm. Les remplissages de colonnes (ou phase stationnaire) ont typiquement des particules de diamètres compris entre 3 et 10  $\mu\text{m}$ . La chromatographie liquide peut être améliorée pour permettre de réaliser une séparation plus rapide, plus efficace et présentant une résolution plus élevée. Cette variante est appelée chromatographie liquide à ultra-haute performance (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography UHPLC*). Dans ce tels systèmes, des particules inférieures à 2  $\mu\text{m}$  sont utilisées, ce qui induit des pressions maximales de travail de l'ordre de 1000 bar, des débits de travail plus élevés ainsi que des pics chromatographiques plus fins. La taille de particule est un facteur d'efficacité important en conjonction avec la longueur de la colonne. Une taille de particules plus petite donnera une haute efficacité de séparation, mais tel que mentionné ci-dessus, une augmentation de la pression est à prévoir. Le rôle de la longueur de la colonne sera de stabiliser cette pression ou retenir la même résolution. Durant les premières étapes du développement de méthode en phase inverse, plusieurs points sont à considérer : le choix de la bonne colonne pour effectuer une séparation donnée sachant qu'il existe un large éventail d'options commercialement

disponibles tout en atteignant les objectifs de séparation rapidement et à peu de coût, sans réduire la robustesse de la méthode; l'évaluation de la répétabilité ainsi que la reproductibilité de la colonne analytique et sa longévité, c'est-à-dire le nombre d'injections effectuées avant de perdre son efficacité selon le protocole adopté. L'immense majorité des techniques analytiques se basant sur la chromatographie à haute performance reposent sur l'utilisation d'une phase inverse durant la séparation. La phase stationnaire la plus communément utilisée est la silice greffée C18 (silanols greffés avec une chaîne alkyle de 18 atomes de carbones). Cette phase est la même pour l'ensemble des colonnes manufacturées par différentes compagnies. Ce qui diffère cependant est le taux de greffage des silanols qui peut varier d'une « marque » ou d'un modèle à une autre. Certaines études ont également utilisé un type de colonne similaire mais dans lesquelles les silanols étaient greffés avec une chaîne alkyle de type C8 (8 atomes de carbone) [327].

## **2.6 La spectrométrie de masse (MS)**

### **2.6.1 Aspect général**

La MS est une méthode analytique indispensable pour l'analyse de molécules dans plusieurs domaines tels que la chimie, la biochimie, la pharmacologie, la médecine et bien d'autres encore. Elle est basée sur un principe fondamental : la séparation des ions produits par une source d'ionisation selon un rapport de masse-sur-charge ( $m/z$ ) suivie d'une détection qualitative ou quantitative en fonction de leur  $m/z$  et leur abondance [328]. Couplée à la GC ou à la LC, la MS est depuis plusieurs décennies une technique largement employée dans la détection des hormones dans plusieurs matrices environnementales telle que l'eau ce qui en fait un détecteur à prioriser dans ce type d'analyse. Elle permet en effet, d'étudier des échantillons complexes et de natures très différentes à l'état de traces lorsqu'associée aux méthodes séparatives comme la LC et la GC. Il existe un grand nombre de types de spectromètre de masse différents mais qui comportent tous trois éléments distincts : une source, un analyseur et un détecteur.

Les sources d'ionisation sont les composantes du spectromètre de masse dans lesquelles sont produits les ions gazeux des analytes d'intérêts. Il en existe un grand nombre, disponibles sur le marché qui ont fait l'objet de plusieurs revues de littérature [329–331] mais ce point ne sera pas élaboré dans cet ouvrage. Dépendamment de leur type, les sources d'ionisation peuvent soit produire une ionisation dite « douce » (molécules intactes chargées sans rupture de liaison ou des ions moléculaires à nombre pair d'électrons) ou « fortes » (ions moléculaires avec un nombre impair d'électrons qui se peuvent se fragmenter beaucoup et parfois même totalement). Le choix de la source d'ionisation va dépendre de la nature de l'échantillon (liquide, solide ou gazeux) et des propriétés des composés (taille des molécules, stabilité thermique, volatilité, labilité). La discussion suivante mettra l'emphase sur les deux sources d'ionisation utilisées lors des travaux présentés dans cette thèse, soit l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation par électronébulisation (ESI).

Dans les sections qui suivent, la question des analyseurs dits quadripolaires va être abordée. En effet, la grande majorité des études pour l'analyse des hormones dans l'eau y compris les présents travaux sont réalisés avec l'emploi de ce type d'analyseur. Les quadripôles sont réputés depuis de nombreuses années pour leurs grandes performances en termes de vitesse de balayage très élevée, de robustesse, de nombre différent d'expériences possibles, de maintenance et de coût. Si l'on affine l'explication sur les types d'analyseurs, la MS/MS représente une méthode qui utilise deux analyseurs de masse (quadripôles) successifs montés en tandem, soit sur des séquences successives (dans des régions différentes de l'appareil) ou à l'intérieur d'une même enceinte (expérience dans le temps, comme pour les trappes à ions) [328,332,333]. Dans le cadre des présents travaux sur les hormones, la MS/MS dans l'espace a été utilisée. Elle repose sur un ensemble de trois analyseurs, dont deux quadripôles (Q1 et Q3) et un quadripôle, q2 situé entre Q1 et Q3 et placé à l'intérieur d'une cellule de collision [328]. Ce type de configuration est indiqué comme QqQ.



## 2.6.2 Les sources d'ionisation

### 2.6.2.1 Généralités

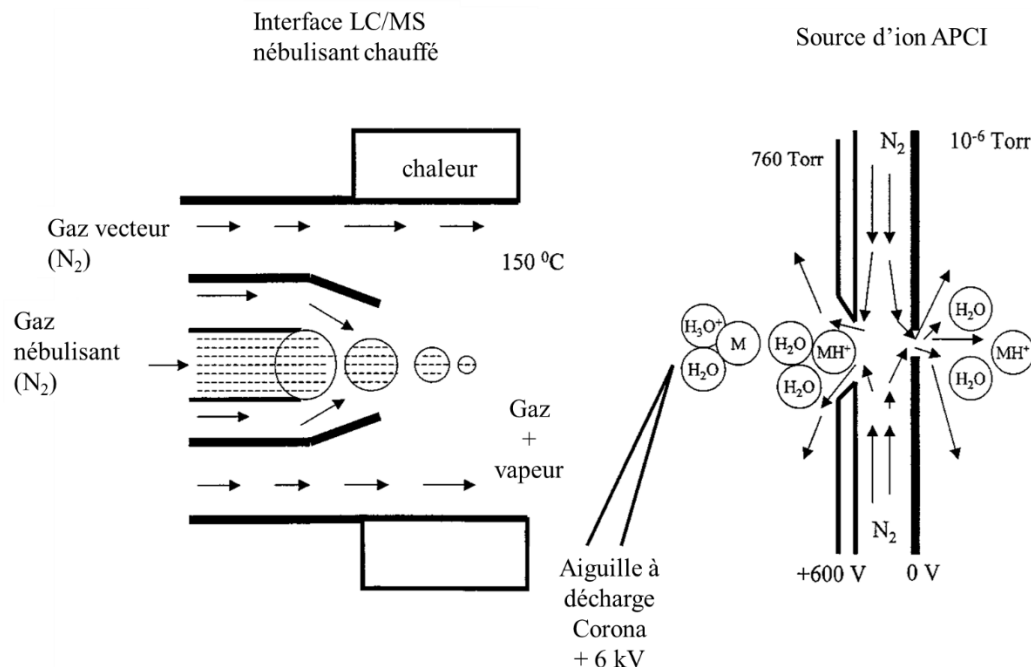
Un grand nombre de sources d'ionisation sont disponibles sur le marché. Il en existe deux types principaux : les sources d'ionisation fortes et les sources d'ionisation douces. Les premières produisent majoritairement des ions chargés issus de la fragmentation de la molécule mère en de nombreux fragments. La source à impact électronique (EI) et la source à ionisation chimique (CI) en sont les plus illustres exemples bien que l'ionisation chimique parvienne à former des ions quasi-moléculaires. Ces sources sont de bonnes candidates pour l'analyse de molécules volatiles, stables et ionisées en phase gazeuse. Cependant, certains composés ne disposent pas d'une volatilité suffisante et sont trop thermiquement sensibles pour être analysés en phase gazeuse. Les sources d'ionisation douces, représentent une bonne alternative puisqu'elles permettent le transfert direct de la phase condensée (analyte en solution) à la phase gazeuse. Une fois nébulisé, l'ion formé est introduit dans le spectromètre de masse dans des conditions de vide poussé. Ce type d'ionisation produit de façon prépondérante, des ions moléculaires ou « quasi-moléculaires » par addition ou retrait d'un proton  $H^+$ , ou par formation d'adduits résultants de l'addition de Na,  $NH_4^+$ , etc. dépendamment des conditions de l'analyse. Ce projet de recherche a porté son attention sur ce type de source d'ionisation et plus particulièrement sur les sources de type APCI et ESI ; sources largement employées dans de nombreux domaines et laboratoires.

### 2.6.2.2 Source APCI

L'ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) en anglais repose sur un transfert d'espèces chargées d'un ou plusieurs ions réactifs à une molécule qui n'est pas nécessairement ionisée en solution, en phase gazeuse. Dans cette source, les analytes sont vaporisés à pression atmosphérique ce qui produit un brouillard à haute température et qui favorise leur désolvatation. En ce qui concerne l'ionisation des molécules de solvant, elle est faite par une décharge Corona qui joue le rôle de réactif permettant l'ionisation. Les ions sont ensuite focalisés, désolvatés

puis transférés dans l'analyseur via un orifice (0,1 mm) utilisant une interface à pression atmosphérique. Un contre-courant d'azote N<sub>2</sub> appelé « *curtain gas* », la traverse ce qui permet la production d'un brouillard de fines gouttelettes. En APCI, un débit de liquide élevé (0,2 – 1,0 mL/min) est nécessaire pour obtenir une vaporisation efficace. Grâce à un gaz vecteur nébulisant (en général du N<sub>2</sub>) ajouté de façon pneumatique, le liquide est introduit dans la source puis chauffé à des températures situées entre 350 et 500°C ce qui permet la vaporisation et la désolvation des analytes. Le gaz vecteur va alors permettre aux analytes de se diriger vers l'aiguille Corona où ils vont subir une décharge comprise entre 2 kV et 6 kV. L'intensité du courant produit est comprise entre 1 et 5 µA. En mode positif, la décharge va produire des ions positifs par captation d'électrons alors qu'en mode négatif, les ions négatifs des espèces moléculaires sont produits soit par abstraction de protons ou formation d'adduits. Les ions radicalaires ainsi formés, généralement N<sub>2</sub><sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•+</sup>, H<sub>2</sub>O<sup>•+</sup> et NO<sup>•+</sup> en mode positif et O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, O<sup>•-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>•-</sup>, O<sub>3</sub><sup>•-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> en mode négatif, vont participer aux réactions chimiques avec les molécules de solvant qui se produisent en phase gazeuse dans la source et permettre ainsi d'ioniser les analytes. Ces ions vont ensuite réagir avec les molécules d'eau présentes dans la source pour former des ions réactifs oxonium qui, après transfert de proton vont former les ions [M + H]<sup>+</sup>. En mode négatif, les ions [M - H]<sup>-</sup>, sont produits par réactions ions-molécules avec les anions oxygène.

L'APCI est une technique d'ionisation de choix pour l'analyse de petites molécules, thermiquement stables, peu polaires, ayant une masse inférieure à 1500 Da. Cette technique est couramment utilisée pour l'analyse des hormones dans différentes matrices du fait de ses qualités. En effet, certaines études ont démontré que l'APCI était moins sujette aux effets matrices que ne l'est l'ESI. La raison principale provient du fait qu'en ESI, la présence d'espèces neutres dans la phase gazeuse avec une forte affinité protonique peut neutraliser les analytes lors du transfert de proton. La présence de sels ou de substances non volatiles peut également résulter en une baisse significative du signal. Ce problème n'apparaît pas en APCI car les analytes sont désolvatés avant leur ionisation. L'effet matrice provient plus de la nature de l'échantillon en tant que tel que des autres facteurs mentionnés ci-dessus. Il incombe donc à l'opérateur d'améliorer la préparation de l'échantillon ou encore d'utiliser la source en mode négatif afin de diminuer ces effets matrice.

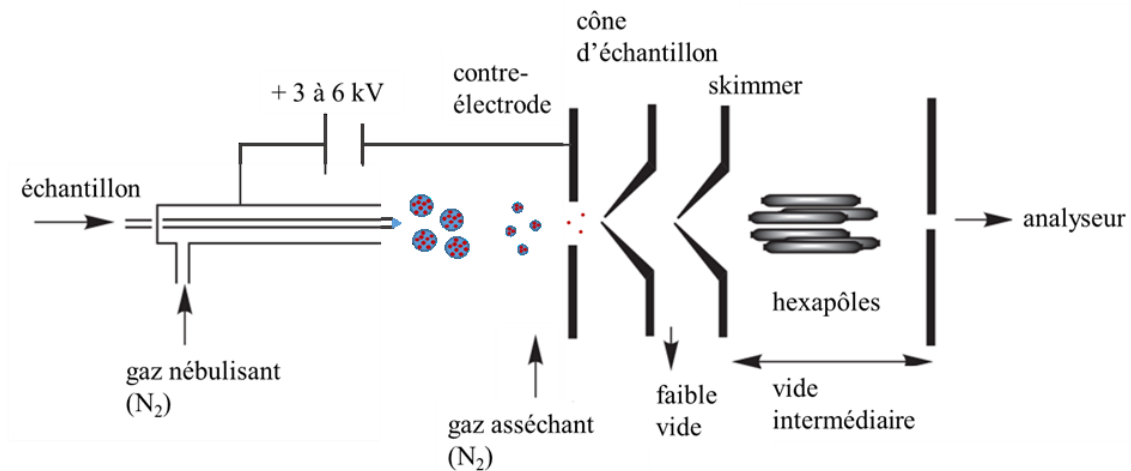


**Figure 2.6** Schéma représentatif du mécanisme d'ionisation d'une molécule par APCI en mode positif adapté de M. Vestal [329]

### 2.6.2.3 Source (H)ESI

L'ionisation par électronébulisation ou (*heated-*)*electrospray ionization* ((H)-ESI) en anglais est une technique similaire à l'APCI dans la mesure où elle opère à pression atmosphérique. Elle a connu un essor important du fait de son aptitude à analyser des molécules de grande taille (jusqu'à 500 kDa) telles que les biomolécules, protéines et autres polymères. Aussi, la facilité de couplage avec la LC/MS et la CE/MS ainsi qu'une sensibilité élevée en font une technique de premier plan pour l'analyse d'un grand nombre de molécules à l'image des petites molécules polaires que sont les hormones. L'ESI repose sur une ionisation par nébulisation électrostatique des analytes à pression atmosphérique. Un champ électrique fort est appliqué à la solution lors de son passage dans le capillaire par application d'un différentiel de potentiel de 3 à 6 kV entre le capillaire et la contre-électrode, séparés eux-mêmes par 0,3 à 2 cm. Il en résulte un champ électrique de l'ordre de  $10^6 \text{ V m}^{-1}$ . Ce potentiel va provoquer l'apparition de gouttelettes multiples chargées au sortir du capillaire au niveau d'un cône appelé cône de Taylor qui résulte lui-même

d'une pression exercée par les charges électriques plus grande que la tension de surface. Dans le but de limiter la nébulisation dans l'espace, un gaz nébulisant ou gaz vecteur va être injecté de manière coaxiale, à faible débit. Au fur et à mesure du trajet, l'évaporation du solvant et la collision avec les molécules environnantes vont induire une réduction de la taille des gouttelettes. Lorsque l'ampleur du champ électrostatique est plus grande que la tension de surface qui maintient l'intégrité de la gouttelette, une explosion coulombienne ou fission survient. Cette limite est appelée limite de Rayleigh. Les étapes de fission successives ont pour effet une diminution drastique de la taille des gouttelettes ce qui finit par former un résidu ionique désolvaté de l'ordre de 1 nm. Enfin, les gouttelettes résiduelles vont passer à travers un rideau de gaz inerte chauffé tel que le diazote afin de retirer les dernières molécules de solvant. Dans le cas de petites molécules, les ions produits seront de type  $[M + H]^+$  en mode positif et de type  $[M - H]^-$  pour une analyse en mode négatif. Dans le cas de macromolécules, les ions seront en général multiplement chargés et de type  $[M + nH]^{n+}$  ou  $[M - nH]^{n-}$ . Les propriétés de la source ESI confèrent à cette dernière la capacité d'analyser tant des macromolécules telles que les protéines que des petites molécules organiques telles que les hormones et ce, dans plusieurs matrices.



**Figure 2.7** Schéma représentatif du mécanisme d'ionisation d'une molécule par ESI en mode positif adapté de De Hoffmann *et al.* [332]

## 2.6.3 L'analyseur

### 2.6.3.1 Analyseurs disponibles pour l'analyse des hormones

Depuis plusieurs décennies, les hormones ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Parmi le large panel d'analyseurs disponibles, la plupart ont été utilisés dans le cadre de travaux portant sur les hormones [334–338]. Dans le cadre de cette thèse, seuls le quadripôle et le triple-quadripôle seront expliqués de manière détaillée. Cependant, à titre d'information, les autres analyseurs ainsi que leurs caractéristiques principales seront réunis dans un seul et même tableau (**Tableau 2-2.**), leur principe de fonctionnement sera brièvement explicité (**Tableau 2-3.**). Il s'agit ici d'une liste non exhaustive qui ne tient notamment pas compte des analyseurs hybrides.

**Tableau 2-2.** Les différents types d'analyseurs communément utilisés dans l'analyse des hormones d'après De Hoffmann *et al.* et Holčapek *et al.* [332,339]

Paramètre	TOF	Secteur magnétique	Quadripôle	LIT	QIT	FT-ICR	Orbitrap
Gamme de masse (Da)	illimitée	15 000	4000	4000	5000	$> 10^4$	4000
Résolution	15 000	$10^2 - 10^5$	4000	$10^3 - 10^4$	$10^3 - 10^4$	$> 10^6$	$10^5$
Précision (ppm)	5 – 50	1 – 5	100	50 – 100	50 – 100	1 – 5	1 – 3
Sensibilité	Jusqu'à $10^6$	$10^6 - 10^9$	$10^4 - 10^6$	$10^3 - 10^5$	$10^3$	$10^2 - 10^5$	$10^4$
Fréquence (Hz)	$10^1 - 10^6$	0,1 – 20	1 – 20	1 – 300	1 – 30	$10^{-2} - 10^1$	1 – 5
Efficacité (%)	1 – 100	<1	<1 – 95	<1 – 99	<1 – 50	<1 – 95	<1 – 95
Gamme dynamique	$10^2 - 10^6$	$10^9$	$10^7$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$	$5 \times 10^3$
MS/MS	Très bon	Excellent	Très bon	Excellent	Très bon	Très bon	Excellent
LC/MS	Bon	Faible	Excellent	Excellent	Excellent	Bon	Excellent
Coût	\$\$ - \$\$\$	\$\$\$\$	\$	\$\$	\$	\$\$\$\$	\$\$\$

**Tableau 2-3.** Principe de fonctionnement des différents types d'analyseurs communément utilisés dans l'analyse des hormones d'après Gross *et al.* et De Hoffmann *et al.* [328,332]

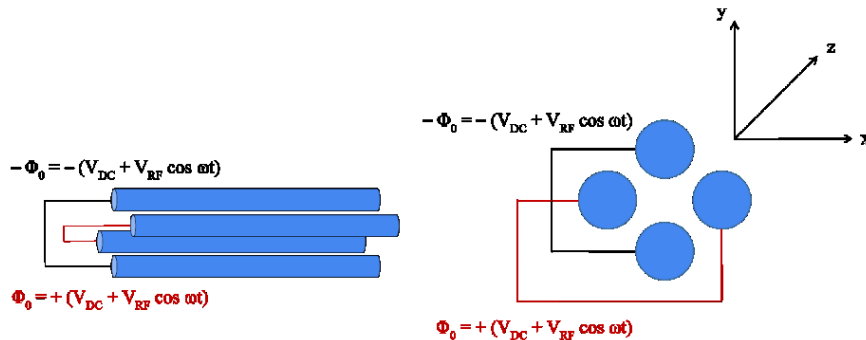
Analyseur	Acronyme	Principe
Temps de vol	TOF	Dispersion temporelle d'un faisceau ionique pulsé et séparation des ions selon le temps de vol, selon leur masse
Secteur magnétique	B	Dispersion d'un faisceau ionique continu; séparation selon la quantité de mouvement des ions dans un champ magnétique (Forces de Lorentz)
Quadripôle	Q	Faisceau ionique continu dans un champ quadripolaire linéaire de radiofréquence; séparation selon la stabilité des trajectoires
Trappe ionique quadripolaire linéaire	LIT	Faisceau ionique continu et ions piégés. Accumulation et séparation des ions dans un champ linéaire de radiofréquence quadripolaire
Trappe ionique quadripolaire	QIT	Piégeage d'ions par deux électrodes hyperboliques de part et d'autre d'une électrode en forme d'anneau. Combinaison de radiofréquence permettant de stabiliser la trajectoire des ions dans un champ quadripolaire
Résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier	FT-ICR	Piégeage d'ion et séparation selon leur fréquence cyclotronique dans un champ magnétique. Mise en application des forces de Lorentz et proportionnalité rayon/masse
Orbitrap		Piégeage électrostatique d'ions dans une orbite autour d'un axe central. Trajectoire définie par un équilibre entre force électrostatique et force centrifuge. Détection de fréquence et lecture par transformée de Fourier

### 2.6.3.2 Le triple quadripôle

Le quadripôle est un des analyseurs les plus répandus parmi les spectromètres de masse. De surcroît, il est largement utilisé dans divers champs d'expertise pour ses grandes performances et sa versatilité. Il est constitué de deux paires d'électrodes métalliques sur lesquelles on applique un potentiel positif (première paire) et un potentiel négatif (seconde paire). Une combinaison de potentiel direct ( $V_{DC}$ ) dans le plan  $x - z$  et alternatif ( $V_{RF}$ ) de fréquence  $\omega$  dans le plan  $y - z$  est appliquée à chacune des paires. Les ions oscillent entre les électrodes selon les forces électriques alternatives (attractives et répulsives) induites par les différents courants. Il est admis que les électrodes maintenues à un potentiel positif filtrent les ions de haute masse alors que celles qui sont maintenues à un potentiel négatif auront tendance à filtrer les ions de basse masse. Pour une combinaison donnée de potentiel DC et RF, seuls les ions ayant un  $m/z$  spécifique auront une trajectoire stable et seront les seuls transmis par le quadripôle. Les autres n'auront pas de trajectoires stables, seront par conséquent déstabilisés et ne pourront pas passer à travers le quadripôle. Les ions voyageant le long de l'axe  $z$  seront influencés par le champ électrique global créé par superposition du champ alternatif et du champ constant résultant de l'application des potentiels suivant les équations suivantes :

$$\Phi_0 = + (V_{DC} + V_{RF} \cos \omega t) \text{ et } -\Phi_0 = - (V_{DC} + V_{RF} \cos \omega t)$$

Dans ces équations,  $\Phi_0$  représente le potentiel appliqué aux électrodes,  $\omega$  la fréquence angulaire (en radian par seconde tel que  $\omega = 2\pi\nu$  dans laquelle  $\nu$  est la fréquence du champ RF),  $V_{DC}$  est le potentiel direct et  $V_{RF}$  est l'amplitude du potentiel radiofréquence.



**Figure 2.8** Schématisation d'un quadripôle (gauche) et des paires d'électrodes (droite) d'après Gross et De Hoffmann *et al.* [328,332]

Il est possible de combiner plusieurs quadripôles en série afin d'obtenir un instrument permettant l'analyse par spectrométrie de masse en tandem. Cet instrument appelé triple quadripôle a gagné une grande renommée dans l'analyse des contaminants organiques présents dans l'environnement à l'état de trace ou encore dans les matrices biologiques. Ce type particulier de spectromètre de masse permet de faire ce qui est communément appelé de la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Il est constitué d'un premier quadripôle Q1 permettant de faire une première sélection d'ions. Le deuxième quadripôle n'est quant à lui, utilisé uniquement en mode radiofréquence ( $V_{DC} = 0$ ) dans le but de laisser passer les ions qui vont y être fragmentés. En effet, ce dernier est employé en tant que cellule de collision (q2) dans laquelle les ions sélectionnés (ions précurseurs) vont être fragmentés. C'est un gaz, l'argon (Ar) qui va permettre leur fragmentation par conversion de l'énergie cinétique de ce dernier en énergie interne permettant la fragmentation selon le principe de CID (*collision-induced dissociation*). Les ions produits (ions fils) seront amenés vers le troisième et dernier quadripôle (Q3) où ils seront à nouveau triés selon la sélection d'ions d'intérêt effectuée auparavant et finalement entrer dans le détecteur. En somme, cette technique consiste à filtrer un ion précurseur avec Q1, le fragmenter avec q2 et sélectionner le fragment avec Q3.

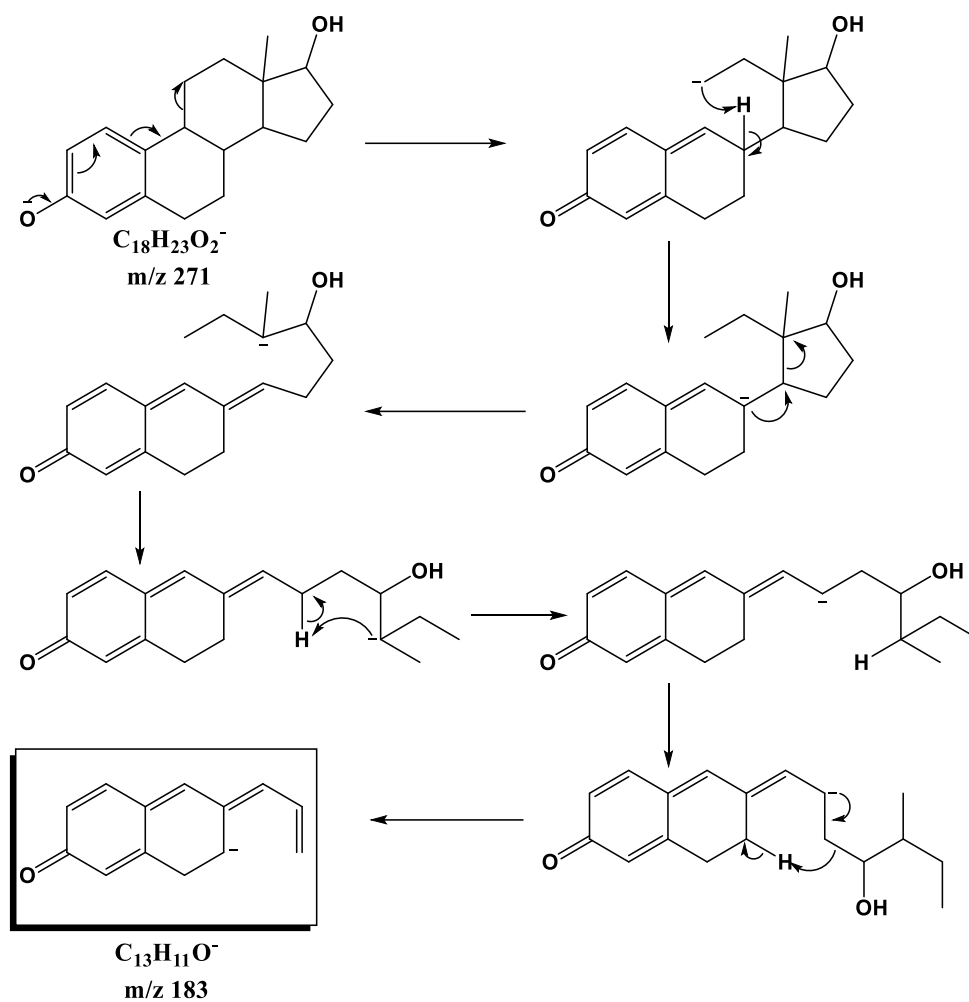


**Figure 2.9** Schéma de fonctionnement d'un analyseur de type triple quadripôle

Les analyseurs de type triple quadripôles (QqQ) disposent d'une gamme de masses analysables située entre  $m/z$  50 et  $m/z$  4000 avec une gamme dynamique de  $10^6$ , une précision de masse de  $\sim 0.01$  % avec étalon interne ainsi qu'une résolution de l'ordre de 4000. Cette approche sélective utilisée dans ce projet pour quantifier les hormones est appelée suivi de réaction ciblée ou encore multiples fragmentations sélectives (respectivement *selected reaction monitoring*, SRM ou *multiple reaction monitoring*, MRM).



Cette technique possède de grandes qualités à bien des égards. En effet, elle dispose d'une double sélectivité, ce qui offre un grand avantage comparativement au simple quadripôle, diminuant ainsi les risques de faux positifs. Elle permet également une bonne transmission des ions et est aussi sensible du fait de l'élimination du bruit de fond ce qui a pour effet d'augmenter le rapport signal sur bruit. Dans une analyse par triple quadripôle, plusieurs points sont importants : le temps de rétention de l'analyte, la masse du précurseur, la masse des ions fragments (deux ou plus) et le ratio des intensités des deux ions à savoir l'ion servant à la quantification et celui servant à la confirmation. À titre d'exemple, considérons l'estradiol (E2) pour illustrer le mode de fonctionnement MRM. Après l'ionisation en mode négatif, l'estradiol possède un  $m/z$  de 271 (ion  $[M - H]^-$ ). Ce dernier va être filtré par le premier quadripôle puis va être transmis dans la cellule de collision où il sera fragmenté. De cette fragmentation (**Figure 2-10**) résultera un grand nombre de fragments mais deux d'entre eux vont présenter un intérêt puisqu'ils seront plus abondants par rapport aux autres. Dans le cas de l'estradiol, les deux ions les plus abondants présentent un  $m/z$  de 183 pour le principal et de 145 pour le secondaire. Ces derniers seront envoyés dans le troisième quadripôle et poursuivront leur trajet jusqu'au détecteur tandis que les autres fragments seront déviés et n'atteindront pas le détecteur.



**Figure 2.10** Mécanisme de fragmentation possible pour l'estradiol (E2)  $m/z$  271 vers son ion fragment majoritaire à  $m/z$  183, en mode négatif. Adapté de Wooding *et al.* [340]

Le QqQ dispose d'un large panel de modes d'analyse tel que le mode balayage complet (*full scan, FS*) permettant de balayer une large gamme de masses, le mode suivi d'ion ciblé (*selected ion monitoring, SIM*), le mode d'ions fragments (*product ion scan, PIS*), le mode de précurseurs (*precursor ion scan, PI*) ou encore la perte de neutre spécifique (*constant neutral loss, NL*). Cette versatilité fait du triple quadripôle un excellent instrument d'analyse.

## 2.7 **Problématique, justification et objectifs des travaux de recherche**

À la lumière de l'occurrence des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans l'environnement et des risques pour la santé, il apparaît nécessaire de développer des méthodes analytiques rapides, sensibles, spécifiques et robustes permettant d'évaluer leur occurrence dans l'environnement.

La plupart des techniques analytiques développées jusqu'à présent sont essentiellement basées sur des principes de spectroscopie et de spectrométrie. Parmi celles-ci, un grand nombre permettent d'analyser et de quantifier les hormones stéroïdiennes ou le bisphénol A dans les matrices environnementales. Les limites de détection de ces techniques permettent d'atteindre des niveaux très bas, de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$ . Cependant, peu de ces méthodes et techniques permettent de détecter et de quantifier une large gamme d'hormones à des niveaux traces et ce, dans plusieurs matrices environnementales. De plus, peu de techniques faisant appel à la SPE en ligne ont été développées de manière à analyser ces molécules dans de multiples matrices.

Le point de départ de cette thèse repose sur la méthode analytique standardisée 539.1 développée par l'US EPA (*Method 539.1 : Determination of twelve hormones and bisphenol A in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography electrospray ionization tandem masse spectrometry*). Cette méthode vise à quantifier douze hormones ainsi que le bisphénol A dans l'eau potable. Cependant, son applicabilité demeurait à démontrer pour d'autres matrices plus complexes.

D'après les problématiques énoncées ci-dessus, cette thèse se voulait innovante en matière de sensibilité, de robustesse, de rapidité, d'efficacité et de versatilité. Pour se faire, plusieurs techniques ont été développées afin de répondre aux lacunes présentes dans ce domaine et accroître les capacités d'analyse et d'études d'hormones stéroïdiennes majeures ainsi que du bisphénol A. Il était également important d'augmenter la gamme d'analytes et de matrices étudiées par rapport à ce qui avait été fait au sein de l'agence de protection de l'environnement aux États-Unis (US EPA).

Dans un premier temps, la liste d'analytes a été étendue à 16 analytes (ajout de l'équiline, de l'équilénine, de l'altrénogest et de la médroxyprogestérone). De plus, il a été décidé de modifier également la liste de matrices en sélectionnant l'eau HPLC, l'eau du robinet, l'eau de surface, les eaux usées (affluent et effluent) ainsi que la phase particulaire comme matrices d'intérêt.

Ainsi, deux méthodes analytiques permettant d'analyser ces plusieurs classes d'analytes ont été développées, l'une se basant sur la SPE en ligne, l'autre sur la SPE hors ligne. De plus, plusieurs sources ont été testées au préalable afin d'optimiser tout d'abord le volet spectrométrie de masse avant tout autre paramètre. Une méthode d'extraction sur phase solide en ligne avec une séparation chromatographique à haute résolution a été développée, couplée avec la spectrométrie de masse en tandem (on-line-SPE-HPLC-MS/MS). L'étape de validation a permis de comparer les performances avec plusieurs critères de la méthode EPA 539.1. Une méthode analogue hors ligne (off-line-SPE-HPLC-MS/MS) adaptée de la méthode EPA 539.1 a également été développée et validée. Ces deux méthodes ont par la suite été appliquées à l'analyse d'échantillons réels pour l'ensemble des matrices. Enfin, une méthode hors ligne permettant l'analyse des hormones dans la phase particulaire a également été développée, optimisée et validée. Faisant suite à cette validation, une étude saisonnière portant sur la Rivière des Mille Iles a été réalisée sur un cycle complet dans le but d'évaluer et d'identifier les analytes ciblés dans la phase dissoute et la phase particulaire afin notamment d'en déterminer la valeur du  $K_D$ .

## 2.8 Structure de la thèse

La présente thèse est divisée en plusieurs chapitres organisés selon le développement, l'avancée et l'analyse effectués dans le cadre de l'étude des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans les différentes matrices environnementales mentionnées précédemment. Chaque chapitre rend compte d'une spécificité en matière de méthodes et d'analyse de ces analytes.

Le **Chapitre 3**, un article publié dans *Journal of Chromatography A*, décrit l'optimisation, la validation et l'application d'une méthode analytique sensible, efficace, robuste et rapide. Les premiers paramètres optimisés étaient la source d'ionisation (APCI vs. HESI), la phase mobile et les paramètres MS. Il s'agissait d'une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Les analytes étaient extraits par SPE en ligne avec le système chromatographique.

Le **Chapitre 4**, un article publié dans *Talanta*, traite de l'applicabilité et des limitations potentielles d'une méthode analytique basée sur la technique de SPE manuelle (adaptée de la méthode originelle EPA 539.1), l'analyse étant réalisée par HPLC-MS/MS de manière analogue à celle évoquée dans le chapitre précédent. Une attention particulière a été portée sur le choix de la cartouche SPE et d'autres facteurs pouvant influencer les performances de la méthode.

Le **Chapitre 5**, un article accepté dans *Environmental Advances*, fait état de l'analyse sur une année des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase dissoute et la phase particulaire. Cette étude avait pour but d'évaluer la variabilité et la saisonnalité des concentrations d'analytes d'intérêts présents dans un cours d'eau impacté par les effluents de stations d'épuration situées sur ce même cours d'eau : la Rivière des Mille-Îles (Québec). Une étape d'optimisation et de validation de la méthode d'analyse de la phase particulaire était nécessaire avant d'effectuer cette étude. L'objectif de cet article était également de pouvoir documenter les concentrations d'HS et de bisphénol A dans la phase particulaire et d'en tirer si possible des valeurs de coefficients de partage  $K_D$ .

Le **Chapitre 6** vient refermer cet ouvrage avec une conclusion générale de la thèse mais également en ouvrant le sujet des futurs défis et enjeux de recherche au sujet des hormones stéroïdiennes, des bisphénols et autres perturbateurs endocriniens.

### **Chapitre 3. Analyse d'hormones perturbatrices endocriniennes prioritaires selon l'Agence de protection de l'environnement et du bisphénol A dans l'eau du robinet, l'eau de surface et les eaux usées par méthode de préconcentration en-ligne couplée à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse en tandem**

Article publié dans Journal of Chromatography A (2019) 1591: 87–98

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.016>

**“Analysis of Environmental Protection Agency priority endocrine disruptor hormones and bisphenol A in tap, surface and wastewater by online concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry”.**

Auteurs : Ken Goeury, Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Michèle Prévost, Sébastien Sauvé

Description : Cet article décrit l'optimisation, la validation et l'application d'une méthode analytique sensible, efficace, robuste et rapide. Il s'agissait d'une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Les analytes étaient extraits par SPE en ligne avec le système chromatographique.

Contributions: Avec l'aide de mon superviseur, j'ai effectué la conception du projet. J'ai réalisé l'ensemble la collecte des échantillons sur le terrain ainsi que la réalisation des manipulations en laboratoire. Par la suite, j'ai procédé au traitement de données et à la rédaction de l'article. La méthode fut ensuite appliquée à l'analyse d'échantillons réels provenant des différentes matrices étudiées.

Co-auteurs: Sung Vo Duy et Gabriel Munoz m'ont aidé à réviser l'article.

Co-directrice: Michèle Prévost m'a aidé à réviser l'article.

Directeur: Sébastien Sauvé m'a aidé à la conception du projet et à la révision de l'article.

## Abstract

The list of endocrine disrupting compounds (EDCs) defined under US EPA Method 539 was recently expanded to include additional hormones and bisphenol A (BPA). Here, we validated a fast and robust alternative method compliant with Method 539.1 requirements in diverse water matrixes (i.e., ultra-pure water, tap water, surface water, and wastewater influent and effluent). Automated large volume injection solid phase extraction (SPE) coupled on-line to ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was investigated for this purpose. The surveyed molecules included hormones (testosterone, progesterone, medroxyprogesterone, levonorgestrel, norethindrone, androstenedione, estrone,  $\beta$ -estradiol,  $\alpha$ -estradiol, equilin, equilenin, ethinylestradiol, estriol) and BPA. Combinations of ionization source and mobile phases were optimized for improved sensitivity. Suitable chromatographic performances were obtained and the implementation of an on-line SPE washing step consecutive to sample loading was investigated. On-line SPE extraction efficiencies in acceptable ranges (64-79%) and detection limits in the order of nanogram per liter or sub-nanogram per liter were obtained. The linearity range extended over 2-3 orders of magnitude, with determination coefficients ( $R^2$ ) typically  $> 0.9980$ . Robust precision (variability  $< 20\%$ ) and trueness complying with acceptance criteria (70–130%) were obtained for the scope of analytes/matrix combinations. Limited internal standard variations were also observed across samples ( $\pm 18\%$ ), well within the  $\pm 50\%$  acceptance criterion. The method was successfully applied to field-collected samples in Canada and summed EDC concentrations were reported in the range of  $0.60\text{--}31 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1.7\text{--}3.9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $260\text{--}790 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $38\text{--}360 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in tap water, surface water, effluent, and influent wastewater samples, respectively.

### Keywords

U.S. EPA-priority hormones and bisphenol A; Large volume on-line solid phase extraction; UHPLC-MS/MS; Drinking water, surface water, and wastewater; Method validation and quality control; Matrix effects



### 3.1 Introduction

Multiple contaminants are disseminated in aquatic environments, some of which are not entirely eliminated by water treatment plants [341–345]. Concerns about their potential impacts have motivated the creation of drinking water and environmental waters guidelines for the protection of aquatic resources, as well as the implementation of surveillance activities to monitor the quality of tap water and surface water bodies [346,347]. Anthropogenic compounds such as pharmaceuticals and personal care products (PPCP), pesticides, chemicals for specialty applications (e.g., halogenated flame retardants, perfluoroalkyl substances), and synthetic hormones, among others, are produced in large quantities and may end up in surface waters and drinking water [348–353].

Synthetic hormones such as ethinylestradiol or levonorgestrel (which are parts of contraceptive pills) have been used for decades. In the province of Québec (Canada), which represents a population of *circa* 8 million people, 128 million birth control pills and 107 million hormone replacement therapy (medication for menopausal women) doses are prescribed each year [116,354]. Estrogens are also used as a treatment for certain types of cancer [355]. Androgens represent another notable use of hormones, due to their potential to promote muscle mass and physical strength in humans [356]. In light of their massive use as supplements and the variety of other potential sources, including natural production and release by humans and animals, hormones and their degradation metabolites are now ubiquitous in aquatic environments [221,357–364]. Hormones such as estrone (E1), estradiol (E2), and ethinylestradiol (EE2) bear the potential to elicit endocrine-related effects in non-targeted organisms [57], including developmental [17,18,19–22] and behavioral [356,371] alterations. At the population level, chronic exposure to low part-per-trillion concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) may contribute to the decline in total number of individuals, for instance in fish [57]. In humans, exposure to hormones could be a factor in the decrease of the number of spermatozooids that has been observed in the last decades [90]. The large panel of potential disruptions in humans and wildlife make the study of these compounds relevant from low  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  concentrations [372,373].

Widely used analytical methods for the determination of hormones in water include, notably, liquid chromatography coupled to diode array detection (DAD) [269] or mass spectrometry (MS) [374], and gas chromatography coupled to MS [4,29,30]. Such methods are typically preceded by an off-line solid phase extraction step to reach a suitable concentration factor. Derivatization procedures have also been described both for LC- and GC-based methods [322,377–379]. Despite their acknowledgeable advantages as regards improved method limits of detection (LOD), comprehensive sample pretreatment steps (i.e., off-line SPE and derivatization) may be resource-intensive to implement. Another caveat relates to the possibility of matrix effects which may require sample-specific adjustments [380]. Recent analytical workflows tend to favor the use of on-line pre-concentration of a limited sample volume (1–10 mL) coupled to high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [356,381,382]. While the pre-existing on-line SPE methods paved the way toward higher throughput analysis, some critical knowledge gaps remain to be bridged.

For instance, some previous studies have determined LODs and validation parameters in neat reagent water [382,383]. However, the declared performances may not necessarily correspond to those involving more complex water matrices. In addition, the methodologies employed to determine the LODs may vary considerably between studies, which makes it difficult to draw definite conclusions. The list of endocrine disrupting compounds (EDCs) defined under U.S. EPA Method 539 was recently expanded to include four additional hormones and bisphenol A (BPA) [266]. Monitoring of hormones in Canada is also the subject of continued interest [382]. The rationale for the present study is borne out from the need to achieve adequate sensitivity and quantification performances for an extended range of compounds but using a simplified analytical workflow. To the authors' best knowledge, obtaining analytical performances complying with those stated in Method 539.1 (i.e., in terms of method reporting limits and quality control requirements) has not been previously demonstrated through on-line SPE – LC-MS/MS.

Here, we set out to provide a fast, robust, and sensitive method for the simultaneous analysis of U.S. EPA-priority EDCs (including bisphenol A and 13 hormones) in diverse water matrices. On-line SPE coupled to ultra-high-performance liquid chromatography

triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was investigated for this purpose. The specific aims of this study were the following: i) develop an on-line method capable of capturing an extended range of hormones and BPA with appropriate sensitivity; ii) provide an appropriate quantification strategy to ensure accurate and robust results for each matrix type; iii) verify the compliance of the newly-developed method with regard to acceptability criteria (including internal standard [IS] recoveries); and iv) demonstrate the applicability of the method to a range of field-collected water samples. Regardless of matrix type, the herein described method requires a common sample intake of 10 mL and minimal sample pretreatment (filtration and isotope-labelled IS addition) prior to on-line – UHPLC-MS/MS analysis. Method development, validation and application were conducted on a range of real water matrices (i.e., tap water, surface water, and both influent and effluent wastewater). This is the first study to demonstrate analytical performances compliant with EPA method 539.1 for such an extended range of analyte/matrix combinations. The occurrence of the targeted EDCs was assessed through a regional survey of samples from the provinces of Ontario and Québec (Canada).

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Chemicals and standards

Native standards of estrone (E1),  $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2),  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), estriol (E3), ethinylestradiol (EE2), equilin (EQUI), equilenin (EQUIL), androstenedione (ANDRO), levonorgestrel (LEVO), norethindrone (NOR), testosterone (TESTO), progesterone (PROG), medroxyprogesterone (MPROG), mestranol (MEST) and BPA were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) at a purity of 97% or higher. The structures of the targeted compounds are provided in the Supporting Information (**Figure S3.1**). Isotopically-labelled internal standards (purity  $\geq 98\%$ ), progesterone- $^{13}\text{C}_3$ , mestranol- $\text{d}_4$ , androstenedione- $\text{d}_3$ , estradiol- $^{13}\text{C}_6$  and bisphenol A- $^{13}\text{C}_{12}$  were acquired from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, U.S.A.). Water, acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), and isopropanol (iPrOH) of HPLC-grade quality were obtained from

Fischer Scientific (Whitby, ON, Canada). Sodium chloride (NaCl, purity >99.5%), 2-mercaptopyridine-N-Oxide (Omadine salt, purity 99%), ammonium fluoride (purity >98%) and formic acid (HCOOH, purity >95%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.).

### **3.2.2 Sample collection and pre-treatment**

Water samples were collected in pre-cleaned 250-mL amber glass bottles previously amended with preservative agent (2-mercaptopyridine, 70 mg·L<sup>-1</sup>) and salt (NaCl, 116 mg·L<sup>-1</sup>) used as a dechlorinating agent and an antibacterial growth respectively as proposed earlier [266]. At these concentrations, the aforementioned agents would not be expected to influence solubility and partitioning of the studied EDCs [384,385]. Sample collection in each of the studied matrixes was operated as follows. The tap water was left to flow for 5 min, after which the sample container was filled with the site tap water and sealed. At each surface water or wastewater sampling location, the corresponding container was filled with the site surface water or wastewater, and the bottle was finally sealed. Immediately after sample collection, the bottle was vigorously shaken to homogenize the solution and kept on ice in a dark cooling box (temperature < 4°C). Upon reception at the laboratory, samples were filtered on pre-cleaned glass fiber filters (GFF, 0.3 µm, Sterlitech Corporation, Kent, WA, U.S.A.) and stored at 4°C until analysis, which occurred no later than 28 days from the sampling date [266].

Real water samples from each matrix of interest were collected from the following locations: tap water samples were collected at Université de Montréal, surface water samples were collected from the shores of the Saint-Zephirin River (Nicolet, Quebec), and wastewater both influents and effluents sampled from wastewater treatment plants (WWTP; primary treatment only) located in the Greater Montreal area. After the initial validation had been performed and an appropriate quantification strategy was devised, additional samples were collected for each matrix type to verify the influence of individual sample variation on the *relative* matrix effects. Such samples were collected in 2017-2018 from the following locations: tap water samples were collected from domestic homes in Montréal, Brossard, and Candiac, surface water samples were collected from the shores of

the Rivière des Prairies (Montréal), St-Lawrence River (Boucherville Islands), and Yamaska River (Yamaska), while wastewater samples were collected from three distinct WWTPs from the province of Québec (Canada).

Tap water samples were collected at 11 locations in the provinces of Québec and Ontario (Canada) from domestic homes in December 2016 and January 2017, respectively. For the former, five localities were surveyed (Repentigny, Saint-Hilaire, Saint-Hyacinthe, Sorel, and Granby), while six different localities were selected for the latter (Carleton, Lindsay, Orangeville, Ottawa, Perth, and Toronto). Surface water (river) samples were collected in Québec (Canada) in March 2017 from five different locations: Rivière Richelieu (Upstream Chambly), Rivière Chateauguay (Chateauguay), Rivière des Mille-iles (Terrebonne), and Rivière des Prairies (Repentigny and Montréal). At each location, a duplicate set of samples ( $n = 2$ ) was collected. Wastewater samples (influent and effluent) were collected in the greater Montreal area (Québec, Canada) from 6 distinct WWTP in November or February 2017, respectively.

### **3.2.3 Sample preparation and instrumental analysis**

Water samples were passed through 0.3- $\mu\text{m}$  glass fiber filters [374]. Subsequently, isotope-labelled internal standards were added to each sample for a final concentration of 50  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Each sample was prepared in a glass volumetric flask and an aliquot of filtered sample was then transferred to an amber glass injection vial for on-line SPE – UHPLC-MS/MS analysis.

The instrumental setup consisted of a sample delivery system, a dual switching-column array, and an UHPLC–MS/MS system [386]. The sample delivery system comprised an HTC Thermopal autosampler from CTC analytics AG (Zwingen, Switzerland), used for a 10-mL in-loop sample injection, and an Accela 600 quaternary pump (Thermo Finnigan, San Jose, CA, U.S.A.) used for sample loading onto the on-line SPE column. The online system was composed of two-position six-port and ten-port valves to perform the column switching process (VICIs Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, U.S.A.). On-line SPE was achieved using a set of two Hypersil Gold aQ C18 columns (20 mm x 2 mm, 12  $\mu\text{m}$  particle size) connected in series (Thermo Finnigan, San Jose, CA,

U.S.A.). An Accela 1250 quaternary pump (Thermo Finnigan, San Jose, CA, U.S.A.) was used for sample elution from the SPE column and separation onto the analytical column. Chromatographic separation was performed with a Hypersil Gold C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particle size). The analytical column was thermostated at 50°C. Analyte ionisation was achieved using a heated electrospray ionisation (heated-ESI) source in fast-polarity switching mode. The TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) was operated in selected reaction monitoring mode.

The 10-mL sample loop was filled in excess with the sample. The gradient program comprised three sequential steps: i) the on-line SPE loading and washing step; ii) the elution of analytes and separation onto the analytical column; and iii) the conditioning of the analytical column and on-line SPE column prior to the following injection. The gradient was adjusted to achieve the separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estradiol isomers. The analytical mobile phases (with the heated-ESI source) were HPLC-water (A), methanol (B) and an aqueous solution of ammonium fluoride ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) at a concentration of 1 mM, (C). Further details are provided in the SI (**Table S3.1** and **Figure S3.2**). The injection syringe and six-port injection valve were washed between each run as detailed elsewhere [386]. The overall procedure allowed the detection of all compounds within a single run of 15.5 minutes.

For the optimization of compound-dependent MS parameters, each compound was infused at a concentration of 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in positive (PI) or negative (NI) mode depending on expected polarity ionization. Source parameters with the retained mobile phase were as follows: sheath gas (60 arbitrary unit), auxiliary gas (15 arbitrary unit), sweep gas (0 arbitrary unit), ion spray voltage (+3kV or -3kV, polarity switching), capillary temperature (350°C), vaporizer temperature (400°C). The scan time was set at 20 ms, yielding at least 10 points per chromatographic peak. The first and third quadrupole (Q1 and Q3) were set at unit resolution (0.7 Da FWHM). The collision gas pressure in the collision cell (q2) was fixed at 1.5 mTorr. Compound-dependent MS/MS parameters with the finally retained method are provided in the SI (**Table S3.2**).

### **3.2.4 Method validation**

In this study, optimization or validation tests were performed in different water matrixes (HPLC-grade water, tap water, surface water and wastewater) supplemented with target analytes and internal standards. Validation was conducted to evaluate the method performance in terms of linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), extraction recovery, precision, matrix effects, and whole-process efficiency (i.e., whole-method trueness [387]).

Calibration curves comprised six to eight calibration levels, a linear fit with inverse weighting ( $1/x$ ) being applied to generate the regression line. The spiked levels ranged from  $0.010 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in HPLC water and tap water, and from  $0.10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in surface water or wastewater. The linearity range and determination coefficients ( $R^2$ ) were both examined.

The LOD and the LOQ determination was based on an analyte signal to noise ratio greater than three ( $S/N \geq 3$ ) and greater than ten ( $S/N \geq 10$ ), respectively [387,388] and were determined as standards addition in every matrixes. Other validation including trueness and precision, matrix effects, and recoveries were evaluated as per the procedure described in SI.

### **3.2.5 Quality assurance (QA) / quality control (QC)**

After the initial validation, the compliance of the method to quality assurance and quality control requirements was routinely monitored. Analyte identification was based on compliance of retention times with those in the spiked reference in the different water extracts, observation of both quantification and confirmation transitions, and the conservation of the ratio linked with the latter transitions.

Field blanks were performed by filling collection bottles (previously amended with preservative agent and salt) on site with HPLC-grade water; such samples were then treated in parallel to the real field samples. For each batch of samples, procedural blanks were included and consisted of HPLC-grade water filtered through GFF and added with internal standards prior to on-line SPE – UHPLC-MS/MS analysis. In each sequence, injection blank samples (i.e., HPLC-water aliquots directly submitted to on-line SPE – UHPLC-

MS/MS) were regularly analyzed. No carryover was observed in the four matrices and analytes were not observed in blanks except BPA which was present both in procedural and injection blanks—albeit at low and reproducible levels. The concentrations reported for BPA in real field samples were therefore corrected by the procedural blank contribution of the corresponding sequence.

For each analytical sequence, matrix-matched calibration curves were run for the corresponding sample types. Once the calibration curve had been run, intermediate-level continued verification standards (CVS) were regularly injected to control the chromatographic retention times, analyte absolute areas, and analyte to IS area ratios. The performance endpoints of CVS were compliant with acceptance criteria specified in Method 539.1. An illustration of the control charts established during the present study is enclosed in the SI (**Table S3.3**).

The variability of internal standards among individual samples was also monitored in terms of absolute area and retention time. Overall acceptable variations were noted (SI **Tables S3.4-S3.5**), with suitable recoveries across samples compared to the reference (i.e., the average value derived from the calibration curve [266]) (SI **Table S3.6**). The relative recovery of IS absolute areas was maintained within  $\pm 20\%$ , which is compliant with the performance criterion stated in U.S. EPA method 539.1.



### 3.3 Results and discussion

#### 3.3.1 Instrumental optimization

While various analytical techniques exist for the detection of hormones, those involving UHPLC-MS/MS are increasingly used, with couplings such as APPI (atmospheric pressure photo ionization), APCI (atmospheric pressure chemical ionization), and heated-ESI. According to the literature, most studies mention the use of an (heated)ESI source for the detection of these compounds. Limits of detection reached with this source can be lower than those obtained with APCI or APPI [327,389].

In the present study, APCI and heated-ESI were both examined for their performance. The UHPLC method was modified from a previous work [374] and from U.S. EPA method 539.1 for the determination of hormones and BPA in drinking water samples [266]. The different conditions tested during the optimization allowed the determination of the best performance among APCI or heated-ESI sources. Target analytes were first infused to select suitable operating MS parameters (collision energy, tube lens, sheath gas, auxiliary gas, and corona/capillary voltage) for each condition (Section 2.3). The best sensitivity was also determined upon examination of either acidic (#1) or neutral (#2) analytical mobile phases, using direct injection UHPLC-MS/MS.

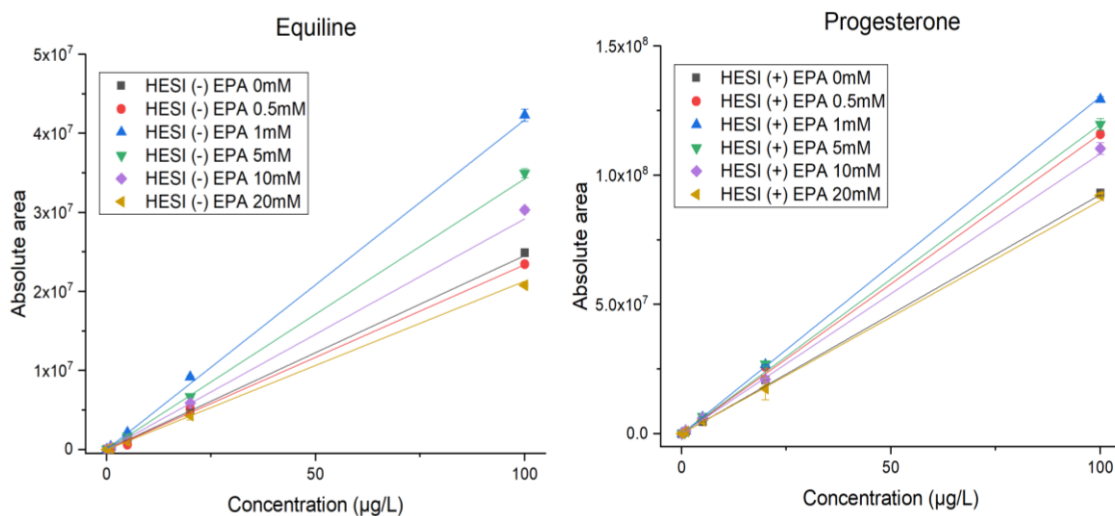
For the heated-ESI or APCI source optimization, mobile phase condition #1 involved using MeOH and H<sub>2</sub>O (50:50, both with 0.1% FA v/v), while mobile phase condition #2 involved using MeOH (A), H<sub>2</sub>O (B) and NH<sub>4</sub>F (20mM) (45/50/5; v/v/v). ESI parameters were previously described in Section 2.4. APCI parameters with mobile phase condition #1 and #2 were optimized and the optimal signal intensities were obtained when applying the following parameters: sheath gas (50 arbitrary unit), auxiliary gas (5 arbitrary unit), sweep gas (0 arbitrary unit), corona discharge (4 kV), capillary temperature (350°C), vaporizer temperature (500°C).

Our results indicate that the source type is indeed a critical robustness factor to optimize to achieve the most desirable sensitivity (data not shown). Heated-ESI appeared as the best choice both for positive mode and negative mode analytes. Analyte absolute areas were, on average, 13-fold higher with heated-ESI compared to those achieved with

APCI. As regards the mobile phase compositions, mobile phase condition #2 (neutral mobile phase) allowed the best LOD in terms of absolute area for all compounds except for mestranol. The latter analyte showed inverse trends concerning the LOD since the best performances were obtained when combining the APCI source and mobile phase condition #1 (SI **Figure S3.3**). Overall, the heated-ESI source combined with mobile phase condition #2 provided the best conditions to analyze the targeted EDCs.

Of note, the effect of using the polarity switching mode (*versus* separate injections for each mode) was also studied (**Figure S3.4**). The loss of sensitivity observed for all analytes was limited when using polarity switching (on average, - 12%), which led to the final selection of the heated-ESI source operated in polarity switching mode and using mobile phase condition #2.

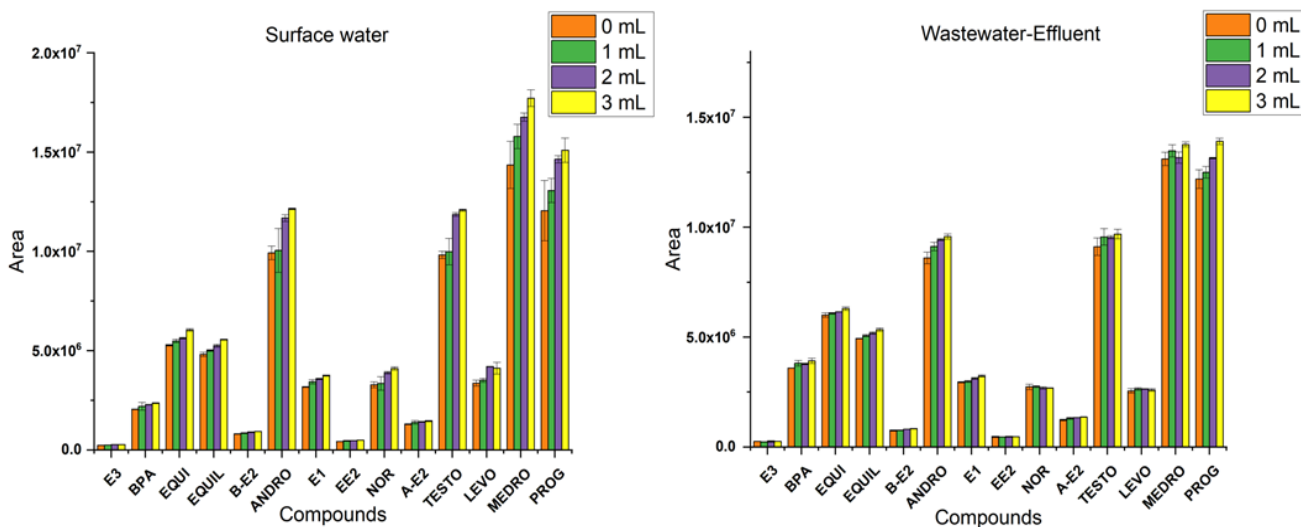
The concentration of mobile phase was adapted from the US. EPA method 539.1 [266], using initially a concentration of 20 mM NH<sub>4</sub>F. It was hypothesized that the concentration of salt could also affect the LOD of the method. Several conditions were tested from 0.50 mM to 20 mM. An illustration of the results obtained for equilin and progesterone is provided in **Figure 3.1**.



**Figure 3.1.** Direct injection UHPLC-MS/MS sensitivity depending on different concentrations of NH<sub>4</sub>F salt. Compounds analyzed in negative mode follow the same trend as equilin (left panel), and those analyzed in positive mode follow the same trend as progesterone (right panel).

The overall trend observed for equilin and progesterone was the same for the majority of positive and negative mode compounds. With a decrease of salt concentration, sensitivity generally increased from 20 mM to 1.0 mM but decreased at lower values (0.5 mM). The opposite was observed in the particular case of mestranol as shown in the SI (**Figure S3.5**); the relatively lower solubility of mestranol in water compared to other compounds could be a factor for the different trend observed [390,391]. A  $\text{NH}_4\text{F}$  concentration of 1 mM was finally selected for the improvement it yielded for most analytes (increase of 1.25-1.50  $\times$  in terms of signal intensity); this also seemed a reasonable compromise, further since mestranol is not currently included under the priority hormones listed by Method 539.1.

To further improve method LOD, on-line pre-concentration coupled to UHPLC-MS/MS was investigated. The choice of the on-line SPE sorbent type was made in accordance with the literature and considering the range of commercially available products. For this purpose, a set of two on-line SPE C18 columns (Hypersil Gold aQ) were connected in series (see also Section 2.4). The use of a 20-mL injection volume was readily discarded due to the typically lower extraction efficiencies [392] and problematic robustness—including progressive back-pressure increase along the LC-MS batch sequence (unpublished data). Based on a previous study [392], a 10-mL sample loading volume could be used for optimal sensitivity. Loading a 10-mL water sample could, however, lead to co-extraction of increased matrix components and salt. Consequently, the possibility of adding a washing step of the on-line SPE column after the sample loading and before the back-flush elution was examined for each matrix type. It was shown that the washing step had a significant effect, the analyte absolute area generally increasing with increasing wash volume, the magnitude of the increase becoming less pronounced between 2 mL and 3 mL, as shown in **Figure 3.2** for surface water and wastewater. An optimal wash volume of 2 mL was therefore applied for all matrix types. This also seemed a reasonable compromise when considering total method running time, solvent consumption, and analytical performance obtained in the subsequent method validation.



**Figure 3.2.** Influence of the on-line SPE wash volume (mL) on analyte absolute area for the 14 targeted EDCs ( $C = 50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, illustrated for surface water (left) and wastewater effluent (right). Error bars indicate standard deviations ( $n = 3$  per condition).

### 3.3.2 Validation of the on-line SPE – UHPLC-MS/MS method

#### 3.3.2.1 On-line SPE recovery

On-line SPE absolute extraction efficiencies were first evaluated, in order to estimate the proportion of analytes that may be lost during the pre-concentration step, although the losses would not affect the overall process efficiency (or whole-method trueness) if the internal standardization and quantification approach are designed appropriately. The extraction efficiency of the on-line SPE sorbent ranged from 64% to 79%, which may be deemed acceptable for an on-line SPE method [309] (**Figure S3.6**). These results are also in agreement with previous on-line SPE methods that reported recoveries between 60% and 100% of various hormones [356,381,392]. Even though a complete extraction recovery could not be attained, it should be highlighted again that the recovery losses were integrated within the quantification procedure, since samples and matrix-matched calibration levels were both submitted to the on-line SPE – UHPLC-MS/MS analysis, ensuring an accurate analysis (see also Section 3.3.2.6).

### 3.3.2.2 Matrix effects and quantification procedure

Matrix effects were evaluated for the newly-developed on-line SPE – UHPLC-MS/MS workflow. The presence of matrix co-occurring compounds can influence the on-line SPE retention and UHPLC chromatographic performances. Matrix effects may also affect the ionization efficiency through signal enhancement or suppression. Matrix effects are not completely understood, but it is hypothesized that co-extracted contaminants, including fulvic or humic acids present in water, could play a role in the observed signal [266] [393].

Raw matrix effects evaluated upon a comparison with the response in reagent water and based on absolute areas, indicated non-negligible (>20%) ion suppression or enhancement (unpublished data). Such absolute matrix effects may not always be fully compensated by internal standard correction. Net matrix effects determined on the basis of analyte to isotope-labelled IS area ratios are shown in **Table S3.7**. According to the matrix effect definition used in the present study (see also Section 2.5), positive values indicate a net analyte to IS signal enhancement compared to the ratio in the matrix-free HPLC-water, while negative values indicate signal suppression. In the case of tap water, matrix effects ranged from - 3% for medroxyprogesterone to - 35% for bisphenol A at the quality control (QC) low level, while matrix effects were rather low at the high spike level (see also **Table S3.7**). In surface water, net matrix effects ranged from -1% for  $\alpha$ -estradiol to -28% for estriol at the low spike level ( $5.0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and between -1% for  $\alpha$ -estradiol to -24% for testosterone at the high spike level ( $160.0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In the case of wastewater, net matrix effects were generally more prevalent, as could be anticipated from the higher matrix complexity together with a relatively high sample loading volume. Net matrix effects in wastewater effluent ranged from -6% for  $\alpha$ -estradiol to +47% for bisphenol A at the low spike level, and from -2% for  $\beta$ -estradiol to +39% for equilin at the high spike level. Net matrix effects in wastewater influent spread between -63% and +39% (**Table S3.7**).

Based on the above, it was preferred to adopt a matrix-matched calibration approach rather than a matrix-free (HPLC-water) approach that could lead to non-negligible underestimation (when signal suppression is reported) or overestimation (when signal

enhancement is reported) of the true concentration in the sample. For each matrix type, a subset of each field sample of the same type was pooled to create a composite sample for addition of natives (at  $\geq 5$  levels) and internal standards (concentration kept constant at  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The resulting matrix-matched calibration curves were constructed by plotting the analyte to IS response ratio as a function of concentration. The concentration in field samples was then determined by dividing the analyte to IS ratio in the sample by the slope of the matrix-matched calibration curve [374].

*Relative* matrix effects were evaluated to determine the response variations between different batches or samples within a same matrix type. The determination of this parameter has received due attention in bioanalytical analyses where it is essential to measure the "batch-to-batch" and/or "sample-to-sample" matrix effects in urine, milk, or blood plasma samples [394,395] due to biological variability, which may not be fully accounted for by a matrix-matched calibration. Here, the relative matrix effects were calculated by comparing the slope of the standard additions (with IS correction) calibration lines established for at least 3 individual samples from the same matrix type but from different locations, and the matrix-matched calibration curve reference used for quantification (also with IS correction). Relative matrix effects ranged from -10% to +9% in tap water and from -11% to +9% in surface water. Even in the case of wastewater, the results obtained were conclusive with relative matrix effects between -15% and +8% in the case of influents and between -3% and +25% in the case of effluents (**Table S3.8**). Overall, relative matrix effects were generally limited within  $\pm 20\%$  in most cases, reflecting the robustness of the presented method. The use of a matrix-match calibration combined with internal standards thus allowed the latter to be effective and relevant for the precise quantification of the analytes present in the study, avoiding the need for detailed standard additions to each individual sample (a strategy which is certainly rigorous but also resource-intensive to implement for large sample series).

### 3.3.2.3 Linearity performance and LOD/LOQ

Analytical figures of merit were evaluated, and included linearity range, determination coefficients, LOD, and LOQ.

The linearity range generally extended over 0.15-200 ng·L<sup>-1</sup> in all matrices. This range is adequate with levels found in the environment which are generally in the vicinity of nanogram per liter levels. For matrix-free HPLC water, tap water, and surface water the herein developed method presented suitable determination coefficients ( $R^2$  always > 0.9940 and in most cases > 0.9990). For wastewater matrixes,  $R^2$  was also determined with values higher than 0.9970 in most cases.

The determined LOD and LOQ are provided in **Table 3.1**. Limits of detection and quantification in matrix-free water (instrumental detection limit) ranged from 0.05 ng·L<sup>-1</sup> to 1.0 ng·L<sup>-1</sup> and from 0.15 ng·L<sup>-1</sup> to 3.0 ng L<sup>-1</sup>, respectively. In the case of tap water, LODs ranged from 0.10 ng·L<sup>-1</sup> to 0.70 ng·L<sup>-1</sup> and LOQ from 0.30 ng·L<sup>-1</sup> to 2.1 ng·L<sup>-1</sup>. In surface water, LOD and LOQ ranged from 0.40 ng·L<sup>-1</sup> to 2.5 ng·L<sup>-1</sup> and from 1.2 ng·L<sup>-1</sup> to 7.5 ng·L<sup>-1</sup>, respectively. LODs for wastewater matrixes (influent and effluent) ranged from 1.0 ng·L<sup>-1</sup> to 5.0 ng·L<sup>-1</sup> and from 0.50 ng·L<sup>-1</sup> to 4.0 ng·L<sup>-1</sup> for wastewater influent and wastewater effluent, respectively. Such LOD/LOQ performance is improved compared to values reported in influent and effluent water matrixes [374]. The herein reported LOD/LOQ performance is also comparable with that determined by Duong et al. in the case of surface water [396], and was improved compared to Naldi et al. for the other two water matrices [382]. Certain studies showed comparable LOD and LOQ performances but to the authors' best knowledge no study has exclusively focused on estrogens, progestogens, androgens, and other EDCs in multiple matrix types with an extended list of compounds [116,308,356,381].

The authors would like to reiterate the importance of potential LOD/LOQ methodological issues. In the present study, limits of detection were determined upon the visual measurement of the signal to noise ratio (S/N) at concentration close to the LOD (S/N typically measured ~ 3–5) and deriving the actual LOD for an S/N = 3. However, other ways to determine the LOD parameter have been reported in the literature. In one study [397], the LOD of EE2 was determined by using the value generated by the software for a sample analyzed at 5 ng·L<sup>-1</sup>. Accordingly, the estimated LOD for EE2 was 0.035 ng·L<sup>-1</sup> in surface water. The referred value of S/N: 444 automatically determined was the key to get the limit of detection previously mentioned. By applying the same method of

LOD determination in a blank surface water matrix and at the same spike concentration (i.e.,  $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), we obtained a limit of detection of  $0.024 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  that was based on a S/N: 633 (**Figure S3.7**). Using this procedure, the performance of the method can be artificially increased but may not be representative of the true sensitivity (i.e., would lead to report lower LODs). Considering the need for accurate and reproducible results between studies, we feel it would be better to avoid deriving LODs based on S/N values differing in several orders of magnitude from the LOD cut-off value of  $\text{S/N} = 3$ . Similarly, the determination of LOQ via the S/N method should imply the analysis of low-level samples to obtain representative S/N values for both quantification and confirmatory MS/MS transitions. Additionally, the conditions for appropriate precision and low bias should already be satisfied at the LOQ, as previously highlighted in precision profile and trueness profile approaches [398].



**Table 3.1.** Summary of R<sup>2</sup>, LODs, and LOQs for the 14 targeted EDCs in the different matrices assayed (TW: tap water; SW: surface water; Inf: wastewater influent; Eff: wastewater effluent).

	LOD (ng/L)					LOQ (ng/L)					R <sup>2</sup>				
	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff
<b>E3</b>	0.30	0.40	1.3	2.5	1.7	0.90	1.2	3.9	7.5	5.1	0.9987	0.9996	0.9986	0.9994	0.9922
<b>BPA</b>	1.0	0.50	1.2	5.0	2.0	3.0	1.5	3.5	15	6.0	0.9943	0.9999	0.9930	0.9990	0.9983
<b>EQUI</b>	0.10	0.15	0.70	1.0	3.0	0.30	0.45	2.1	3.0	9.0	0.9995	0.9991	0.9992	0.9995	0.9925
<b>EQUIL</b>	0.050	0.10	0.40	3.3	1.0	0.15	0.30	1.2	9.9	3.0	1.0000	0.9994	0.9992	0.9997	0.9930
<b>ANDRO</b>	0.10	0.15	0.50	4.8	2.0	0.30	0.45	1.5	14	6.0	0.9999	0.9994	0.9997	0.9993	0.9992
<b>β-E2</b>	0.40	0.60	0.80	3.6	1.0	1.2	1.8	2.4	11	3.0	0.9998	0.9976	0.9998	0.9996	0.9972
<b>E1</b>	0.10	0.30	0.60	3.7	0.50	0.30	0.90	1.8	11	1.5	0.9999	0.9992	0.9996	0.9996	0.9970
<b>EE2</b>	0.30	0.70	1.4	4.6	4.0	0.90	2.1	4.2	14	12	0.9993	0.9997	0.9997	0.9994	0.9929
<b>NOR</b>	0.15	0.30	1.5	4.8	4.0	0.45	0.90	4.5	14	12	0.9999	0.9982	0.9998	0.9993	0.9983
<b>α-E2</b>	0.070	0.25	0.50	5.0	1.0	0.21	0.75	1.5	15	3.0	0.9992	0.9994	0.9999	0.9992	0.9984
<b>TESTO</b>	0.15	0.30	0.70	4.1	2.0	0.45	0.90	2.1	12	6.0	0.9997	0.9992	0.9990	0.9995	0.9972
<b>LEVO</b>	0.30	0.50	2.5	5.0	3.0	0.90	1.5	7.5	15	9.0	0.9993	0.9996	0.9992	0.9991	0.9980
<b>MEDRO</b>	0.10	0.40	0.70	1.0	2.0	0.30	1.2	2.1	3.0	6.0	0.9997	0.9998	0.9998	0.9996	0.9906
<b>PROG</b>	0.20	0.50	1.0	5.0	0.70	0.60	1.5	3.0	15	2.1	0.9991	0.9997	0.9999	0.9990	0.9973

#### 3.3.2.4 Precision and trueness

Regardless of matrix type, suitable intra-day and inter-day precisions were typically obtained (**Table 3.2**), compliant with the acceptability criterion of  $\pm 30\%$  [266]. In matrix-free HPLC water, intra-day precision ranged from 1.9% to 12% for QC1 and from 0.60% to 12% for QC2, and inter-day precision from 1.3% to 18% for QC1 and from 0.50% to 19% for QC2. The method also performed satisfactorily in the case of tap water as intra-day precision was always  $<4.3\%$  for QC1 and  $<3.2\%$  for QC2, and inter-day precision  $<20\%$  for QC1 and  $<16\%$  for QC2. Comparable results were found for the surface water and wastewater (influent and effluent) matrices, which still met the acceptability criterion for precision (**Table 3.2**). The results obtained were also in agreement with the values reported in previous studies [309,381].

**Table 3.2.** Intra-day and inter-day precision (RSD, %) for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (see also Section 2.5).

	Intra-day precision (n = 5)										Inter-day precision (n = 15)									
	QC1 (%)					QC2 (%)					QC1 (%)					QC2 (%)				
	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff
<b>E3</b>	4.0	0.40	3.0	9.0	8.0	8.0	3.0	9.0	1.2	7.0	18	18	4.0	1.0	15	1.1	8.0	7.0	0.40	11
<b>BPA</b>	12	2.0	1.4	5.0	2.0	2.0	0.90	1.1	2.0	1.2	7.0	1.5	16	5.0	33	5.0	1.5	8.0	3.0	0.10
<b>EQUIL</b>	2.0	2.0	3.0	1.6	4.0	6.0	3.0	3.0	1.1	4.0	6.0	20	16	5.0	6.0	10	16	4.0	0.30	8.0
<b>EQUI</b>	1.9	1.0	1.2	3.0	5.0	4.0	2.0	3.0	0.90	1.4	2.0	5.0	9.0	1.0	3.0	2.0	6.0	9.0	1.4	0.60
<b>ANDRO</b>	2.8	0.10	2.0	6.0	1.0	0.60	1.0	0.60	0.60	2.0	3.0	6.0	5.0	0.10	4.0	1.1	2.0	3.0	0.40	0.90
<b>β-E2</b>	3.0	2.0	3.0	1.3	1.5	0.90	0.30	0.40	1.0	1.2	1.3	7.0	8.0	0.60	7.0	0.50	2.0	0.70	3.0	3.0
<b>E1</b>	3.0	1.0	4.0	4.0	4.0	2.0	3.0	2.0	0.90	1.7	5.0	7.0	1.2	0.30	5.0	6.0	3.0	8.0	4.0	9.0
<b>EE2</b>	5.0	1.0	1.5	11	19	3.0	2.0	5.0	2.0	4.0	5.0	9.0	12	5.0	4.0	2.0	2.0	1.2	1.4	1.8
<b>NOR</b>	10	0.70	4.0	4.0	9.0	1.5	3.0	4.0	0.90	5.0	13	18	3.0	0.50	7.0	8.0	8.0	4.0	3.0	6.0
<b>α-E2</b>	3.0	3.0	2.0	3.0	7.0	1.7	3.0	0.90	1.0	5.0	1.3	11	6.0	2.0	19	4.0	5.0	7.0	1.8	2.0
<b>TESTO</b>	12	0.30	1.7	7.0	11	6.0	1.4	4.0	0.60	3.0	15	6.0	14	1.1	0.20	19	1.7	6.0	2.0	2.0
<b>LEVO</b>	12	4.0	1.0	6.0	16	8.0	3.0	9.0	1.0	6.0	13	8.0	5.0	9.0	11	5.0	6.0	9.0	1.9	1.2
<b>MEDRO</b>	9.0	1.0	4.0	4.0	15	12	2.0	3.0	1.5	2.0	7.0	7.0	0.70	3.0	10	10	9.0	5.0	3.0	15
<b>PROG</b>	5.0	0.50	1.9	3.0	1.5	1.4	1.0	1.2	0.60	1.2	12	6.0	5.0	0.50	12	3.0	3.0	2.0	0.50	2.0

Whole-method trueness was determined for each matrix type (**Table 3.3**) and proved satisfactory (overall range: 72–100%). For matrix-free water, whole-method trueness ranged from 83% to 100% at QC1 and from 87% to 100% at QC2. Such results are in agreement with the acceptability criterion of  $\pm 30\%$  (i.e., trueness range = 70–130%) usually set in U.S. EPA methods [266]. For tap water, trueness values were equally acceptable, as trueness ranged from 80% to 99% at QC1 and from 89% to 100% at QC2. Similar results were found for the surface water matrix (**Table 3.3**). Even in the case of the complex wastewater matrix effluent, trueness remained suitable, with values ranging between 74% and 97% at QC1 and between 72% and 96% at QC2. Such performances are comparable to or better than values reported in similar studies on hormones [381,392].

**Table 3.3.** Trueness (%) in HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf), and wastewater effluent (Eff), determined at two spike levels (see also Section 2.5).

	Trueness (%)									
	QC1 (%)					QC2 (%)				
	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff
<b>E3</b>	83	80	75	97	97	96	89	90	96	94
<b>BPA</b>	96	96	86	85	87	92	99	99	90	88
<b>EQUIL</b>	90	86	85	90	77	87	94	96	91	78
<b>EQUI</b>	90	88	86	84	93	92	98	91	95	74
<b>ANDRO</b>	100	82	83	96	92	97	99	90	98	95
<b><math>\beta</math>-E2</b>	91	85	75	85	85	99	100	91	95	72
<b>E1</b>	89	87	94	100	90	96	96	96	91	96
<b>EE2</b>	85	86	85	90	74	97	96	96	97	78
<b>NOR</b>	99	89	89	93	77	89	96	96	97	91
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	90	83	80	86	87	96	95	88	96	89
<b>TESTO</b>	93	99	81	97	97	97	93	88	99	93
<b>LEVO</b>	98	89	94	96	75	98	99	86	95	86
<b>MEDRO</b>	87	95	90	97	89	97	90	96	96	93
<b>PROG</b>	99	98	82	95	84	93	98	98	99	84

### 3.3.3 Method demonstration to water samples from Eastern Canada

Water samples representative of the different matrixes were analyzed. Raw sewage, treated wastewater samples and surface water were collected from Quebec sites (see also Section 2.2) while tap water samples were collected from Quebec and Ontario locations (Canada).

In raw sewage samples from the Greater Montreal area (Quebec, Canada), estriol (E3), bisphenol A (BPA), equilin (EQUI), androstenedione (ANDRO),  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), estrone (E1),  $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2), testosterone (TESTO), and levonorgestrel (LEVO) were variously quantified. The individual levels ranged from 4.6 ng·L<sup>-1</sup> to 300 ng·L<sup>-1</sup>. When considering the sum of 14 targeted EDC, concentrations ranged from 38 ng·L<sup>-1</sup> to 360 ng·L<sup>-1</sup>. The most recurrent compounds were natural hormones except for the synthetic

levonorgestrel that was found in most of the sites with levels ranging from 26 ng·L<sup>-1</sup> to 300 ng·L<sup>-1</sup> (**Table 3.4**). Levels found for these analytes are comparable to those detected in other studies and confirm the non-negligible quantities at which these compounds can be found [116,308,356]. Determined levels are consistent with previous results coming from raw sewage samples from Canada that mentioned concentrations ranging from 26 ng·L<sup>-1</sup> to 495 ng·L<sup>-1</sup> for E3 and from 22 ng·L<sup>-1</sup> to 170 ng·L<sup>-1</sup> for LEVO [116,285]. Bisphenol A (BPA) was found at concentrations ranging from 24 ng·L<sup>-1</sup> to 41 ng·L<sup>-1</sup> for sites C and D, respectively.

**Table 3.4.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in raw sewage (WWTP influent) measured at selected WWTP in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L<sup>-1</sup>. ND = not determined.

Values are expressed as: mean  $\pm$  SD

Raw sewage (Wastewater influent)						
	Site A	Site B	Site C	Site D	Site E	Site F
<b>E3</b>	ND	ND	ND	92 $\pm$ 9.0	ND	ND
<b>BPA</b>	ND	ND	41 $\pm$ 4.2	24 $\pm$ 2.8	ND	ND
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	4.6 $\pm$ 0.10
<b>ANDRO</b>	74 $\pm$ 5.2	ND	21 $\pm$ 2.4	ND	10 $\pm$ 3.4	8.3 $\pm$ 1.8
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	15 $\pm$ 1.3	ND	6.3 $\pm$ 1.7
<b>E1</b>	ND	ND	ND	21 $\pm$ 2.8	ND	ND
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND
<b>TESTO</b>	13 $\pm$ 0.30	< LOQ	ND	ND	ND	14 $\pm$ 0.50
<b>LEVO</b>	145 $\pm$ 43	73 $\pm$ 3.7	299 $\pm$ 17	ND	27 $\pm$ 1.8	26 $\pm$ 1.7
<b>PROG</b>	ND	< LOQ	< LOQ	ND	ND	ND
$\Sigma$ EDC	232	73	361	153	37	59

**Table 3.5** shows the quantified hormones in treated (effluent) wastewater samples from Quebec, Canada. E3, BPA, EQUIL,  $\beta$ -E2, E1, NOR, TESTO, and PROG were variously reported. Individual concentrations of EDCs ranged from 1.7 ng·L<sup>-1</sup> to 240 ng·L<sup>-1</sup>, while cumulative concentrations ranged from 260 ng·L<sup>-1</sup> to 790 ng·L<sup>-1</sup>. Bisphenol A (BPA) was particularly ubiquitous (occurrence at each studied site) with a concentration range of 60

ng·L<sup>-1</sup> to 234 ng·L<sup>-1</sup> (**Table 3.5**), similar with those reported in wastewater treatment plants from China [399]. Some compounds such as progesterone, β-estradiol and testosterone were present at levels ranging from 4.0 ng·L<sup>-1</sup> to 25 ng·L<sup>-1</sup>, from 0.20 ng·L<sup>-1</sup> to 157 ng·L<sup>-1</sup> and from 0.20 ng·L<sup>-1</sup> to 124 ng·L<sup>-1</sup>, respectively in samples from Quebec (Montreal) or China (Beijing) [252,285]. Most of the compounds found in these wastewater samples were natural or endogenous hormones while only one site showed significant concentration of the synthetic hormone norethindrone (Site C).

**Table 3.5.** Individual concentrations and total concentrations (ΣEDC) of the targeted endocrine disruptors in the treated effluent of selected WWTPs in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L<sup>-1</sup>.

	Wastewater effluent				
	Site A	Site B	Site C	Site D	Site E
<b>E3</b>	113 ± 1.6	95 ± 8.7	75 ± 11	ND	241 ± 22
<b>BPA</b>	134 ± 3.8	60 ± 4.6	234 ± 10	189 ± 4.8	211 ± 0.90
<b>EQUIL</b>	4.7 ± 0.50	8.6 ± 0.60	6.4 ± 0.20	ND	7.0 ± 0.70
<b>β-E2</b>	122 ± 4.5	45 ± 0.30	43 ± 0.20	31 ± 0.70	94 ± 4.3
<b>E1</b>	14 ± 0.10	15 ± 0.10	14 ± 0.30	44 ± 0.50	33 ± 1.5
<b>NOR</b>	ND	ND	2.0 ± 0.20	ND	132 ± 2.2
<b>α-E2</b>	< LOQ	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	42 ± 4.6	41 ± 3.6	23 ± 0.80	ND	59 ± 2.5
<b>PROG</b>	7.3 ± 0.30	8.6 ± 0.20	14 ± 0.70	< LOQ	13 ± 1.4
<b>ΣEDC</b>	<b>437</b>	<b>273</b>	<b>434</b>	<b>264</b>	<b>790</b>

It must be emphasized that this study focused on dissolved EDCs measured after filtration. Interaction with the suspended particulate phase will be critical to fully explain the fate within the treatment plants (and environmental fate beyond, as it is released). Furthermore, a significant proportion of hormones excreted by humans occur as conjugated form such as glucuronide or sulfate conjugates (which would not be observed by this method). Such conjugated forms will nevertheless be relatively quickly deconjugated in the environment and within water treatment plants. This can result in an apparent increase in (free) hormone concentrations within the water as it passes through the wastewater treatment plant [285,382,400–402].

Several samples were collected across the province of Quebec in order to determine levels of targeted endocrine disruptors that can be found in rivers that potentially serve as drinking water sources (**Table 3.6**). Only two compounds were systematically quantified across the 5 surveyed sites: bisphenol A and norethindrone. Estrone,  $\beta$ -estradiol and medroxyprogesterone were solely quantified at 1/5 site while androstenedione,  $\alpha$ -estradiol, testosterone and progesterone were variously detected but remained always <LOQ. Bisphenol A was the main contributor to the sum of 14 targeted EDCs in the case of surface water samples with concentrations ranging from 3.9 ng·L<sup>-1</sup> to 17 ng·L<sup>-1</sup> (i.e., contributions ranging from 55% to 89% of the sum of 14 EDCs). The BPA concentrations reported in our work were in the same range as those reported by Jin et al. for lakes and rivers from China (4.2 ng·L<sup>-1</sup> to 141 ng·L<sup>-1</sup>) [403]. In the latter study, the occurrence of BPA was 100%, similar to the findings from the present study. The second most abundant target analyte was norethindrone, with concentrations ranging from 1.7 ng·L<sup>-1</sup> to 2.7 ng·L<sup>-1</sup> (**Table 3.6**). In a previous study, Ciofi et al. found comparable levels of estrogens in rivers with concentrations ranging from 0.53 ng·L<sup>-1</sup> to 4.5 ng·L<sup>-1</sup> for water courses in Italy, while Duong et al. found relatively higher levels in South Korea ranging from 3.2 ng·L<sup>-1</sup> to 130 ng·L<sup>-1</sup> [271,396].

**Table 3.6.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in surface water at different locations in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L<sup>-1</sup>.

Surface water					
Compounds	Chateauguay	Upstream Chambly	Repentigny	Terrebonne	Montréal
<b>BPA</b>	5.1 ± 0.18	3.9 ± 1.0	17 ± 1.9	7.4 ± 0.51	5.8 ± 0.76
<b>ANDRO</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	1.7 ± 0.010
<b>E1</b>	< LOQ	0.50 ± 0.37	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	< LOQ
<b>NOR</b>	1.7 ± 0.050	2.7 ± 0.17	2.1 ± 0.20	2.1 ± 0.030	2.3 ± 0.050
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	< LOQ	ND	< LOQ	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	0.40	ND	ND
<b>PROG</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	<b>6.8</b>	<b>7.1</b>	<b>19</b>	<b>9.5</b>	<b>9.8</b>



Estriol (E3),  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), norethindrone (NOR), and progesterone (PROG) were variously detected in tap water from Quebec province (**Table 3.7**). Total concentrations of target EDCs in tap water were <LOQ, with one exception at  $1.2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Levels found for these analytes in the dissolved phase are similar to those detected in other studies and confirm the background levels for this type of compounds [375,382]. Similar levels of EDCs were found in tap water samples from Ontario (**Table 3.7**), albeit a smaller range of compounds could be detected. Results showed the presence of bisphenol A (BPA) at three different locations but at concentrations <LOQ. Androstenedione (ANDRO) was found at only two locations while testosterone (TESTO) was detected or quantified at three locations as shown in **Table 3.7**. Among the studied compounds, levels ranged from  $0.81 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (ANDRO) to  $2.8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\beta$ -E2) in one of the surveyed localities.

**Table 3.7.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in different tap water samples from selected municipalities in two Canadian provinces (Quebec and Ontario). Concentrations are expressed in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

<b>Tap water (Québec)</b>					
	<b>Repentigny</b>	<b>Saint-Hilaire</b>	<b>Saint-Hyacinthe</b>	<b>Sorel</b>	<b>Granby</b>
<b>E3</b>	<LOQ	$1.2 \pm 0.37$	<LOQ	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	<LOQ
<b>NOR</b>	<LOQ	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ
<b>PROG</b>	ND	ND	<LOQ	ND	ND
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	<LOQ	<b>1.2</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<b>Tap water (Ontario)</b>						
	<b>Carleton</b>	<b>Lindsay</b>	<b>Orangeville</b>	<b>Ottawa</b>	<b>Perth</b>	<b>Toronto</b>
<b>BPA</b>	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	2.8	ND	ND
<b>ANDRO</b>	$1.0 \pm 0.020$	$0.81 \pm 0.070$	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	<LOQ	ND	ND	<LOQ	ND	2.1
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	<b>1.0</b>	<b>0.81</b>	<LOQ	<b>2.8</b>	<LOQ	<b>2.1</b>

### 3.3.4 Contribution of the study to the state-of-art

Some pre-existing analytical methods for endocrine disruptors performed satisfactorily in clean water [347,383], but their transferability to multiple environmental matrices and an extended range of compounds had not been investigated. The herein study describes an alternative analytical method to analyze the expanded scope of EPA-priority EDCs, based on on-line SPE–UHPLC-MS/MS. Using this faster approach, we demonstrated performances equivalent to those stated in Method 539-1 (for drinking water), and further confirmed its applicability to other sample types.

A substantial number of matrices and validation endpoints were therefore ascertained in this study. One of the advantages of the present work consists in the applicability of the method to four different matrices with an extended range of targeted compounds, including those from the list of recently updated EPA Method 539.1. Previous methods may differ from this in terms of performance and/or range of targeted analytes. A first study can achieve lower detection limits but for a small number of compounds and a high sample volume (250 mL) requiring multiple off-line sample preparation steps and longer instrumental analysis time [404]. Another study was based on an on-line SPE approach and the use of an injection volume similar to that of our study, but using a different source technology [374] that did not yield the same LOD performance.

The developed method used a relatively low sample volume (10 mL) compared to off-line methods that tend to use larger amounts of sample from 250 mL to 1 L [404,405]. The developed method represents a compromise between analysis time, higher sample throughput capabilities, sample volume, and simplicity for the analysis of BPA, androgenic, progestogenic and estrogenic steroid hormones in a single run. The LODs and LOQs were sufficiently low to detect and quantify them in tap water, surface water and wastewater samples (Section 3.3). The final method showed suitable chromatographic performances (see also SI Figure S8). The asymmetry factor generally ranged between 1.2-1.35 and the tailing factor between 1.1-1.2. These values are within acceptable range according to EU Commission and US Pharmacopeia [406–408]. The method was compliant with QA/QC requirements, including trueness of CVC standards and internal standard recoveries (SI **Table S3.6**), making it eligible for the analysis of long sample series.

### 3.4 Conclusions

A fast, sensitive, and robust on-line SPE – UHPLC-MS/MS workflow was evaluated for the analysis of U.S. EPA-priority endocrine disruptor compounds. The suitable selectivity and sensitivity of the present analytical method allowed for the detection of bisphenol A, estrogens, progestagens, androgens and steroids at or below  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  levels in diverse environmental water samples. The method is based on a simple pre-filtration of the samples through GFF, followed by the addition of isotope-labelled internal standards and direct analysis by on-line SPE – UHPLC-MS/MS. Compared to off-line SPE based methods, this represents a considerable improvement in total analysis time. For the first time, the compliance to EPA method 539.1 performance criteria was validated for an extended scope of EDCs and matrix combinations (tap water, surface water, and wastewater influents and effluents). The method performed satisfactorily in terms of trueness (bias generally comprised within  $\pm 10\%$ ), linearity ( $R^2 > 0.9980$  in most cases), and internal standard variations across samples ( $\pm 18\%$ ).

Some of the targeted endocrine disruptive compounds (EDCs) were detected in the different types of field-collected samples, confirming their ubiquitous presence in aquatic ecosystems. Bisphenol A,  $\beta$ -estradiol, norethindrone, testosterone, androstenedione, ethinylestradiol, and estriol were detected in tap water samples ( $< \text{LOD} - 2.8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Bisphenol A, estrone, norethindrone, and  $\beta$ -estradiol were detected in surface water samples ( $0.40 - 17 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Estriol, Bisphenol A, equilin, androstenedione,  $\beta$ -Estradiol, estrone, testosterone, and levonorgestrel were variously detected in raw sewage samples ( $< \text{LOD} - 300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while estriol, bisphenol A, equilenin,  $\beta$ -estradiol, estrone, norethindrone,  $\alpha$ -estradiol, testosterone, and progesterone were found in treated wastewater effluents ( $< \text{LOD} - 240 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank Dr. Carl Fisher and Jonathan Beck (Thermo Fisher Scientific) for valuable discussions and technical support. We also acknowledge Yves Fontaine from École Polytechnique de Montréal for assistance in field sampling. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at Polytechnique Montréal, and the Canadian Foundation for Innovation.

### 3.5 Supplementary Material

#### Additional details on the validation procedure

On-line extraction efficiencies were determined by comparing the mean absolute peak area ( $n = 5$ ;  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of a 10-mL sample analyzed by the present on-line SPE – UHPLC-MS/MS method, compared to small volume injection ( $25 \text{ }\mu\text{L}$ ) of an equivalent amount into the UHPLC-MS/MS system.

Intra-day precision was determined at two concentration levels (QC1 and QC2) based on the relative standard deviation of the analyte to IS area ratio, and was calculated with five replicates analyzed within the same working day and repeated on a second ( $n = 5$ ) and third work day ( $n = 5$ ). Inter-day precision was derived from the overall relative standard deviation ( $n = 15$  for each of the QC levels examined). Considering the requirements related to each matrix, the spiked concentration for QC1 was  $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for HPLC water,  $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for tap water or surface water, and  $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for wastewater. QC2 was set at a concentration of  $150 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for all sample types.

To devise an appropriate quantification strategy, matrix effects were first evaluated based on the analyte to IS area ratios in spiked tap water, surface water, and effluent wastewater, compared to those determined in matrix-free HPLC-water, as defined hereafter:

$$\text{Matrix effect (\%)} = (((R_{\text{matrix}} - R_{\text{blank}}) / R_{\text{solvent}}) - 1) * 100$$

Where  $R_{\text{matrix}}$  represents the area ratio found in the spiked sample corresponding to the selected matrix,  $R_{\text{blank}}$  represents the area ratio found in the unspiked sample corresponding to the selected matrix, and  $R_{\text{solvent}}$  represents the area ratio found in the spiked sample in neat solvent (i.e., HPLC-water).

As a matrix-matched calibration approach with IS standardization was selected for quantification, the possibility of relative matrix effects occurring with individual sample variation was investigated. For each matrix type, relative matrix effects were evaluated based on the comparison of the calibration curve slope obtained by standard additions to various individual samples, compared to that determined upon a matrix-matched (composite) approach:

$$\begin{aligned} & \textit{Relative matrix effect}_{\textit{sample } i} (\%) \\ &= \left( \left( S_{\textit{standard additions, sample } i} / S_{\textit{matrix matched}} \right) - 1 \right) * 100 \end{aligned}$$

For each matrix type, trueness (%) was determined at the two concentration levels previously defined for the precision assessment (QC1 and QC2, n = 3 each), as per the following formula:

$$\textit{Trueness} (\%) = (C_{\textit{measured}} / C_{\textit{expected}}) * 100$$

Where  $C_{\text{measured}}$  represents the spiked concentration quantified upon the retained calibration curve approach (i.e., matrix-matched), and  $C_{\text{expected}}$  represents the theoretical spiked concentration in the sample.

In accordance with EPA requirements, trueness was considered acceptable if the measured concentration remained within  $\pm 30\%$  of the theoretical one (i.e., trueness range = 70–130%).

**Table S3.1.** Chromatographic conditions for the on-line SPE – UHPLC-MS/MS analysis of hormones and bisphenol A.

Analytical pump						Loading pump				
	Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flow rate (μL/min)	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (μL/min)	
Column washing	0.00	0	95	5	500	0.00	100	0	1500	Loading step
	3.00	0	95	5	500	7.00	100	0	1500	
Column re-equilibration	3.01	55	40	5	500	7.10	0	100	3500	Loop washing
	7.00	55	40	5	500	10.00	0	100	3500	
Elution and chromatographic separation	13.00	20	75	5	500	10.01	100	0	2000	SPE column washing and re-equilibration
	15.00	0	95	5	500	15.00	100	0	2000	
Column washing	15.50	0	95	5	500	15.50	100	0	2000	

**Table S3.2.** Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS; SRM) parameters for the targeted analytes in both positive and negative mode.

Compounds	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	RF lens (V)	Collision energy (V)	Relative intensity	IS
<b>E3</b>	287	145	105	43	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		171	105	39	1	
<b>BPA</b>	227	133	66	28	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		212	66	19	1	
<b>EQUIL</b>	265	221	82	36	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		222	82	29	2	
<b>EQUI</b>	267	143	75	35	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		265	75	25	1	
<b>ANDRO</b>	287	97	52	24	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	52	26	2	
<b>β-E2</b>	271	145	88	42	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	88	42	1	
<b>E1</b>	269	145	97	41	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		159	97	39	2	
<b>EE2</b>	295	145	97	43	1	Ethinylestradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
		159	97	37	2	
<b>NOR</b>	299	91	56	44	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	53	2	
<b>α-E2</b>	271	145	95	44	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	95	39	2	
<b>TESTO</b>	289	97	54	24	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	54	27	1	
<b>LEVO</b>	313	91	56	45	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	59	2	
<b>MEDRO</b>	345	97	58	28	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		123	58	27	1	
<b>PROG</b>	315	97	55	24	2	Progesterone-d <sub>9</sub>
		109	55	27	1	



**Table S3.3.** Illustration of the variability (RSD, %) of intermediate-level continued verification standards (CVS) injected to control the chromatographic retention times (RT), analyte absolute areas (Area), and native analyte to internal standard area ratios ( $A_N/A_{IS}$ ) along the on-line SPE UHPLC-MS/MS analytical sequence. The relative standard deviation performance (RSD, %) is illustrated here in the case of 5 CVS samples injected regularly along a sequence comprising 30 surface water samples.

	CVS (%RSD)		
	RT	Area	$A_N/A_{IS}$
<b>E3</b>	0.15	7.4	11
<b>BPA</b>	0.15	19	16
<b>EQUIL</b>	0.14	11	5.2
<b>EQUI</b>	0.14	14	2.7
<b><math>\beta</math>-E2</b>	0.14	9.7	5.8
<b>ANDRO</b>	0.13	9.0	3.9
<b>E1</b>	0.16	11	3.4
<b>EE2</b>	0.11	10	5.4
<b>NOR</b>	0.13	7.0	6.5
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	0.14	11	7.0
<b>TESTO</b>	0.12	5.8	5.6
<b>LEVO</b>	0.12	6.8	6.1
<b>MPROG</b>	0.13	6.4	6.7
<b>PROG</b>	0.12	4.3	5.2
<b>BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub></b>	0.14	14	-
<b><math>\beta</math>-E2-<sup>13</sup>C<sub>6</sub></b>	0.13	13	-
<b>ANDRO-<sup>13</sup>C<sub>3</sub></b>	0.13	9.8	-
<b>EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub></b>	0.11	14	-
<b>PROG-D<sub>9</sub></b>	0.13	3.7	-

**Table S3.4.** Verification of IS variability (% RSD) in terms of absolute area across samples (amended at 50 ng L<sup>-1</sup> with isotope-labelled IS) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, for the different matrix types (HPLC: matrix-free HPLC water; TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent).

	HPLC	TW	SW	WW-Inf	WW-Eff
	(% RSD of absolute area)				
<b>BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub></b>	9.0	9.2	8.1	8.6	7.9
<b>β-E2-<sup>13</sup>C<sub>6</sub></b>	14	8.5	8.0	11	3.8
<b>ANDRO-<sup>13</sup>C<sub>3</sub></b>	18	11	6.2	4.8	3.1
<b>EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub></b>	4.8	10	7.8	10	11
<b>PROG-D<sub>9</sub></b>	12	11	5.1	5.7	6.3

**Table S3.5.** Verification of IS variability (% RSD) in terms of chromatographic retention time (RT) across individual samples (amended at 50 ng L<sup>-1</sup> with isotope-labelled IS) analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, for the different matrix types (HPLC: matrix-free HPLC water; TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent).

	HPLC	TW	SW	WW-Inf	WW-Inf
	(% RSD of RT)				
<b>BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub></b>	0.59	0.31	0.16	0.26	0.08
<b>β-E2-<sup>13</sup>C<sub>6</sub></b>	0.58	0.25	0.14	0.23	0.08
<b>ANDRO-<sup>13</sup>C<sub>3</sub></b>	0.46	0.22	0.14	0.22	0.06
<b>EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub></b>	0.55	0.22	0.14	0.22	0.07
<b>PROG-D<sub>9</sub></b>	0.47	0.16	0.10	0.17	0.09

**Table S3.6.** Verification of IS relative recovery (mean  $\pm$  SD) across individual field samples analyzed by on-line SPE – UHPLC-MS/MS, across the four matrix types (TW: tap water; SW: surface water; WW-Inf: wastewater influent; WW-Eff: wastewater effluent).

	IS relative recovery (%)			
	TW	SW	WW-Inf	WW-Eff
<b>BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub></b>	102 $\pm$ 16	86 $\pm$ 1.0	114 $\pm$ 12	97 $\pm$ 10
<b><math>\beta</math>-E2-<sup>13</sup>C<sub>6</sub></b>	98 $\pm$ 14	88 $\pm$ 3.3	117 $\pm$ 15	89 $\pm$ 17
<b>ANDRO-<sup>13</sup>C<sub>3</sub></b>	82 $\pm$ 7.0	103 $\pm$ 5.4	106 $\pm$ 5.0	97 $\pm$ 4.4
<b>EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub></b>	101 $\pm$ 16	88 $\pm$ 3.2	114 $\pm$ 13	115 $\pm$ 15
<b>PROG-D<sub>9</sub></b>	111 $\pm$ 12	101 $\pm$ 3.8	107 $\pm$ 6.4	98 $\pm$ 13

**Table S3.7.** Matrix effects at high level concentration (C = 160 ng·L<sup>-1</sup>) for the four different matrixes. A negative value indicates ion suppression with respect to matrix-free (HPLC) water, while a positive value indicates signal enhancement with respect to matrix-free (HPLC) water.

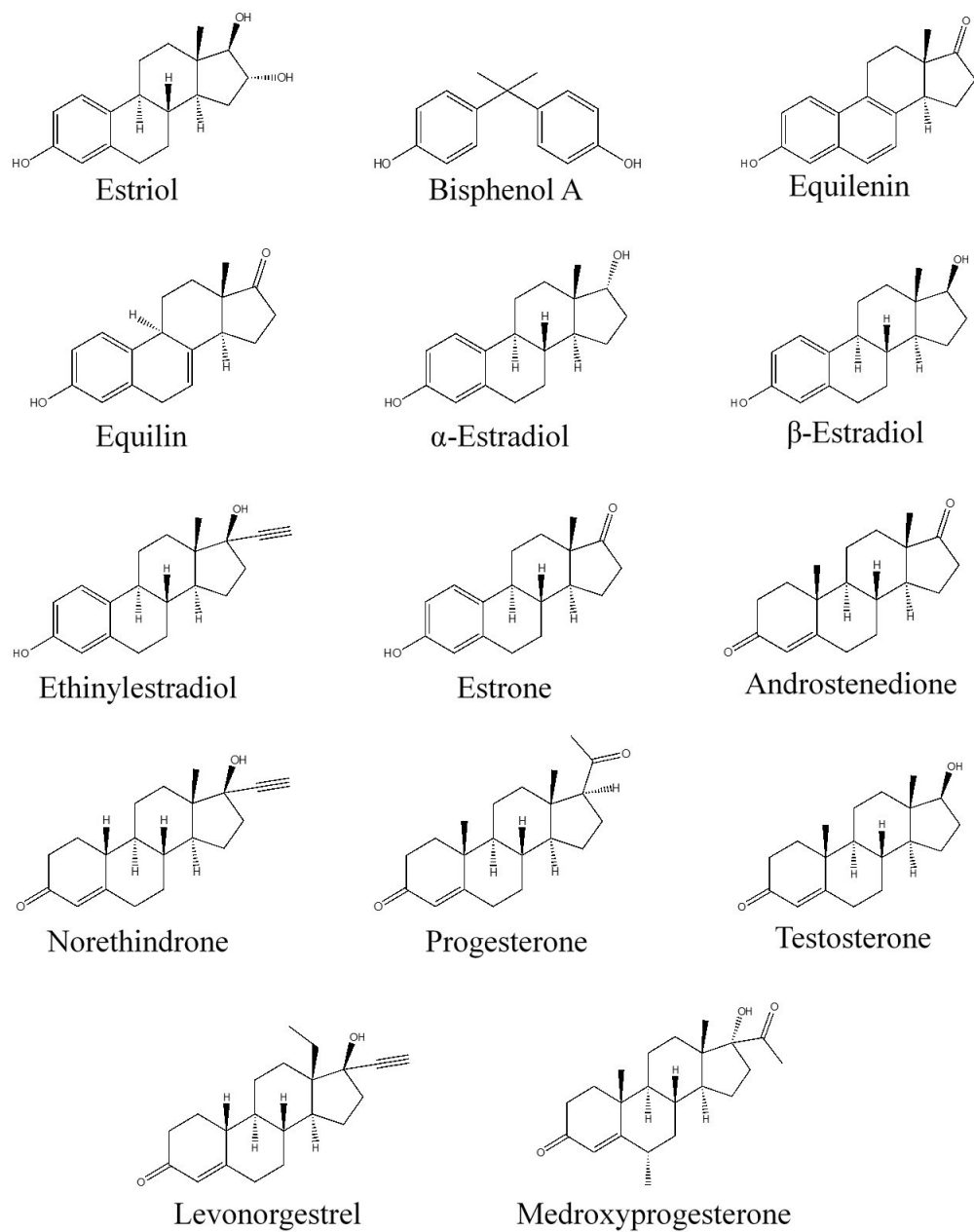
	Matrix effect							
	Tap water	Surface water	Wastewater-Influent	Wastewater-Effluent	Tap water	Surface water	Wastewater-Influent	Wastewater-Effluent
	QC1 (%)				QC2 (%)			
<b>E3</b>	25 $\pm$ 18	-28 $\pm$ 6.0	-33 $\pm$ 5.7	34 $\pm$ 4.4	8.0 $\pm$ 3.9	8.0 $\pm$ 7.1	-34 $\pm$ 3.3	13 $\pm$ 3.9
<b>BPA</b>	-35 $\pm$ 5.1	-26 $\pm$ 2.4	33 $\pm$ 9.1	46 $\pm$ 11	-12 $\pm$ 2.7	-1.3 $\pm$ 2.5	5.9 $\pm$ 2.0	20 $\pm$ 5.8
<b>EQUIL</b>	18 $\pm$ 2.1	5.1 $\pm$ 2.4	-63 $\pm$ 4.0	32 $\pm$ 4.2	0.51 $\pm$ 1.3	-10 $\pm$ 3.1	-57 $\pm$ 2.4	13 $\pm$ 3.8
<b>EQUI</b>	20 $\pm$ 2.7	24 $\pm$ 0.30	-17 $\pm$ 3.1	29 $\pm$ 3.0	8.1 $\pm$ 3.4	20 $\pm$ 1.6	-20 $\pm$ 4.0	39 $\pm$ 1.6
<b>ANDRO</b>	-9.6 $\pm$ 0.8	-4.7 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 1.2	-16 $\pm$ 1.6	-1.3 $\pm$ 1.2	-3.4 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.80	-2.1 $\pm$ 0.30
<b><math>\beta</math>-E2</b>	6.3 $\pm$ 1.1	9.4 $\pm$ 2.2	-15 $\pm$ 5.0	-16 $\pm$ 2.4	-3.0 $\pm$ 1.2	-3.2 $\pm$ 3.2	-3.8 $\pm$ 1.4	-2.0 $\pm$ 0.50
<b>E1</b>	11.9 $\pm$ 2.4	11 $\pm$ 0.9	-19 $\pm$ 2.9	19 $\pm$ 3.1	2.7 $\pm$ 2.7	8.5 $\pm$ 2.0	-8.1 $\pm$ 3.0	-4.0 $\pm$ 2.4
<b>EE2</b>	-14 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 2.1	22 $\pm$ 7.0	47 $\pm$ 7.3	-5.5 $\pm$ 1.2	-4.5 $\pm$ 5.0	1.6 $\pm$ 1.0	13 $\pm$ 7.9
<b>NOR</b>	-12 $\pm$ 1.7	-17 $\pm$ 4.8	-35 $\pm$ 4.0	-28 $\pm$ 10	-10 $\pm$ 2.8	-20 $\pm$ 6.2	-20 $\pm$ 2.0	-20 $\pm$ 3.8
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	3.1 $\pm$ 1.6	-1.4 $\pm$ 2.9	10 $\pm$ 5.0	-5.9 $\pm$ 3.9	6.2 $\pm$ 5.3	-0.90 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 2.3	-5.0 $\pm$ 3.1
<b>TESTO</b>	-15 $\pm$ 3.8	-28 $\pm$ 1.6	-31 $\pm$ 24	-31 $\pm$ 24	-6.8 $\pm$ 3.3	-24 $\pm$ 1.8	-31 $\pm$ 24	-15 $\pm$ 4.5
<b>LEVO</b>	-22 $\pm$ 5.3	-27 $\pm$ 4.0	-43 $\pm$ 11	-28 $\pm$ 18	-24 $\pm$ 8.6	-23 $\pm$ 1.7	-40 $\pm$ 2.0	-24 $\pm$ 5.5
<b>MEDRO</b>	-2.8 $\pm$ 6.0	4.4 $\pm$ 2.3	15 $\pm$ 5.4	-23 $\pm$ 7.8	-2.0 $\pm$ 3.6	4.2 $\pm$ 4.7	24 $\pm$ 1.2	-6.0 $\pm$ 11
<b>PROG</b>	-12 $\pm$ 1.3	-6.3 $\pm$ 0.80	4.3 $\pm$ 2.0	-8.6 $\pm$ 2.1	-3.5 $\pm$ 1.4	-8.2 $\pm$ 2.2	6.3 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.81

**Table S3.8-(a).** Relative matrix effects established comparing the slope of individual sample and the matrix-match line for the four different matrixes. Ion suppression results a negative value while signal enhancement results a positive value.

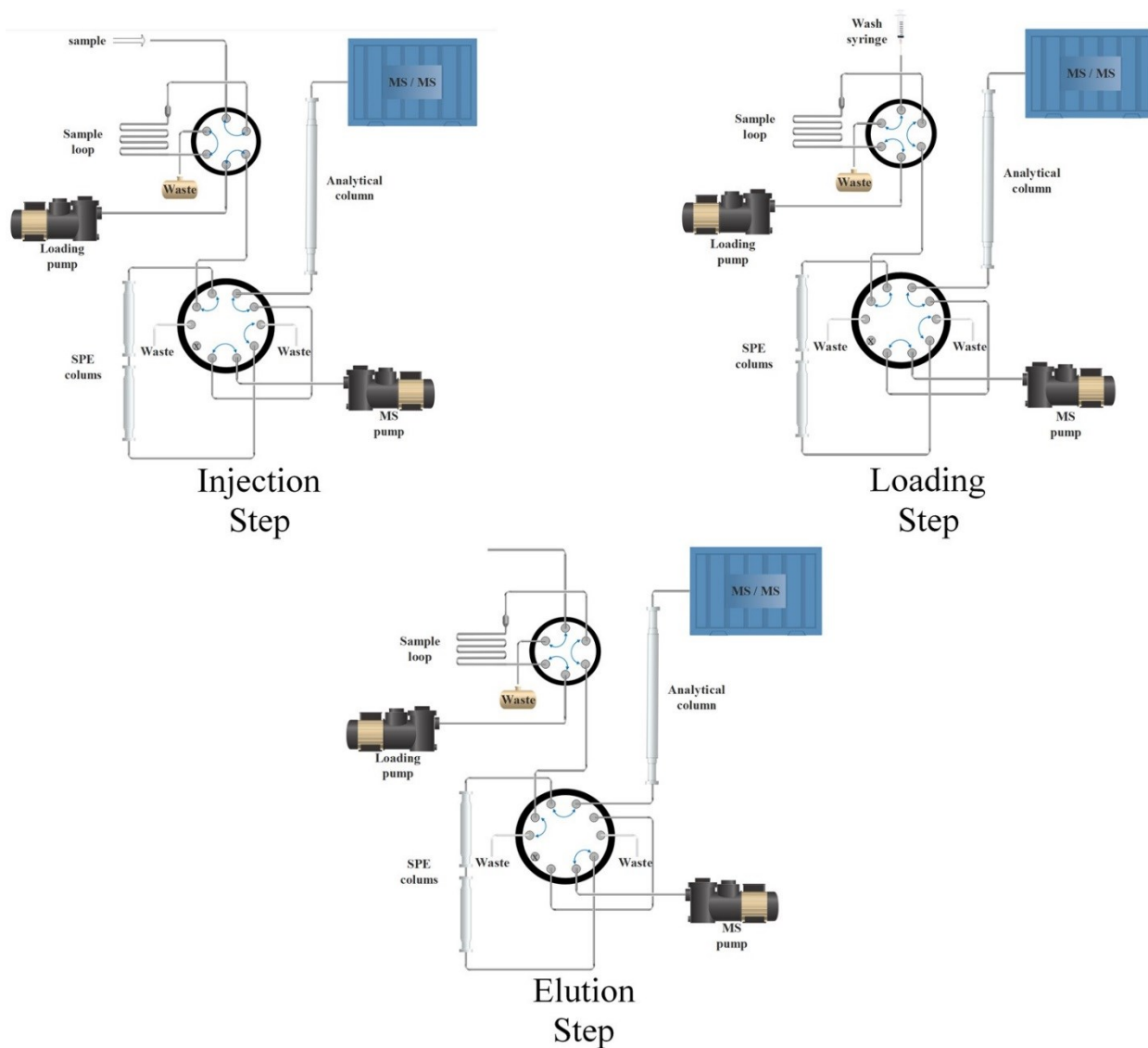
Relative matrix effect								
	Tap water				Surface water			
	Mean ± SD	Montreal	Brossard	Candiac	Mean ± SD	Montreal	Boucherville Island	Yamaska river
<b>E3</b>	-10 ± 2.2	-7.9	-10	-12	-11 ± 5.5	-9.7	-5.6	-16
<b>BPA</b>	2.6 ± 4.0	3.7	-1.8	6.0	-2.1 ± 5.7	4.3	-4.3	-6.4
<b>EQUIL</b>	8.6 ± 1.6	7.1	10	8.3	7.4 ± 6.8	15	3.8	3.1
<b>EQUI</b>	7.0 ± 3.7	6.1	3.8	11	3.1 ± 1.6	3.8	1.3	4.3
<b>ANDRO</b>	0.50 ± 3.7	1.4	-5.0	4.5	0.7 ± 1.7	5.5	5.7	10
<b>β-E2</b>	0.30 ± 4.9	0.70	-3.9	3.5	7.1 ± 2.7	-1.2	1.9	1.5
<b>E1</b>	0.2 ± 2.8	-0.10	-3.1	2.6	2.3 ± 4.8	-2.9	3.2	6.5
<b>EE2</b>	-2.0 ± 6.9	-1.6	-9.1	4.8	1.6 ± 1.5	2.7	-0.20	2.1
<b>NOR</b>	0.90 ± 2.7	-2.1	3.1	1.5	9.0 ± 6.2	8.2	3.3	15
<b>α-E2</b>	3.4 ± 5.9	5.2	-3.3	8.1	1.4 ± 4.6	-3.8	3.3	4.8
<b>TESTO</b>	-4.8 ± 4.0	-9.1	-1.2	-4.1	1.7 ± 2.7	-0.30	0.50	4.7
<b>LEVO</b>	-2.2 ± 4.2	-6.1	2.3	-2.8	1.1 ± 5.4	-4.8	2.3	5.8
<b>MEDRO</b>	-3.5 ± 3.2	-0.4	-3.3	-6.7	-9.5 ± 9.8	-21	-2.6	-5.1
<b>PROG</b>	0.50 ± 3.7	2.0	-3.8	3.2	8.5 ± 1.9	6.3	9.9	9.2

**Table S3.8-(b).** Relative matrix effects established comparing the slope of individual sample and the matrix-match line for the four different matrixes. Ion suppression results a negative value while signal enhancement results a positive value.

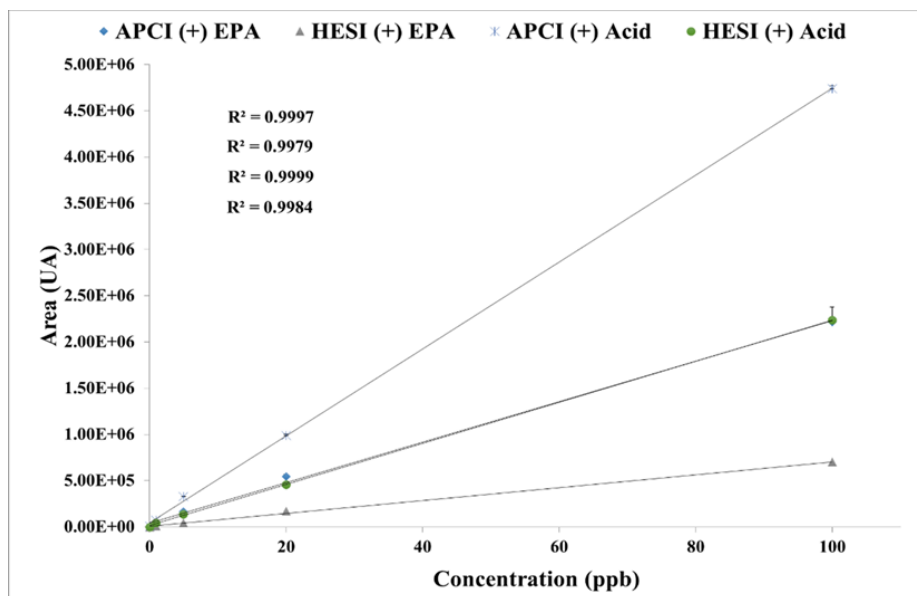
Relative matrix effect								
	WW-Inf				WW-Eff			
	Mean ± SD	Site A	Site B	Site C	Mean ± SD	Site A	Site B	Site C
<b>E3</b>	6.5 ± 4.7	3.1	9.8	-13	0.2 ± 2.8	-0.50	-2.2	3.3
<b>BPA</b>	-15 ± 6.3	-20	-16	-7.9	0.2 ± 8.2	-9.1	7.0	1.6
<b>EQUIL</b>	-12 ± 4.9	-13	-16	-6.4	5.4 ± 7.6	0.010	-11	17
<b>EQUI</b>	-11 ± 2.7	-13	-13	-8.1	2.5 ± 6.3	7.0	-2.0	24
<b>ANDRO</b>	0.30 ± 7.0	-1.4	-1.9	2.8	1.2 ± 0.8	-17	-1.0	11
<b>β-E2</b>	-0.20 ± 2.6	8.0	-1.7	-5.6	5.2 ± 8.9	0.50	2.1	1.1
<b>E1</b>	-9.2 ± 4.8	-13	-11	-3.8	25 ± 6.8	30	21	-9.3
<b>EE2</b>	-8.6 ± 3.3	-11	-10	-4.8	7.8 ± 3.2	7.0	11	5.1
<b>NOR</b>	7.8 ± 1.4	6.9	7.2	9.4	3.9 ± 2.6	6.7	1.8	3.1
<b>α-E2</b>	-14 ± 5.9	-17	-17	-6.8	7.1 ± 7.9	11	-2.0	13
<b>TESTO</b>	1.2 ± 6.3	-2.5	-2.5	8.4	10 ± 4.5	11	14	4.9
<b>LEVO</b>	0.50 ± 5.6	-3.8	-1.7	6.8	17 ± 6.5	-17	22	13
<b>MEDRO</b>	2.8 ± 7.2	1.9	-3.9	10	0.10 ± 2.6	0.70	2.2	-2.8
<b>PROG</b>	-4.7 ± 6.2	-0.40	-2.7	-12	-2.9 ± 5.1	-3.2	2.4	-7.7



**Figure S3.1.** Chemical structures of targeted hormones studied in the present work.

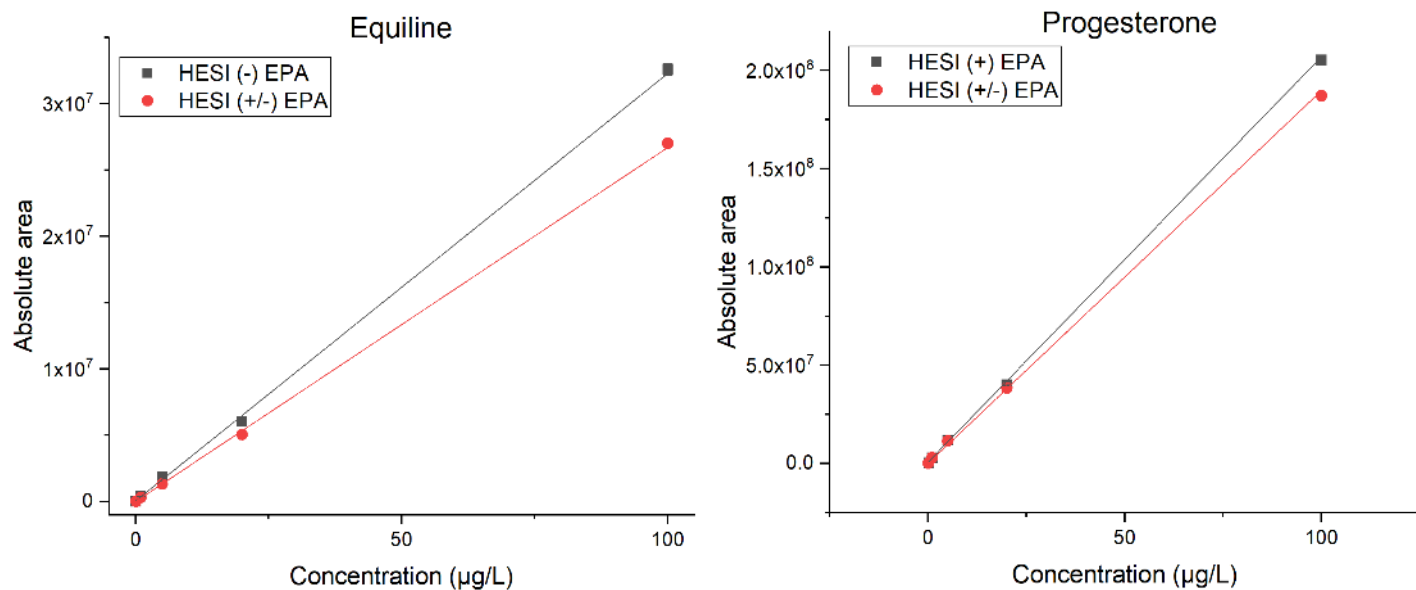


**Figure S3.2.** On-line setup and procedure for the presented analytical method. Step 1 represent the load of the sample in the 10 mL loop while the MS mobile phase is conditioning the analytical column. Step 2 shows the pre-concentration of analytes on the tandem-SPE-columns. Step 3 describes the washing step of the 10 mL loop and the elution of analytes to the chromatographic column and MS/MS detection.

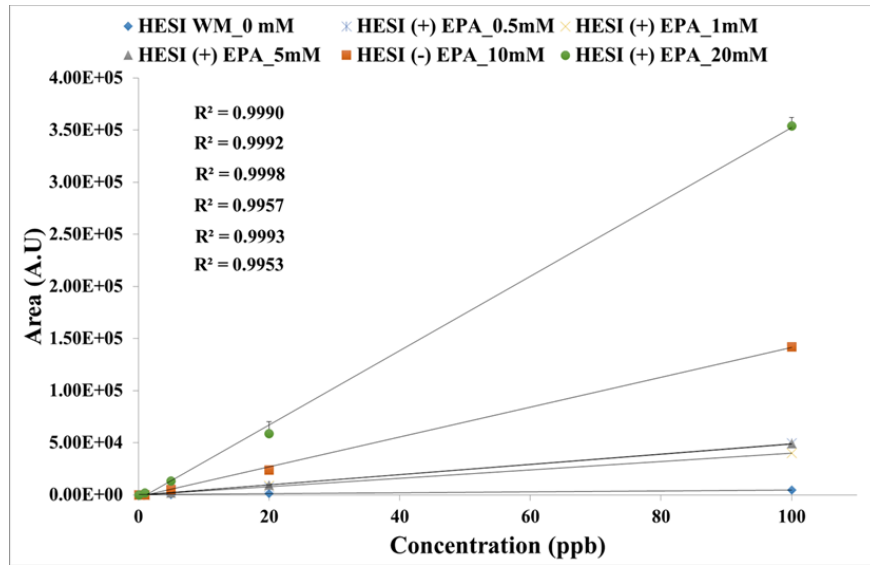


**Figure S3.3.** Relative sensitivity depending on different sources (APCI Vs. heated-ESI) and mobile phases in the particular case of mestranol.

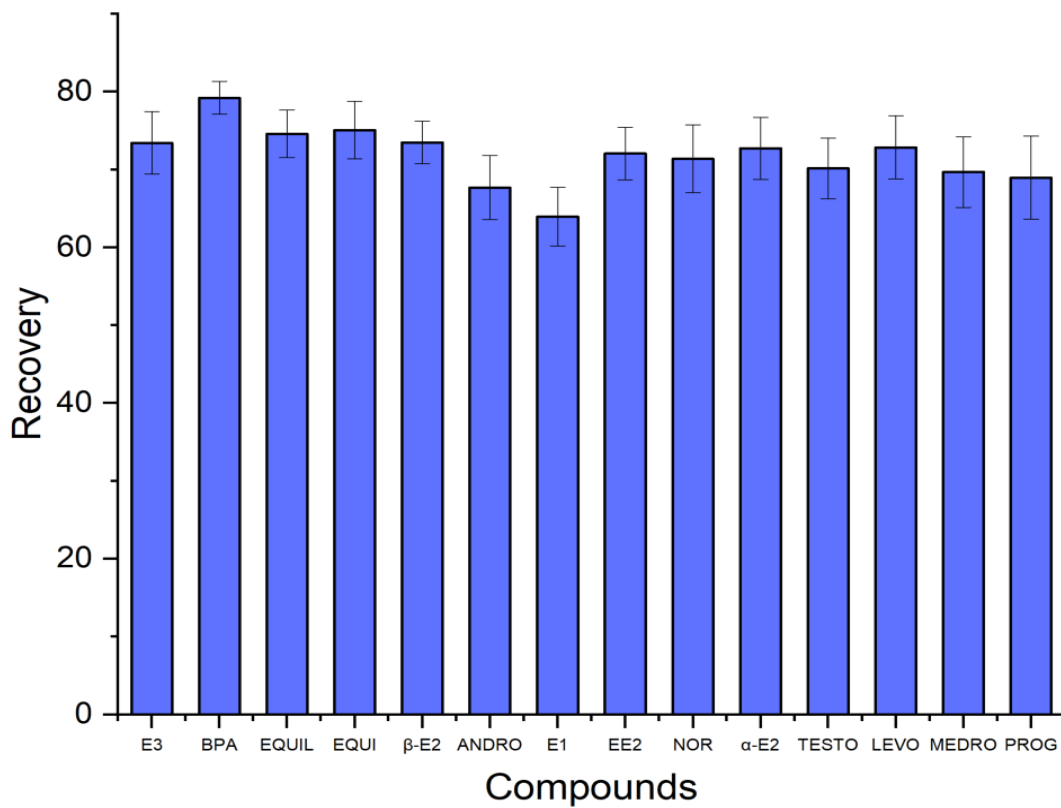




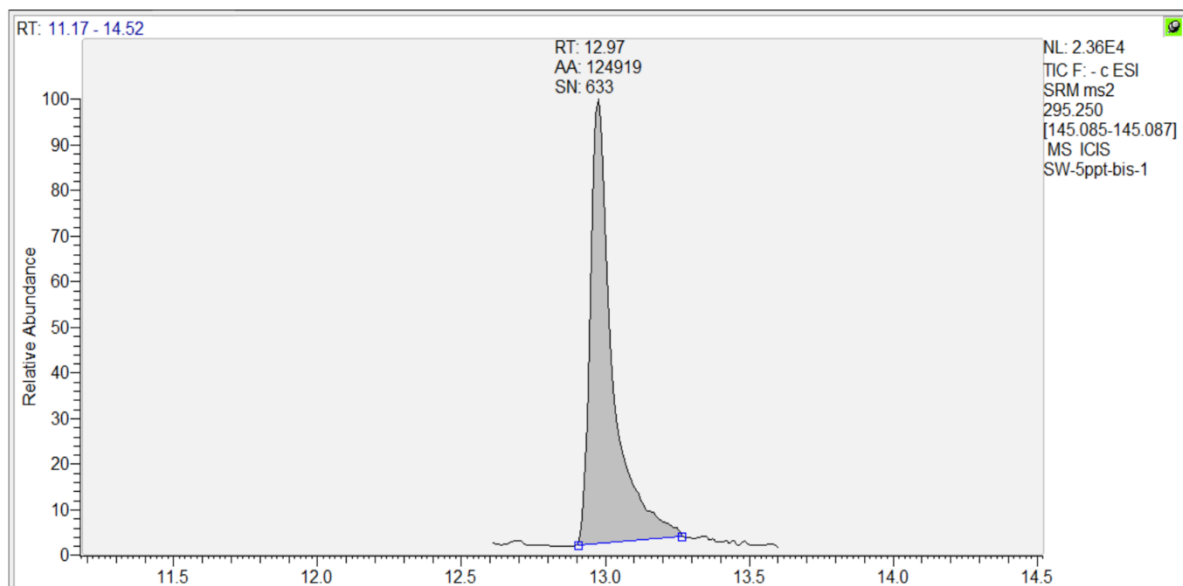
**Figure S3.4.** Relative sensitivity depending on using the polarity-switching mode (+/-) or single ionization modes, (-) or (+). Compounds analysed in positive mode follow the same trend as progesterone (right panel) and those analysed in negative mode follow the same trend as equilin (left panel).



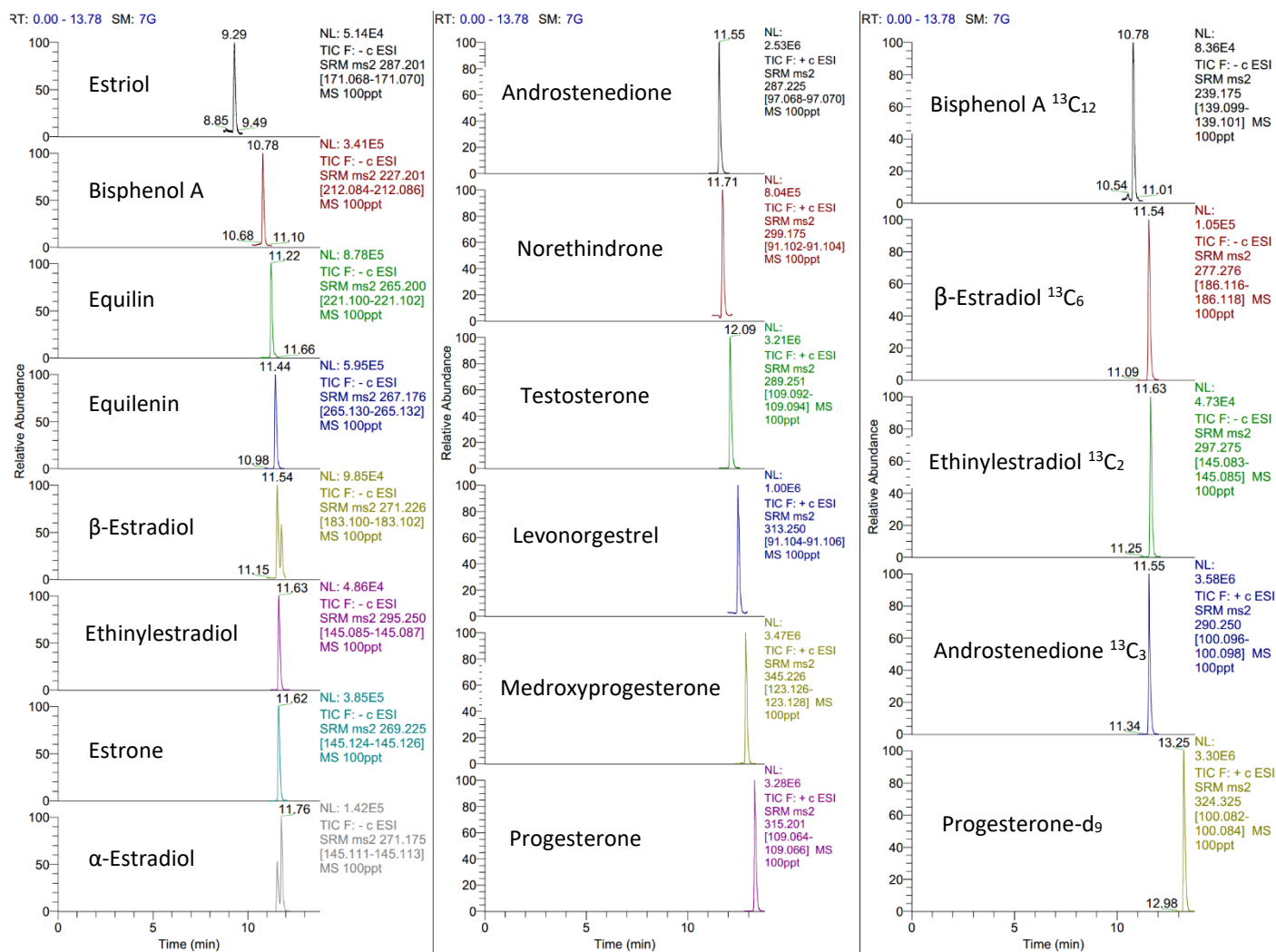
**Figure S3.5.** Relative sensitivity depending on the different salt concentrations in the case of mestranol.



**Figure S3.6.** Online recoveries for studied hormones and Bisphenol A (BPA). Reported values range from 64 to 79%



**Figure S3.7.** SRM chromatogram of EE2 in a spiked surface water sample at 5 ng·L<sup>-1</sup>. Signal over the noise was automatically determined.



**Figure S3.8.** On-line SPE – UHPLC-MS/MS chromatograms of the 14 hormones (quantification transition;  $C = 100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and the five internal standards (isotope-labelled ISs) with the finally retained conditions: analytical mobile phase composition ( $\text{H}_2\text{O}$ :methanol), on-line SPE loading mobile phase ( $\text{H}_2\text{O}$  HPLC with 0.1%  $\text{HCOOH}$ ), on-line SPE loading flow rate ( $1500 \mu\text{L min}^{-1}$ ) and sample volume ( $10 \text{ mL}$ ).

# **Chapitre 4. Évaluation d'une extraction automatisée hors ligne sur phase solide suivie d'une analyse par LC-MS/MS pour la surveillance des perturbateurs endocriniens sur la liste prioritaire de l'EPA dans l'eau du robinet, les eaux de surface et les eaux usées**

Article publié dans Talanta (2022) 241: 123216

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>

**“Assessment of automated off-line solid-phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater”.**

Auteurs : Ken Goeury, Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Michèle Prévost, Sébastien Sauvé

Description : Article traitant de l'applicabilité et des limitations potentielles d'une méthode analytique basée sur la technique de SPE manuelle, l'analyse des échantillons étant réalisée par HPLC-MS/MS de manière analogue à celle évoquée dans le chapitre précédent. Une attention particulière a été portée sur le choix de la cartouche SPE et d'autres facteurs pouvant influencer les performances de la méthode. La méthode fut ensuite appliquée à l'analyse d'échantillons réels provenant des différentes matrices étudiées.

Contributions: Avec l'aide de mon superviseur, j'ai effectué la conception du projet. J'ai réalisé l'ensemble la collecte des échantillons sur le terrain ainsi que la réalisation des manipulations en laboratoire. Par la suite, j'ai procédé au traitement de données et à la rédaction de l'article.

Co-auteurs: Sung Vo Duy et Gabriel Munoz m'ont aidé à réviser l'article.

Co-directrice: Michèle Prévost m'a aidé à réviser l'article.

Directeur: Sébastien Sauvé m'a aidé à la conception du projet et à la révision de l'article.

## Abstract

EPA method 539.1 recently introduced an expanded list of priority endocrine-disrupting compounds (EDCs), some of which were also included in the Unregulated Contaminant Monitoring Rule 3 (UCMR3). Though standardized methods are available for drinking water, analysis of steroid hormones and bisphenol A (BPA) at the ultra-trace level remains challenging. This study set out to evaluate the suitability of automated off-line solid-phase extraction (SPE) liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the determination of EPA-priority EDCs in environmental water matrixes (tap water, surface water, and wastewater influents and effluents). The target molecules included 14 steroid hormones (altrenogest, androstenedione, equilenin, equilin,  $\alpha$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol, estriol, estrone, ethinylestradiol, levonorgestrel, medroxyprogesterone, norethindrone, progesterone, testosterone) and BPA. Factors that may influence the analytical performance were assessed. This involved, for instance, testing combinations of SPE materials from different brands and protocol variations. Several materials presented absolute extraction efficiencies in acceptable ranges. Initial sample pH, nature of reconstitution medium, and mobile phase salt concentration were among the potential factors affecting analyte signal. Storage conditions (different preservative agents) possibly exerted the strongest influence, in agreement with the literature. Limits of detection were in the range of 0.03-0.5 ng/L in drinking water, 0.1-0.5 ng/L in surface water, and 0.16-1 ng/L in wastewater. Method validation also involved testing linearity, accuracy, and precision in reagent water and matrix-matched extracted calibrants. The method was applied to field-collected water samples in Eastern Canada. Summed EDC concentrations remained low in tap water (<LOQ-0.92 ng/L), while higher detection frequencies and contamination levels were reported in riverine surface waters (2.6-37 ng/L) and municipal wastewaters (10-424 ng/L).

### Keywords

EPA-priority endocrine disruptors; Steroid hormones and bisphenol A; Drinking water; Municipal wastewater; UHPLC-MS/MS validation; Factors influencing method performance

## 4.1 Introduction

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are commonly introduced in the environment via sewage treatment plant effluents, land application of municipal and agricultural biosolids, industrial emissions, and a myriad of other sources. Steroid hormones have garnered particular attention because of their implication in reproductive disturbances from low exposure levels. For instance, the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) used in hormone replacement therapy and as active ingredient of contraceptive pills [409], and the naturally-occurring estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and estriol (E3), were reported to alter oogenesis in female fish and induce the production of vitellogenin in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) and zebrafish (*Danio rerio*) even at environmental concentrations (5, 25 and 100 ng/L) [57,410]. EE2 is of high current concern due to potentially higher persistence and affinity to estrogen receptors of these species [371,411] compared to natural analogs. Research conducted in the Experimental Lakes Area in northwestern Ontario, Canada, evaluated the reproductive sublethal effects of EE2 in fish and amphibians [57,412]. One study showed that low concentrations (5-6 ng/L) of EE2 supplied to the whole lake resulted in a catastrophic decline of fathead minnow (*Pimephales promelas*) in the span of a few years [57]. Steroid hormones of concern also include androgens such as testosterone (naturally produced but also used to enhance muscle mass and physical strength in humans [413,414]) and anabolic steroids (e.g., trenbolone ester prodrugs), the synthetic progestin levonorgestrel, and a host of other compounds. Concentrations of levonorgestrel slightly higher than 1 ng/L have been implicated in masculinization phenomena of female fathead minnow (*Pimephales promelas*) [415,416]. Mixtures of steroid hormones can act additively on certain apical endpoints (e.g., reproduction) [416,417] and genetic expression [371]. In addition to reproductive disturbances, steroid hormones are also implicated in other sublethal effects including behavioral alterations [371]. Some hormone mimics, such as bisphenol A (BPA), are also under scrutiny due to their potential to elicit endocrine disrupting effects in animals, including humans [418,419].

Dense human population centers represent a major source of release of natural and synthetic hormones to the environment. For instance, it was estimated that during human pregnancy, up to 30 mg of estrogens can be excreted daily by urine (mainly E3, as sulfuric



and glucuronic acid conjugates). The estrogenic hormone E3, the androgenic hormone testosterone (TESTO), and the xenoestrogen BPA were among the targeted EDCs with highest concentrations in treated effluents of municipal wastewater treatment plants (WWTPs) [265,420]. Concentrations can in fact be higher in treated effluents than raw influents due to microbially-mediated deconjugation [421]. In river waters influenced by wastewater outfalls, concentrations are typically in the low ng/L level range and may vary seasonally according to variable dilution effects and degradation processes [422,423]. Though not currently regulated in drinking water, several steroid hormones are included on the Contaminant Candidate List of the US EPA, some of which were screened in the Unregulated Contaminant Monitoring Rule 3 (UCMR3). Of >1000 drinking-water aquifers screened for pharmaceuticals and hormones in the US, less than 1% presented detectable residues of BPA (LOD of 160 ng/L) and 0.1% of testosterone (LOD of 1.6 ng/L) [424]. Even lower levels can be expected for finished drinking water, and hormones thus often remain below detection limits in such samples [34,184,351,425].

There is a wide range of analytical methods available for the determination of hormones in water samples [273,327,426–428]. Liquid chromatography coupled to diode array detection (LC-DAD) or mass spectrometry (LC-MS), and gas chromatography coupled to MS have been applied [378,379,429–432]. Analytical hurdles faced during the determination of EDCs in water samples can be numerous and are not limited to the instrument detection capabilities. Sample preservation is a critical initial step that can severely affect the analytical accuracy. Baronti et al. evaluated the effect of various storage treatments on the recovery of four estrogens in river water; even with 1% formalin added as preservative, substantial losses (~40%) were reported after a 2-month storage period at 4 °C [265]. Acidic preservation appeared to stabilize concentrations of steroid hormones in runoff water over 14 days of storage, while addition of sodium azide did not [433]. Much steeper degradation trends were observed during storage stability trials of dissolved steroid hormones in WWTP effluents, especially for samples with no preservative added [264]. Losses can also occur during the multi-step extraction process, which often involves solid-phase extraction (SPE). Sample loading volume and SPE sorbent amount/nature are among the critical parameters to optimize [264]. Potentially severe matrix effects can alter the apparent analyte recovery and may not be fully compensated by isotope dilution

quantification. For instance, GC-MS/MS analyses of SPE extracts yielded suitable recoveries and precision in deionized water but not in wastewater influents [434].

US EPA method 539 (*Determination of hormones in drinking water by LC-ESI-MS/MS*) was recently expanded to the analysis of 12 hormones and bisphenol A (Method 539.1). In the draft standard method [266], drinking water samples are collected in bottles containing 2-mercaptopyridine-1-oxide sodium salt (hereafter referred as ‘sodium omadine’) as a dechlorinating and antimicrobial preservation agent, amended with sodium chloride prior extraction, and submitted to off-line SPE (Waters Oasis HLB cartridges, 150 mg/6 cc) using a vacuum manifold. After extract reconstitution and internal standard addition, samples are subjected to LC-MS/MS. A certain degree of flexibility is left to analysts, provided that quality control performances would be met as part of the initial demonstration of capability [266]. A previous study reported suitable recoveries of natural and synthetic hormones in wastewater upon testing of EPA method 1694 (pharmaceuticals and personal care products), which also involves off-line SPE and LC-MS/MS determination [435]. Though standardized methods are often designated for specific matrix types, multi-residue determination methods can be evaluated in a broader range of matrices for environmental application, with some protocol adjustments [397,434,435].

Here, we evaluated large volume automated SPE with ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the determination of EDCs at the ultra-trace level. The overarching objective was to design an easy-to-implement automated off-line SPE method capable of extracting a range of EPA-priority EDCs in diverse water samples. The ionization source and analytical mobile phase salt concentration were previously highlighted as important factors of analyte response in a related study [420]. Other parameters that could influence the analytical process were investigated here, including preservative amendment, selection of the SPE adsorbent, sample pH adjustment, and final reconstitution medium. This is also one of the few EDC studies to conduct a systematic method validation in vastly different water matrixes, from ultrapure water to drinking water, ambient water, and wastewater. Demonstration of method applicability was conducted as part of a pilot survey of municipal wastewater influents and effluents, river surface water, and point-of-use tap water collected in southwestern Québec (Canada).

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Chemicals and standards

Certified standards of altrenogest (ALT), androstenedione (ANDRO), ethinylestradiol (EE2),  $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2),  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), estriol (E3), estrone (E1), equilin (EQUI), equilenin (EQUIL), levonorgestrel (LEVO), norethindrone (NOR), medroxyprogesterone (MPROG), progesterone (PROG), testosterone (TESTO) and Bisphenol A (BPA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) at a purity of 97% or higher. Their structures are illustrated in the Supporting Information (SI **Figure S4.1**). Isotopically labelled internal standards (purity  $\geq 98\%$ ) progesterone- $^{13}\text{C}_3$ , androstenedione- $\text{d}_3$ , estradiol- $^{13}\text{C}_6$ , and bisphenol A- $^{13}\text{C}_{12}$  were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, U.S.A.). Further details on solvents and other chemicals are provided in SI (**Text S4.1**).

### 4.2.2 Sample collection and pre-treatment

Water samples were collected in pre-cleaned amber glass bottles previously amended with preservative agent (2-mercaptopyridine,  $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , used as dechlorinating and antibacterial growth agent) and extraction salt (sodium chloride,  $116 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [266]. Sample collection in each of the studied matrixes was operated as follows. At each water sampling location, the corresponding container was filled with the site tap water (1000 mL), surface water (500 mL) or wastewater (250 mL), and the bottle was sealed. Immediately after sample collection, the bottle was vigorously shaken to homogenize the solution and kept on ice in a cooling box (temperature  $< 4^\circ\text{C}$ ). Upon reception at the laboratory, analysis occurred no later than 28 days from the sampling date [266].

Real water samples for method demonstration were collected in the province of Québec (Canada). Wastewater samples (influent and effluent) were collected in the Greater Montreal area (Québec, Canada) from 6 distinct WWTP in November 2019. Surface water samples ( $n = 17$ ) were collected in April 2019 in the Mille Iles River north of Laval Island. Tap water samples were collected in November 2019 from 12 municipalities across 5 administrative regions in southwestern Québec: Laurentides (Saint-Eustache and Sainte-

Thérèse-de-Blainville), Laval (Laval), Montérégie (Brossard, Longueuil, Saint-Hyacinthe, Saint-Jean-sur-Richelieu, Salaberry-de-Valleyfield, and Vaudreuil-Dorion), and Montréal (Montréal and Pointe-Claire).

### 4.2.3 Sample preparation and instrumental analysis

Samples were filtered on glass fiber filters (GFF, 0.3  $\mu\text{m}$ , Sterlitech Corporation, Kent, WA, U.S.A.) and prepared in a 250 mL, 500 mL or 1000 mL glass volumetric flask for wastewater, surface water, and tap water, respectively.

Sample pre-concentration involved automated off-line SPE (see also SI **Figure S4.2**), using a Dionex™ AutoTrace™ 280 Automated Solid-Phase Extraction Instrument (Dionex/Thermo Fisher, USA). HPLC water and tap water samples were purified and preconcentrated as follows. Off-line SPE cartridges (SolEx HRPHS, 6 mL/200 mg, Thermo Scientific) were rinsed with 10 mL of methanol and conditioned with 10 mL of HPLC water. Water samples were then loaded at a 10 mL/min flow rate. At the end of the loading step, bottles were rinsed with 20 mL of HPLC water, and the resulting solution was loaded onto the cartridge. A wash step was applied with two volumes of 4 mL of an aqueous solution of acetic acid (2% v/v) followed by two volumes of 4 mL of HPLC water [266]. SPE cartridges were then dried for 10 minutes with pure nitrogen gas. The elution step was finally achieved with 10 mL of methanol (3 mL + 3 mL + 4 mL).

Surface water and wastewater samples were prepared as follows. SPE cartridges (SolEx HRPHS, 6 mL/200 mg, Thermo Scientific) were rinsed with 5 mL of MTBE (methylterbutylether) and 5 mL of methanol, then conditioned with 5 mL of HPLC water. The water sample was loaded on the cartridge at a 10 mL/min flow rate. At the end of this step, the bottle was rinsed with 10 mL of HPLC water and the resulting solution was loaded on the cartridge. The sample washing step was performed with two volumes of 5 mL of an HPLC water/methanol solution (90/10) containing ammonium hydroxide (2% v/v), followed by 5 mL of HPLC water. Afterwards, the cartridge was dried for 40 minutes ( $\text{N}_2$  flow, Autotrace). The HRPHS cartridge was subsequently removed from the Autotrace. To proceed to the elution and cleaning step, silica (Si-1) SPE cartridges were placed on a vacuum manifold and conditioned with 5 mL of a dichloromethane/acetone (70/30). The HRPHS cartridges were then mounted in tandem above the silica cartridges. Finally, 10

mL of a DCM/acetone solution (70/30) were eluted through the cartridge in two 5 mL volumes.

For each matrix type, samples were then spiked with isotope-labelled internal standards for a final concentration of  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. Extracts were reconstituted in 250  $\mu\text{L}$  of 90:10 (v/v) HPLC water:methanol and analyzed using an UHPLC-MS/MS TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). The injection volume was 100  $\mu\text{L}$ , allowed by the high aqueous composition of final extract. Chromatographic separation was performed with a Hypersil Gold C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particle size) thermostated at 55°C. The analytical mobile phases were HPLC-water (A), methanol (B) and an aqueous solution of 1 mM ammonium fluoride ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) (C), as optimized in our previous work [420]. The heated electrospray ionisation (HESI) source was operated in fast-polarity switching mode; all compounds were acquired within a single run of 10 min. Further method details, including the UHPLC gradient program and MS/MS acquisition parameters, are provided in SI (**Text S4.2**, **Table S4.1**, and **Figure S4.3**).

#### 4.2.4 Method validation

Method performance was evaluated in HPLC-grade water and real water matrixes (tap water, surface water, wastewater influent and effluent). Validation was conducted to evaluate the method performance in terms of linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), extraction recovery, precision, matrix effects, and whole-process efficiency (i.e., whole-method accuracy).

Fortification levels ranged from  $0.010 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in HPLC water and tap water, and from  $0.10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in surface water or wastewater. Calibration curves consisted of six to eight calibration levels. A linear regression fit with inverse weighting ( $1/x$ ) was applied.

LOD and LOQ were derived from analyte signal to noise ratios greater than three ( $S/N \geq 3$ ) and ten ( $S/N \geq 10$ ), respectively or from the standard deviation in the method blanks for BPA ( $\text{LOD} = 3 \times \sigma$ ;  $n = 5$ ). Other validation parameters, including accuracy, precision,

matrix effects, and recoveries, were evaluated as per the procedure described in SI (**Text S4.3**).

#### **4.2.5 Quality assurance / quality control**

Analyte determination relied on compliance of retention times ( $\pm 0.1$  min) with those in the spiked references (European Commission, 2017). Observation of both quantification and confirmation transitions, and the conservation of the ratio related to the latter transitions, were also monitored.

Procedural blanks were included within each batch of samples. These consisted of HPLC-grade water filtered through GFF filters and following the same analytical steps as real samples. BPA averaged  $1.0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in method blanks while the other targeted EDCs were not detected. Injection blank samples (i.e., HPLC-water aliquots directly submitted to UHPLC-MS/MS) were also regularly analyzed along the LC-MS batch sequence, suggesting no carryover.

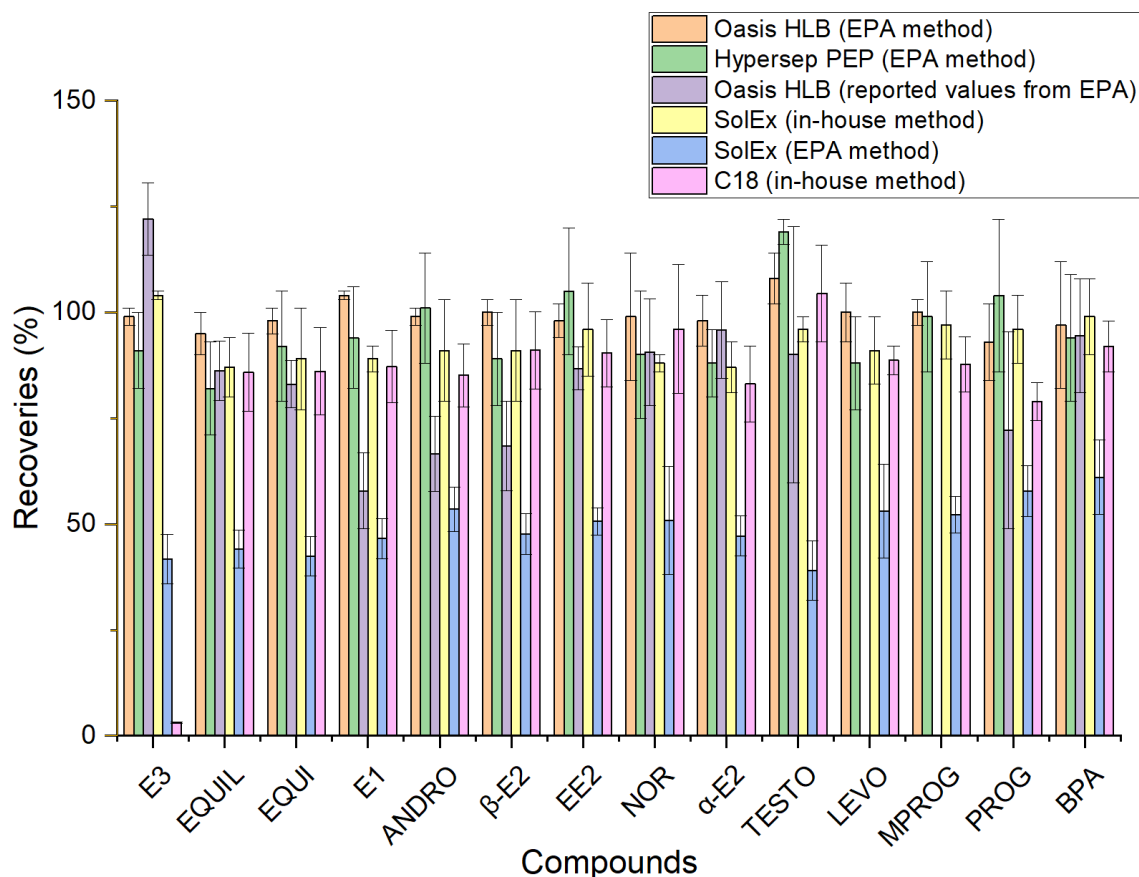
Matrix-matched calibration curves were run for each sample type and each analytical sequence. After the initial calibration, intermediate-level continued calibration verification (CCV) standards were injected after every 5 samples to control the chromatographic retention times, analyte absolute areas, and precision (SI **Table S4.2** and **Figure S4.4**). CCV performance was compliant with acceptance criteria specified in US EPA Method 539.1.

### **4.3 Results and discussion**

#### **4.3.1 Evaluation of select SPE adsorbents**

Four types of SPE cartridge adsorbents were tested for extraction efficiencies, including Phenomenex C18 (200 mg), Waters Oasis HLB (150 mg), Thermo Scientific HyperSep Retain PEP (200 mg, an equivalent to Oasis HLB), and Dionex HRPHS SolEx (200 mg). Considering the US EPA method, recoveries were excellent using either Oasis HLB cartridges (93-108%) or HyperSep Retain PEP cartridges (82-119%). EPA-recommended Oasis HLB yielded suitable performances in our reiterated validation, with similar recovery values as those mentioned in the EPA report (**Figure 4.1**). The HRPHS SolEx cartridge performed less satisfactorily when using the standard method, with

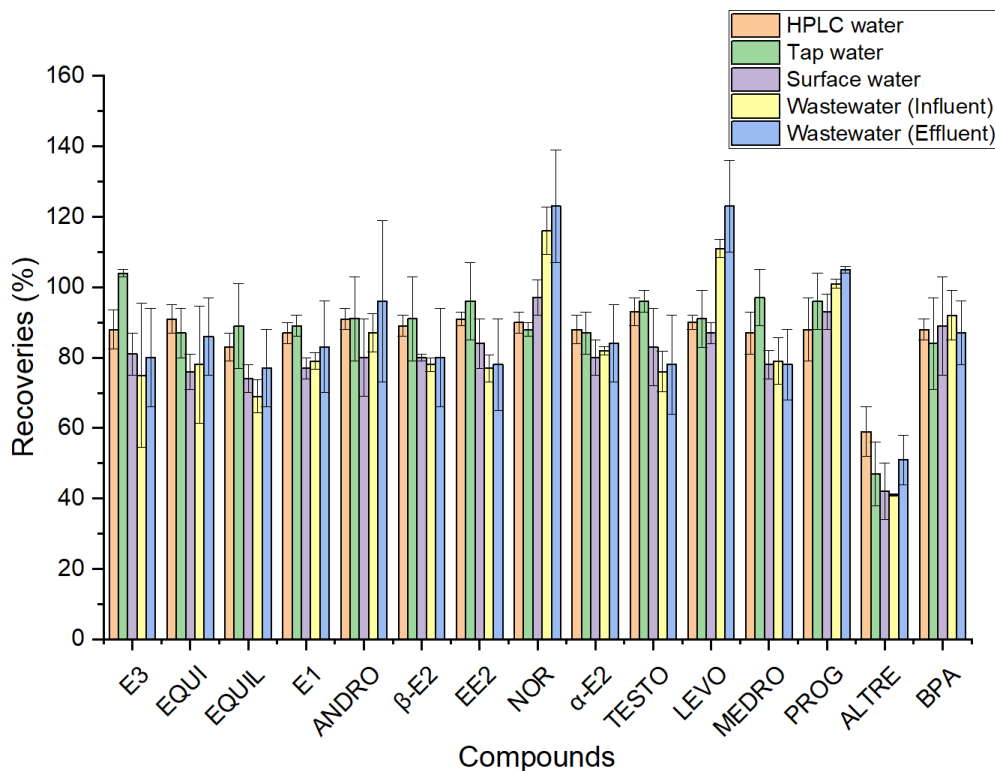
recoveries ranging from 39% to 61%. However, the HRPHS SolEx had improved recoveries (87%-104%) with an in-house method (with some modifications of the extraction and clean-up steps). Note that a C18 cartridge also provided satisfactory recoveries for most compounds (79%-104%) with the exception of E3 (<5%). As Oasis HLB was already subject to extensive validation as part of the EPA development for drinking water (Method 539.1), we focused on the alternative cartridge (HRPHS SolEx) and testing additional types of water with the in-house method.



**Figure 4.1.** Absolute off-line SPE recoveries for the 13 targeted hormones and bisphenol A ( $C = 100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Absolute recoveries of the cartridge used in the in-house method (HRPHS SolEx) were further evaluated for each matrix (**Figure 4.2**). Suitable recoveries were attainable across a range of aqueous matrixes, although the more complex sample types required consecutive cleanup to reduce matrix effects. For surface water and wastewater, adding a

cartridge wash step was thus necessary to reduce matrix effects and achieve the desired analytical sensitivity. Without this wash step, no signal was observable at a concentration as high as 50 ng·L<sup>-1</sup>, emphasizing the critical nature of this sample processing step. Clean-up was based on filtration of SPE eluates through Phenomenex Silica Si-1 (500mg) SPE cartridges. The SPE cartridge was placed in tandem with the silica one to proceed to the clean-up step. The elution was then performed with twice 5 mL of a 70/30 mixture of dichloromethane and acetone and the clean eluates retrieved for subsequent concentration and analysis. In summary, the in-house protocol (with slight modification of the extraction and purification steps) provided an acceptable alternative for the analysis of EPA priority hormones and bisphenol A, with the added value of consistent recovery in different types of water (Figure 4.2). For the drinking water matrix, analysts can also resort to the original EPA method with recommended Oasis HLB, which provides excellent recovery and precision (Figure 4.1).



**Figure 4.2.** Absolute off-line SPE recoveries for the 14 targeted hormones and bisphenol A (BPA) with the in-house method and HRPHS SolEx cartridge, considering different water matrixes (HPLC-water, tap water, surface water, wastewater influent, and wastewater effluent). Error bars refer to standard deviations (n = 3 per condition).

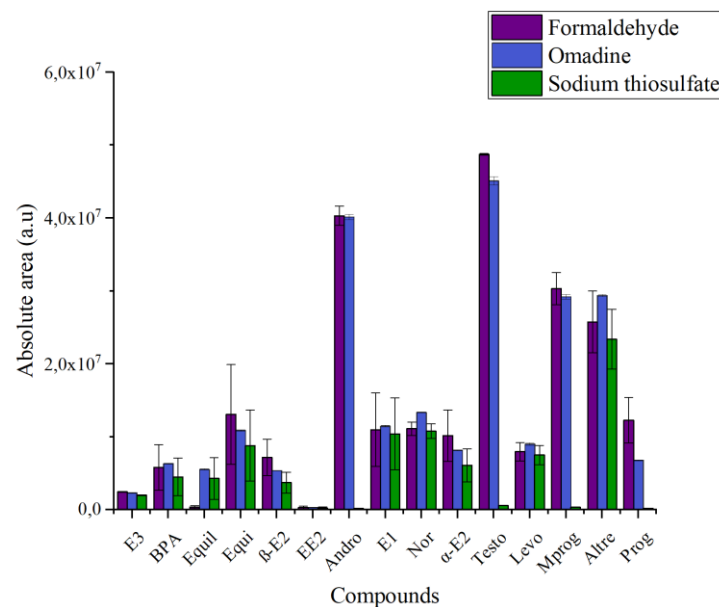


## 4.3.2 Potential factors affecting analytical performance

### 4.3.2.1 Sample storage conditions

Storage conditions were investigated with different preservative agents in surface water samples spiked at  $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  with targeted analytes and stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for a period of 21 days. Formaldehyde was tested at 1% (v/v) based on a previous study [436]. Sodium thiosulfate was also tested ( $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) based on previous studies for drinking water and wastewater effluents with residual chlorine [437,438]. Additional samples were amended with Omadine sodium salt corresponding to Method 539 conditions ( $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [439].

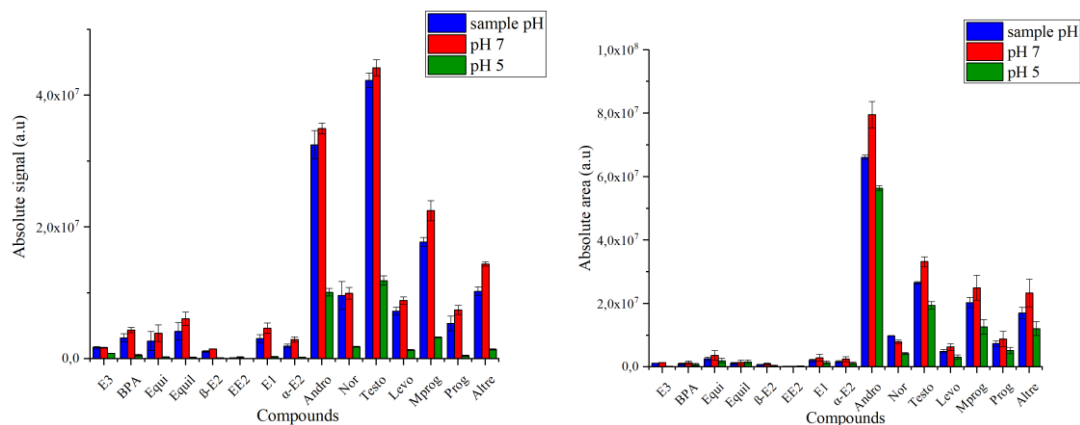
The signal responses for formaldehyde and Omadine were not significantly different except for two compounds (**Figure 4.3**). Higher absolute response (10-fold signal increase) was obtained for equilenin stored with Omadine compared to storage with formaldehyde. For progesterone, a 30% higher signal was obtained with formaldehyde. Storage with sodium thiosulfate resulted in significant decreases in signal (**Figure 4.3**). In most cases, it was a drastic decrease (e.g., androstenedione, testosterone) while in a few instances only marginal variations were noted (e.g., BPA, levonorgestrel). From a repeatability standpoint, storing samples amended with Omadine salt is thus preferable, in agreement with EPA Methods 539 and 539.1. Some previous studies also reported the use of Omadine for preservation of WWTP samples [440–442]. Omadine is also an efficient antimicrobial inhibitor for tap water samples [266,443,444]. If the absolute areas of internal standards were considered, the antimicrobial agents tested in this study also showed different influences (SI **Figure S4.5**). Omadine and formaldehyde demonstrated similar efficiency, suggesting no particular difference in terms of matrix effects, but the standard deviations presented narrower values for Omadine. Based on the above, Omadine sodium salt was selected as the chemical preservative for the present study.



**Figure 4.3.** Absolute areas (in arbitrary units – a.u.) of target EDCs when surface water samples were amended with different preservatives (formaldehyde, 100 ng·L<sup>-1</sup>; Omadine, 70 mg·L<sup>-1</sup>; sodium thiosulfate, 70 mg·L<sup>-1</sup>) prior a 21-day storage period at 4 °C. Error bars represent standard deviations (n = 3 per condition).

#### 4.3.2.2 Sample pH adjustment

Adjusting sample pH was also tested as this can potentially influence the SPE step. The tested conditions were initial sample pH, pH = 7, and pH = 5 based on literature [445–448]. The sample pH was adjusted with glacial acetic acid. The obtained results were similar across matrices, and we provide the results for wastewater and tap water as an example (**Figure 4.4**). The signal intensity was generally higher at circumneutral pH than at other tested conditions. In wastewater influent, for instance, the absolute intensity of testosterone was 4.5% higher at pH 7 compared to the sample without adjusted pH and 3.5 times higher compared to pH 5 (**Figure 4.4**).



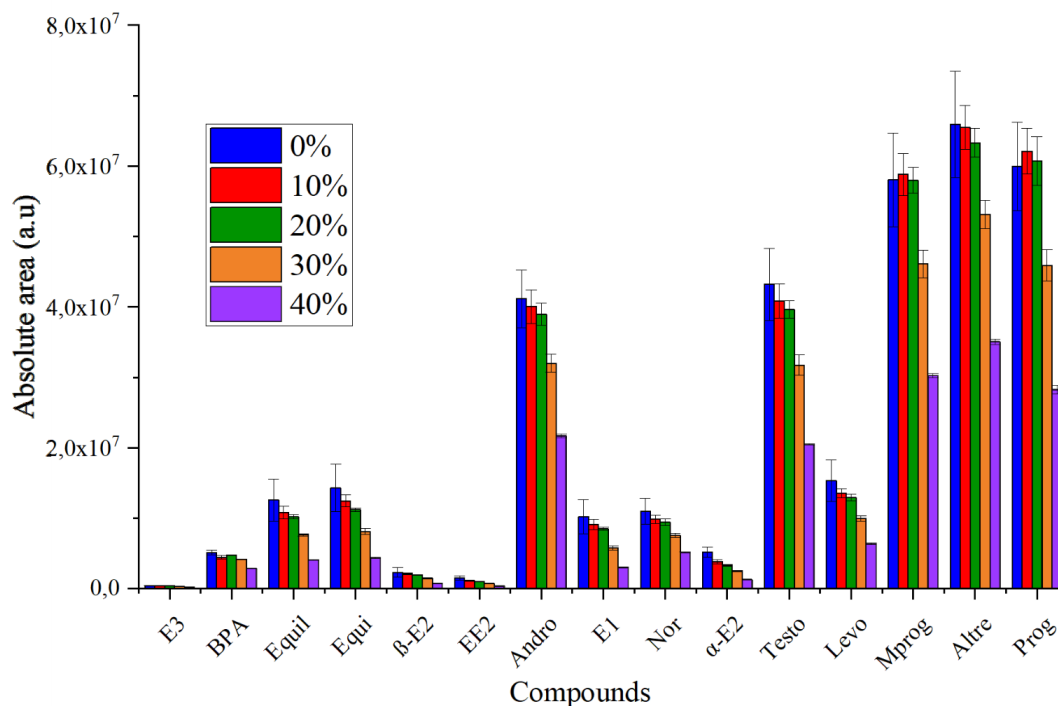
**Figure 4.4.** Absolute signal intensity (in arbitrary units – a.u.) for targeted compounds depending on pH (sample pH, pH = 7 and pH = 5) in wastewater influent (left) and tap water (right). Error bars represent standard deviations (n = 3 per condition).

This trend is observable for all target EDCs, although it is not as marked for some of them. In a less complex matrix such as tap water, the signal difference was more marginal. Taking testosterone as an example, the drop-in signal at pH 5 is about 40%, much lower than the 3.5 times mentioned above (**Figure 4.4**). The developed analytical method remains robust with a pH variation between 7 and initial sample pH (typically ranging from 8 to 9.5). Acidifying the samples can thus be avoided, in line with some previous studies that reported a decrease in signal for acidulated samples and an improved signal at pH 7 [319,446].

#### 4.3.2.3 Reconstitution medium

The impact of the MeOH percentage in the final reconstitution medium was also evaluated. This percentage was varied from 0% to 40% in the reconstituted sample before injection. A slightly higher signal was obtained with a zero-methanol percentage (**Figure 4.5**). However, a percentage less than or equal to 20% led to equivalent performances. The difference is much more pronounced when increasing the MeOH percentage to 30% (on average, a 30% signal decrease) or 40% (50% signal decrease). Considering the relatively large injection volume, the reconstituted sample should not contain a significant proportion

of organic solvent given the risks of peak enlargement and deformation or even the risks of partial signal loss with reverse phase column types (e.g., elution in the chromatographic dead time, caused by viscous fingering phenomena) [449–451]. Since the 10% MeOH condition provided improved precision over the zero-methanol condition, it was finally selected for the study.



**Figure 4.5.** Signal intensity (in arbitrary units – a.u.) variation depending on % MeOH in the reconstitution medium (injection volume: 100  $\mu$ L). Error bars represent standard deviations ( $n = 3$  per condition).

#### 4.3.2.4 Instrumental method factors

Previously, we evaluated different ionization sources, mobile phase modifiers, and concentration of the latter [374,420]. A heated-ESI source was selected, and similar to the EPA method, ammonium fluoride ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) was selected as mobile phase modifier. The salt concentration was modified to 1 mM for the noticeable signal improvement it yielded [374,420].

During the optimization process, the injection volume was also evaluated. Several conditions were tested (25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l and 100  $\mu$ l; SI **Figure S4.6**). An increase in injection volume translated in concomitant increases in the analyte absolute area. Though the increase was noted to be dynamic rather than linear, precision was generally superior at the highest injection volume tested. An injection volume of 100  $\mu$ l was finally selected. UHPLC-MS/MS chromatograms obtained with the optimized method are presented in SI (SI **Figure S4.7**).

The advantage of injecting a larger volume of sample lies in the fact that it represents a larger portion of final extract (40% in our case). In small volume direct injection mode, it is in fact quite rare for the percentage injected to exceed 5% of the final extract volume, limiting the attainable LODs. As a downside, higher injection volumes can imply higher matrix effects, which can be countered by matrix-matched calibration [451,452].

### **4.3.3 Analytical validation**

The absolute extraction efficiency of the off-line SPE sorbent ranged from 41% to 123% across the diverse water matrixes (see also **Figure 2**). These results are in agreement with previous off-line SPE methods that reported absolute recoveries between 69%-129% [359] and 58-94% [453] for various steroid hormones. Since both the samples and the matrix-matched calibration levels were submitted to the extraction procedure, recovery losses were integrated within the quantification procedure. Even though fully quantitative absolute recoveries (100%) could not be reached for all target analytes, an accurate analysis could thus be ensured.

Matrix effects were evaluated by comparing the response in matrix *vs.* that in neat reagent water (HPLC-water). In tap water, matrix effects ranged from 1% for  $\beta$ -estradiol to -33% for equilin at the low QC level, while matrix effects ranged from -0.2% for progesterone to -38% for ethinylestradiol at the high spike level (see also SI **Table S4.3**). In surface water, matrix effects ranged from -1% for androstenedione to -38% for altrenogest at the low spike level, and between 0.4 % for estrone to -32% for altrenogest at the high spike level.

In wastewater, matrix effects were generally more prevalent, as could be anticipated from the higher matrix complexity together with a relatively high SPE loading volume and LC-MS/MS injection volume. Matrix effects in wastewater effluent ranged between -43% and +5% at the low spike level and from -29% to 2% at the high spike level (SI **Table S4.3**). Matrix effects in wastewater influent ranged from 2% for androstenedione to -40% for medroxyprogesterone at the low spike level, and from 0.2% for medroxyprogesterone to +30% for testosterone at the high spike level.

We summarized the QA/QC pass/fail performance in terms of matrix effects according to the USEPA criterion (matrix effect within  $\pm 30\%$ ), if matrix-free calibration would be used (SI **Table S4.3**). At QC1, 13/15 compounds met the acceptance criterion in tap water, 9/15 in surface water, and 12/15 in wastewater. At QC2, 13/15 compounds met the acceptance criterion in tap water, 12/15 in surface water, and 15/15 in wastewater. Based on these results, it was preferable to use a matrix-matched calibration, as a neat solvent (HPLC-water) approach could lead to non-negligible deviations from the real sample levels. For each matrix type, a subset of each field sample of the same type was pooled to create a composite sample for addition of native EDCs and isotope-labelled internal standards.

The linearity range extended in most cases over 0.1–200 ng·L<sup>-1</sup> or 0.5–200 ng·L<sup>-1</sup>. For all matrix types, the herein developed method presented acceptable determination coefficients ( $R^2$  always  $> 0.9910$  and in most cases  $> 0.9990$ ) (SI **Table S4.4**). The determined  $R^2$  thus met the acceptability criterion defined in EPA methods ( $R^2 \geq 0.9900$ ).

Compound-dependent LOD and LOQ can be found in SI (**Table S4.4**). A comparison of how this and other methods performed for three EU-priority hormones (EE2, E1, and E2) is also provided in **Table 4.1**. In drinking water, method LODs ranged from 0.03 ng·L<sup>-1</sup> to 0.50 ng·L<sup>-1</sup> (0.1 ng·L<sup>-1</sup> for EE2, E1, and E2), in significant improvement (by ~3-200 times) compared to other recent MS-based methods for tap water or bottled water (**Table 4.1**). In surface water, method LODs ranged from 0.10 ng·L<sup>-1</sup> to 0.50 ng·L<sup>-1</sup>. Requirements of the EU Water Framework Directive are reached for E1 and E2 but not for EE2, as is often the case for other published studies and standard methods (**Table 4.1**). Method LODs for wastewater matrixes (influent and effluent) ranged from 0.16 ng·L<sup>-1</sup> to 1.00 ng·L<sup>-1</sup>. The LOD performance is in the same order of magnitude or improved compared to previous LC-MS methods for influent and effluent wastewater (**Table 4.1**).

In tap water, intra-day precision was always < 3.8% and inter-day precision < 13.3%, compliant with the acceptability criterion (RSD < 30%). A similar degree of performance was obtained in surface water matrix, with intra-day precisions within 0.4%-7.9% and inter-day precision within 0.4%-21%, depending on the compound and spike level. Precision was also satisfactory for wastewater (influent and effluent) matrixes (SI **Table S4.5**).

Accuracy was determined for each matrix type (SI **Table S4.6**) and proved satisfactory (overall range: 71–100%). In matrix-free water, accuracies ranged from 72% to 96% at QC1 and from 87% to 100% at QC2. For tap water, accuracy values were equally acceptable, ranging from 79% to 99% at QC1 and from 91% to 100% at QC2. Comparable results were obtained for the surface water matrix (SI **Table S4.6**). Accuracies remained acceptable for complex matrixes such as wastewater, with values ranging between 73% and 99% at QC1 and between 86% and 99% at QC2. The accuracy performance is similar or better than values reported in literature, reflecting efficient quantitation using matrix-matched calibration with internal standardization. The presented results are also in agreement with the accuracy acceptability criterion of 70–130% set in US. EPA methods.

**Table 4.1.** Comparison of method detection limits (LOD, ng/L) of EU-priority ethinylestradiol (EE2), estrone (E1), and 17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2) in tap water, surface water, and wastewater in the present study and recent literature (2012-2021). Method LOD requirements of the EU Water Framework Directive are shown in italicized font.

Matrix	Sample intake (mL)	Instrumental analysis	Method detection limits			Ref.
			LOD EE2 (ng/L)	LOD E1 (ng/L)	LOD $\beta$ -E2 (ng/L)	
<b>Tap water</b>	<b>1000</b>	<b>LC-MS/MS</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>Present study</b>
Tap water	200	LC-FD	0.8	N/A	2.7	Ferreira et al. 2020 [454]
Tap water	0.02	Immunosensor	N/A	N/A	3	Minopoli et al. 2020 [455]
Tap water	250	LC-HRMS	83.8	N/A	81	Abdallah et al. 2019 [456]
Aquifer water	500	LC-MS/MS	0.4	0.4	0.4	Bexfield et al. 2019 [424]
Tap water	10 (on-line SPE)	LC-MS/MS	0.7	0.3	0.6	Goery et al. 2019 [420]
Tap water	N/A	GC-MS	3	N/A	1	Vallejo-Rodriguez et al. 2018 [457]
Bottled water	N/A	LC-MS/MS	1	0.3	0.3	Le Coadou et al. 2017 [351]
Tap water	1000	LC-MS/MS	0.7	0.5	0.7	Torres et al. 2015 [183]
Tap water	500	LC-MS/MS	23*	2.4*	6*	EPA method 539.1 [266]
Tap water	500-1000	LC-MS/MS	0.33	0.19	0.39	EPA method 539 [458]
<b>Surface water</b>	<b>500</b>	<b>LC-MS/MS</b>	<b>0.5</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>Present study</b>
Surface water	1000	LC-MS/MS	0.035	0.1	0.1	Mirmont et al. 2021 [453]
Surface water	10-20 (on-line SPE)	LC-HRMS	0.5-5	3.9-8.3	0.2-10.5	Ng et al. 2021 [459]
Surface water	1000	LC-HRMS	N/A	N/A	0.5	Picard et al. 2021 [460]
Surface water	500	LC-MS/MS	0.72	0.03	0.27	Ana & Espino 2020 [461]
Surface water	500	LC-MS/MS	0.35	0.02	0.17	Wee et al. 2019 [462]
Surface water	10 (on-line SPE)	LC-MS/MS	1.4	0.6	0.8	Goery et al. 2019 [420]
Surface water	500	LC-MS/MS	1.66	0.62	1.35	Pignotti & Dinelli 2018 [463]
Surface water	5 (on-line SPE)	LC-MS/MS	0.035	0.03	0.041	Čelić et al. 2017 [397]
Surface water	500	LC-MS/MS	0.16	0.1	0.04	Campanha et al. 2015 [464]
Surface water	N/A	GC-MS	0.1-0.49	0.1-0.49	0.1-0.49	Nie et al. 2015 [465]
Surface water	1000	LC-MS/MS	0.5	0.5	0.5	Aydin & Talinli 2013 [198]
Surface water	0.2	ELISA	20	N/A	30	Silva et al. 2013 [466]
Surface water	1000	HRGC-HRMS	0.1	0.2	0.1	EPA method 1698 [467]
<i>Surface water</i>	-	-	<i>0.035</i>	<i>0.4</i>	<i>0.4</i>	<i>EU WFD requirement [468]</i>
<b>Wastewater</b>	<b>250</b>	<b>LC-MS/MS</b>	<b>0.5-1</b>	<b>0.4-1</b>	<b>0.25-0.5</b>	<b>Present study</b>
Wastewater	200	LC-MS/MS	0.24	0.36	0.26	González et al. 2020 [469]
Wastewater	10 (on-line SPE)	LC-MS/MS	4-4.6	0.5-3.7	1-3.6	Goery et al. 2019 [420]
Wastewater	100-500	LC-MS/MS	0.6-3	0.09-1	0.8-2	Zhang & Fent 2018 [470]
Wastewater	100	LC-HRMS	11	6	10	Comtois-Marotte et al. 2017 [471]
Wastewater	5 (on-line SPE)	LC-MS/MS	0.078-0.26	0.04-0.057	0.076-0.155	Čelić et al. 2017 [397]
Wastewater	N/A	ELISA	0.2-5	0.2-5	0.2-5	Manickum & John 2015 [472]
Wastewater	5 (on-line SPE)	LC-MS/MS	18-21	16-23	21-24	Fayad et al. 2013 [392]
Wastewater	50 (SBSE)	LDTD-MS/MS	300	300	200	Vo Duy et al. 2012 [275]

\*Lowest Concentration Minimum Reporting Levels (LCMRLs).



## 4.3.4 Method application to water samples from Eastern Canada

### 4.3.4.1 Wastewater samples (Influents)

Among the sampled wastewater sites, summed concentration levels ranged from 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to 237  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in the influents (**Table 4.2**). The highest contributive total concentrations were found at WWTPs B, E and F (summed EDC concentrations > 100  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Ethinylestradiol,  $\alpha$ -estradiol, medroxyprogesterone, and progesterone were not detected at any site. Estriol was quantified at site B at a concentration of 82.6  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , higher than reported values in France (9.1–22  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [473].  $\beta$ -estradiol levels (nd–3.9  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) are lower than reports from France (9.7–25  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), China (7.6–29  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or South Korea (8.1–19  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [359,396,473]. Levonorgestrel concentrations are higher than those reported in China (35 vs. 2.8  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while testosterone levels are lower than reported results from India (13 vs. 178  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [241,474]. Norethindrone levels (3.0–14  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) are comparable to data from China (4.02  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and Spain (1.1–8.9  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [241,376]. BPA concentrations (13–37  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were lower than reports from South Korea (82–149  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or China (189–5560  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [396,399]. The frequent detection of estrone (0.48–54  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and androstenedione (71–120  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) is consistent with previous reports from Québec [208,420].

**Table 4.2.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the influent of selected WWTPs in the province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and ND refers to “not detected”.

	Site A	Site B	Site C	Site D	Site E	Site F
<b>E3</b>	ND	83	ND	ND	ND	ND
<b>BPA</b>	ND	ND	ND	37	13	ND
<b>EQUI</b>	5.9	4.9	4.4	5.5	9.8	11
<b>EQUIL</b>	1.4	2.9	1.5	ND	5.2	9.2
<b>ANDRO</b>	ND	120	ND	ND	91	71
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	3.9
<b>E1</b>	ND	ND	0.5	ND	2.7	54
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	3.0	ND	ND	14	ND
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	13	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	35	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	3.1	10	3.7	1.7	2.9	13
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	10.4	237	10	44	173	162

#### 4.3.4.2 Wastewater samples (Effluents)

Overall, summed EDCs ranged from 15 ng·L<sup>-1</sup> to 262 ng·L<sup>-1</sup> in wastewater effluent samples (**Table 4.3**). The highest total concentration was found at site F (> 100 ng·L<sup>-1</sup>). The relatively high EDC levels in WWTP effluent are in overall agreement with previous studies [475–479].

Several compounds were quantified at only one of the six surveyed sites: estrone at site A (6.1 ng·L<sup>-1</sup>), progesterone at site C (0.80 ng·L<sup>-1</sup>), and androstenedione and estriol at site F (83 and 62 ng·L<sup>-1</sup>). Estrone levels are comparable with studies in South Korea (0.3–8.8 ng·L<sup>-1</sup>), and progesterone are in the same range as reports from Belgium (3–33 ng·L<sup>-1</sup>), Canada (4.5–26 ng·L<sup>-1</sup>), China (2.9 ng·L<sup>-1</sup>), and France (8.0–17 ng·L<sup>-1</sup>) [234,239,285,471]. Ethinylestradiol, norethindrone and levonorgestrel had concentration ranges in positive samples (2/6 sites) of 3.7–7.3 ng·L<sup>-1</sup>, 28–75 ng·L<sup>-1</sup> and 49–82 ng·L<sup>-1</sup>, respectively. These values are higher than reports from South Korea, China, or the Czech Republic [208,396,426]. β-estradiol and medroxyprogesterone were quantified in 70% of sites with concentration ranges of 1.1–7.0 ng·L<sup>-1</sup> and 0.97–8.4 ng·L<sup>-1</sup>, respectively. Equilin, equilenin and α-estradiol were quantified at all sites (detection rate of 100%) with concentration ranges of 2.5–6.0 ng·L<sup>-1</sup>, 3.4–9.3 ng·L<sup>-1</sup> and 3.3–4.9 ng·L<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 4.3.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the treated effluent of selected WWTPs in the province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and ND refers to “not detected”.

	Site A	Site B	Site C	Site D	Site E	Site F
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	62
<b>BPA</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUI</b>	2.7	3.3	2.5	3.7	4.9	6.0
<b>EQUIL</b>	4.0	5.6	4.2	3.4	7.2	9.3
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	83
<b><math>\beta</math>-E2</b>	1.6	ND	1.1	1.2	ND	7.0
<b>E1</b>	6.6	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	3.7	ND	7.3
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	28	75
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	4.4	4.9	4.5	3.3	3.7	4.2
<b>TESTO</b>	ND	ND	10	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	82	49	ND
<b>MEDRO</b>	ND	0.97	ND	2.3	2.4	8.4
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	0.80	ND	ND	ND
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	19.2	14.7	23.4	99.2	94.9	262

#### 4.3.4.3 Surface water samples

In surface water samples from the Greater Montreal area (Quebec, Canada), summed EDC ranged from <LOQ to 37 ng·L<sup>-1</sup> (SI **Table S4.7**). Certain EDCs such as levonorgestrel, equilenin, ethinylestradiol, and β-estradiol were quantified at most sites (occurrence > 50%). For equilin, norethindrone and testosterone, detection rates ranged from 25% to 50%. Estriol, bisphenol A, and progesterone were quantified in 5% of sampled sites while androstenedione was quantified in about 10%. Estrone, altrenogest and medroxyprogesterone were detected at a few locations but always remained <LOQ.

In most cases, individual recorded concentrations were around 5 ng·L<sup>-1</sup> and rarely exceeded 10 ng·L<sup>-1</sup>. Ethinylestradiol, norethindrone and β-estradiol were the main contributors to the sum of 15 targeted EDCs with concentrations ranging from 3.9 ng·L<sup>-1</sup> to 17 ng·L<sup>-1</sup> for ethinylestradiol (i.e., contributions of 11%-56% to the sum of 15 EDCs), from 3.9 ng·L<sup>-1</sup> to 17 ng·L<sup>-1</sup> for norethindrone (17%-58% of ∑EDC), and from 3.9 ng·L<sup>-1</sup> to 17 ng·L<sup>-1</sup> for β-estradiol (5%-43% of ∑EDC). The observed levels are comparable to other studies in Asia, Europe, and America for rivers with urban impacts [271,480–482].

#### 4.3.4.4 Tap water samples

Point-of-use tap water was collected from twelve municipalities in Québec (SI **Figure S4.8**). Based on the literature, only low amounts of hormones were expected to occur in treated tap water [184]. Only estriol, bisphenol A, equilin, androstenedione and estrone were detected at least at one site (**Table 4.4**). Among the detected analytes, only estriol, equilin and androstenedione were quantified at one site. Estriol was quantified at a concentration of  $0.92 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in the sample from Pointe-Claire, equilin ( $0.19 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in Longueuil, and androstenedione ( $0.63 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in Saint-Jean-sur-Richelieu. No other compounds were quantified and levels under  $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  are consistent with previous studies [323,482,483]. A report commissioned by the *Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques* (MELCC, Quebec, Canada) also documented very low levels of hormones (E1,  $\beta$ -E2, TESTO, EE2, E3 – many values were below the limits of detection of  $0.5$  to  $4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for a panel of 56 samples [484]. Only  $\beta$ -E2 was detected in 2 samples for a maximum concentration of  $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  [484]. Hormones are also infrequent in drinking water samples from the USA, as reported by Benotti et al. [184]. After treatment, the water distributed in the network was free of all traces of hormones at the detection threshold level permitted by the analytical method used in their study (LODs ranging from  $0.5$  to  $5.0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [184].

**Table 4.4.** Individual and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in different tap water samples from selected municipalities in province of Québec (Canada). Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and ND refers to “not detected”.

	Saint-Jean-sur-Richelieu	Vaudreuil-Dorion	Sainte-Thérèse	L'Assomption	Saint-Eustache	Pointe-Claire	Montréal	Longueuil	Saint-Hyacinthe	Salaberry-de-Valleyfield	Brossard	Laval
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	0.92	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BPA</b>	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	0.19	ND	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	0.63	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\Sigma</math>EDC</b>	0.63	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.92	<LOQ	0.19	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND

### 4.3.5 Lessons learned and remaining challenges

Numerous analytical methods have been developed for the analysis of endocrine disruptors, mostly focused on clean water or environmental matrices. The present work describes an alternative analytical method to analyze the expanded scope of EPA-priority EDCs, based on automated off-line SPE–UHPLC-MS/MS. The applicability to four different water matrices (versatility), the extended range of targeted compounds compliant with the list of EPA Method 539.1, and the acquisition within a single injection (fast polarity switching) are the significant contributions. We note that some previous studies have demonstrated excellent performances, but may differ in terms of tested matrixes and target analyte scope [474,483,485]. Studies based on on-line SPE involving larger injection volumes and using different source technologies did not reach the same LOD performance or were focused only on a specific class of hormones [381,382]. The present work illustrates a reasonable compromise between detection capabilities, SPE-cartridge types, analysis time, sample throughput, and simplicity (through SPE automation).

The European Union Water Framework Directive (EU WFD) sets requirements for maximum acceptable method detection limits (MDLs) in surface water, at  $0.4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for E1 and  $\beta$ -E2, and  $0.035 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for EE2 [486,487]. The method LODs obtained here for E1 and  $\beta$ -E2 ( $0.1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in surface water) are compliant with EU WFD requirements and are also comparable to MDLs of Method 1698 ( $0.1$ - $0.2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in ambient water). Our current  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  ( $0.50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in surface water) does not allow the EU recommendation to be reached; the stringent detection limit requirement remains a challenge to analysts, even when using standard methods (e.g., Method 1698:  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  of  $0.1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in ambient water). However, our  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  is in the same order of magnitude as the British Columbia guidelines to protect freshwater organisms (set at  $0.50$  and  $0.75 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for chronic and acute exposure, respectively). The herein reported LODs for surface water are also lower than predicted no-effect concentrations (PNEC,  $\text{ng}/\text{L}$ ) for  $\beta$ -E2, E1, E3, and BPA, estimated at  $0.4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $3.6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $60 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $240 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively (PNEC data compiled by Čelić et al. [422]).

Improvements to the current methodology would be necessary to reach the EU WFD requirement for EE2 detection in surface water [488]. Though we used a 500-mL sample



intake, higher loading volumes could be tested (1-2L) with the current SPE cartridge or formats with a higher quantity of sorbent (e.g., 500 mg). While instrumental conditions were selected here as a compromise for 15 EPA-priority EDCs, specific conditions could be used to favor EE2 detection. Options include a different mobile phase composition and analysis of negative ion mode EDCs separately, leading to a higher number of points per chromatographic peaks and slightly improved sensitivity compared with the present polarity-switching setting [489]. Analysis of EE2 in positive ion mode following SPE and derivatization, such as with dansyl chloride, could also lead to improved limits of detection in LC-MS [453,490]. The use of GC-based methods (following appropriate derivatization) with last generation instrumentation may also help attain the high degree of sensitivity required by the EU Water Framework Directive. All the above cited options could certainly lead to improved sensitivity but would cause reduced method throughput due to the longer SPE loading time and addition of a chemical derivatization step.

Other challenges remain regarding the study of steroid hormones and other endocrine disruptors. Improvement in accuracy and precision could proceed from a more systematic usage of isotope labelled internal standards (ILIS). As ILIS are increasingly available, sometimes even as different isotopologs of the same compound (e.g.,  $^{13}\text{C}_6$ - and  $^{13}\text{C}_2$ -estradiol), different sets of internal standard solutions could be used as surrogate (before SPE) and performance (before LC-MS) standards in updated protocols. It would also be interesting to proceed to interlaboratory studies to validate quantification performances between research groups, especially at the  $\text{sub ng}\cdot\text{L}^{-1}$  level. The lack of a certified reference material for environmental matrices does not appear to be addressed to our knowledge. Developing such standard materials would allow harmonization between the different studies carried out in various laboratories following different strategies.

The development of ultrasensitive methods will aid in the identification and quantification of metabolites in environmental matrices. An efficient extraction and purification method coupled with high-resolution mass spectrometry (HRMS) would be required to identify degradation products and metabolites. HRMS detection could also assist in the study of bisphenol A replacement substances and potential metabolites, whose environmental occurrence data remain sparse.

#### 4.4 **Conclusions**

An automated off-line SPE – UHPLC-MS/MS workflow was evaluated for the analysis of EPA-priority endocrine disruptor compounds. The sufficient selectivity and sensitivity of the present analytical method allowed for the detection of bisphenol A, estrogens, progestogens, androgens, and steroids, at or below  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  level in environmental samples. The analytical method was validated in 5 distinct matrices. In terms of absolute SPE recoveries and precision, the in-house method performed equally from clean water (ultrapure water, tap water) to surface water and wastewater, indicating great versatility. The method also performed satisfactorily in terms of accuracy, linearity, and internal standard variations. Some of the targeted endocrine disruptive compounds (EDCs) were detected in field-collected samples, confirming their ubiquitous presence in aquatic ecosystems with urban influences in Southern Québec.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank Thermo Fisher Scientific for scientific and technical support. We also acknowledge Yves Fontaine from École Polytechnique de Montréal for assistance in field sampling. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at Polytechnique Montréal, and the Canadian Foundation for Innovation.

## 4.5 Supplementary material

### Text S4.1. Chemicals and solvents

Water, acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dichloromethane (DCM), acetone (ACT) and isopropanol (iPrOH) of HPLC-grade quality were obtained from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Tert-Butyl methyl ether (MTBE) were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A). Sodium chloride (NaCl, purity >99.5%), omadine sodium salt (purity 99%), sodium thiosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ammonium fluoride (NH<sub>4</sub>F, purity >98%), formaldehyde (HCHO, 37 wt. % in H<sub>2</sub>O and containing 10-15% methanol as stabilizer), glacial acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH, purity >99.7%) and formic acid (HCOOH, purity >95%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.).

### Text S4.2. Instrumental analysis

The sample delivery system comprised an HTC Thermopal autosampler from CTC analytics AG (Zwingen, Switzerland), used for a 100- $\mu$ L in-loop sample injection. Chromatographic separation was performed with a Hypersil Gold C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.9  $\mu$ m particle size). The analytical column was thermostated at 55°C. The chromatographic gradient was adjusted to achieve the separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estradiol isomers. The analytical mobile phases were HPLC-water (A), methanol (B) and an aqueous solution of ammonium fluoride (NH<sub>4</sub>F) at a concentration of 1 mM, (C) as optimized in our previous work [420]. The overall procedure allowed the detection of all compounds within a single run of 10 minutes. The heated electrospray ionisation (HESI) source was operated in fast-polarity switching mode for simultaneous acquisition of negative mode and positive mode target compounds. The TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) was operated in selected reaction monitoring mode. Source parameters were as follows: sheath gas (60 arbitrary unit), auxiliary gas (15 arbitrary unit), sweep gas (0 arbitrary unit), ion spray voltage (+3kV or -3kV, polarity switching), capillary temperature (350°C), vaporizer temperature (400°C). The scan time was set at 20 ms, yielding at least 10 points per chromatographic peak (SI Figure S2). The first and third quadrupole (Q1 and Q3) were set at unit resolution (0.7 Da

FWHM). The collision gas pressure in the collision cell (q2) was fixed at 1.5 mTorr. Compound-dependent MS/MS parameters are provided in SI **Table S4.1**.

### **Text S4.3. Validation procedure**

Intra-day precision and inter-day precision were evaluated at two concentration levels (QC1 and QC2) based on the relative standard deviation of the analyte to IS area ratio. Considering the specifics of each matrix, the spiked concentration for QC1 was 1 ng·L<sup>-1</sup> for HPLC water, 5 ng·L<sup>-1</sup> for tap water or surface water, and 20 ng·L<sup>-1</sup> for wastewater. QC2 was set at a concentration of 150 ng·L<sup>-1</sup> for all sample types. Intra-day precision was calculated with five replicates analyzed within the same working. Inter-day precision was derived from the overall relative standard deviation of three working days (n =15 for each of the QC levels examined). In accordance with EPA requirements, precision was considered acceptable if the relative standard deviation (RSD) remained below or equal to 20%.

To devise an appropriate quantification strategy, matrix effects were estimated based on the analyte to IS area ratios in spiked tap water, surface water, and effluent wastewater, compared to those determined in matrix-free HPLC-water, as defined hereafter:

$$\text{Matrix effect (\%)} = (((R_{\text{matrix}} - R_{\text{blank}}) / R_{\text{solvent}}) - 1) * 100$$

Where  $R_{\text{matrix}}$  represents the area ratio found in the spiked sample corresponding to the selected matrix,  $R_{\text{blank}}$  represents the area ratio found in the unspiked sample corresponding to the selected matrix, and  $R_{\text{solvent}}$  represents the area ratio found in the spiked sample in neat solvent (i.e., HPLC-water).

In accordance with EPA requirements, the matrix effect was considered acceptable if the measured concentration remained within  $\pm 30\%$  of the theoretical one.

For each matrix type, accuracy (%) was determined as complementary parameter at the two concentration levels previously defined for the precision assessment (QC1 and QC2, n = 3 each), as per the following formula:

$$Accuracy (\%) = (C_{measured}/C_{expected}) * 100$$

Where  $C_{measured}$  represents the spiked concentration quantified upon the retained calibration curve approach (i.e., matrix-matched), and  $C_{expected}$  represents the theoretical spiked concentration in the sample.

In accordance with EPA requirements, accuracy/trueness was considered acceptable if within the range of 70–130%.

**Table S4.1.** Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS; SRM) parameters for the targeted analytes in positive and negative ionization mode.

Compounds	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	RF lens (V)	Collision energy (V)	Intensity rank	IS
<b>E3</b>	287	145	105	43	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		171	105	39	1	
<b>BPA</b>	227	133	66	28	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		212	66	19	1	
<b>EQUIL</b>	265	221	82	36	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		222	82	29	2	
<b>EQUI</b>	267	143	75	35	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		265	75	25	1	
<b>ANDRO</b>	287	97	52	24	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	52	26	2	
<b>β-E2</b>	271	145	88	42	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	88	42	1	
<b>E1</b>	269	145	97	41	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		159	97	39	2	
<b>EE2</b>	295	145	97	43	1	Ethinylestradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
		159	97	37	2	
<b>NOR</b>	299	91	56	44	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	53	2	
<b>α-E2</b>	271	145	95	44	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	95	39	2	
<b>TESTO</b>	289	97	54	24	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	54	27	1	
<b>LEVO</b>	313	91	56	45	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	59	2	
<b>MEDRO</b>	345	97	58	28	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		123	58	27	1	
<b>PROG</b>	315	97	55	24	2	Progesterone-d <sub>9</sub>
		109	55	27	1	
<b>ALTRE</b>	311	277	23	64	1	Progesterone-d <sub>9</sub>
		269	15	64	2	

**Table S4.2.** Illustration of the quality control chart approach implemented via Continued Calibration Verification (CCV) samples, showing the relative standard deviations (RSD%) for the following criteria: retention time (RT), absolute area (Area), and area ratio of native analytes to their isotope-labelled internal standard ( $A_N/A_{ILIS}$ ).

<b>Precision (%RSD)</b>			
	RT	Area	$A_N/A_{ILIS}$
<b>E3</b>	2.15	2.10	2.24
<b>BPA</b>	1.03	6.27	1.17
<b>EQUIL</b>	0.96	14.6	8.76
<b>EQUI</b>	0.95	12.4	3.77
<b>β-E2</b>	0.95	8.15	0.88
<b>ANDRO</b>	0.85	5.45	0.66
<b>E1</b>	0.88	14.2	4.34
<b>EE2</b>	1.77	10.0	2.50
<b>NOR</b>	0.83	4.10	4.33
<b>α-E2</b>	0.87	9.17	3.01
<b>TESTO</b>	0.98	2.32	2.30
<b>LEVO</b>	0.80	6.31	4.07
<b>ALTRE</b>	1.27	5.08	5.20
<b>MPROG</b>	0.07	4.00	4.50
<b>PROG</b>	0.19	6.96	0.77
<b>BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub></b>	1.06	10.2	N/A*
<b>β-E2-<sup>13</sup>C<sub>6</sub></b>	0.92	9.34	N/A
<b>ANDRO-<sup>13</sup>C<sub>3</sub></b>	0.86	3.03	N/A
<b>EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub></b>	0.87	12.7	N/A
<b>PROG-D<sub>9</sub></b>	0.48	5.86	N/A

\*N/A: Not applicable for internal standards.



**Table S4.3.** Matrix effects established in the different matrixes upon a comparison with neat HPLC water. (S4.3a) Spike level 1 (QC1). Pass/fail performance refers to the USEPA criterion for accuracy (70-130%), equating here to matrix effects within  $\pm 30\%$ .

	Matrix effect at QC1* (%)							
	Tap water	USEPA criterion	Surface water	USEPA criterion	Wastewater-Influent	USEPA criterion	Wastewater-Effluent	USEPA criterion
<b>E3</b>	-9 $\pm$ 7.0	✓	-37 $\pm$ 2.0	✓	-36 $\pm$ 2.3	✗	-43 $\pm$ 8.0	✗
<b>BPA</b>	-30 $\pm$ 0.4	✓	-10 $\pm$ 1.2	✓	31 $\pm$ 6.5	✓	25 $\pm$ 5.4	✓
<b>EQUIL</b>	-24 $\pm$ 4.4	✓	-30 $\pm$ 3.7	✗	-29 $\pm$ 18.3	✓	-20 $\pm$ 6.4	✓
<b>EQUI</b>	-33 $\pm$ 3.7	✗	-4 $\pm$ 0.9	✓	-32 $\pm$ 13.1	✗	-29 $\pm$ 12.4	✓
<b>ANDRO</b>	-13 $\pm$ 0.70	✓	-1 $\pm$ 0.2	✓	2 $\pm$ 8.9	✓	5 $\pm$ 9.8	✓
<b><math>\beta</math>-E2</b>	1.0 $\pm$ 3.0	✓	-13 $\pm$ 1.7	✓	-5 $\pm$ 4.6	✓	-10 $\pm$ 2.4	✓
<b>E1</b>	-21 $\pm$ 3.4	✓	-14 $\pm$ 5.9	✓	-11 $\pm$ 9.9	✓	21 $\pm$ 3.3	✓
<b>EE2</b>	-31 $\pm$ 1.4	✗	-33 $\pm$ 27	✗	-28 $\pm$ 4.9	✓	17 $\pm$ 2.3	✓
<b>NOR</b>	-12 $\pm$ 7.3	✓	-4 $\pm$ 3.8	✓	-22 $\pm$ 2.0	✓	-32 $\pm$ 5.9	✗
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	-8 $\pm$ 7.6	✓	29 $\pm$ 1.6	✓	-28 $\pm$ 6.8	✓	-18 $\pm$ 4.1	✓
<b>TESTO</b>	3 $\pm$ 2.8	✓	-33 $\pm$ 4.6	✗	29 $\pm$ 15.4	✓	21 $\pm$ 10.7	✓
<b>LEVO</b>	-13 $\pm$ 2.8	✓	-15 $\pm$ 1.6	✓	16 $\pm$ 7.5	✓	-34 $\pm$ 1.8	✗
<b>ALTRE</b>	18 $\pm$ 8.5	✓	-38 $\pm$ 1.9	✗	-16 $\pm$ 8.3	✓	-29 $\pm$ 7.5	✓
<b>MEDRO</b>	2 $\pm$ 3.8	✓	-32 $\pm$ 1.7	✗	-40 $\pm$ 5.4	✗	18 $\pm$ 0.5	✓
<b>PROG</b>	-24 $\pm$ 0.5	✓	-35 $\pm$ 4.9	✗	7 $\pm$ 4.7	✓	22 $\pm$ 21.2	✓

\*Spike level 1 (QC1) set at 5 ng·L<sup>-1</sup> for tap water or surface water, and 20 ng·L<sup>-1</sup> for wastewater.

**Table S4.3.** Matrix effects established in the different matrixes upon a comparison with neat HPLC water. (S4.3b) Spike level 2 (QC2). Pass/fail performance refers to the USEPA criterion for accuracy (70-130%), equating here to matrix effects within  $\pm 30\%$ .

Matrix effect at QC2* (%)								
	Tap water	USEPA criterion	Surface water	USEPA criterion	Wastewater-Influent	USEPA criterion	Wastewater-Effluent	USEPA criterion
<b>E3</b>	-36 ± 9	<del>X</del>	8.0 ± 7.1	✓	-5.0 ± 11.7	✓	13 ± 3.1	✓
<b>BPA</b>	-16 ± 3.2	✓	-13 ± 3.4	✓	18 ± 7.7	✓	-14 ± 9.8	✓
<b>EQUIL</b>	-28 ± 3.7	✓	-31 ± 1.2	<del>X</del>	12 ± 5.3	✓	-3 ± 5.5	✓
<b>EQUI</b>	-24 ± 4.5	✓	13 ± 10.9	✓	-20 ± 4.0	✓	7 ± 0.8	✓
<b>ANDRO</b>	-7 ± 0.5	✓	-18 ± 0.6	✓	-11 ± 6.0	✓	-4 ± 5.7	✓
<b>β-E2</b>	-3.0 ± 4.2	✓	19 ± 5.1	✓	10 ± 1.9	✓	-3 ± 5.1	✓
<b>E1</b>	7.6 ± 7.2	✓	0.4 ± 4.8	✓	-11 ± 5.3	✓	-16 ± 4.8	✓
<b>EE2</b>	-38 ± 1.4	<del>X</del>	-17 ± 14.4	✓	11 ± 7.5	✓	-8 ± 0.8	✓
<b>NOR</b>	-3 ± 4.8	✓	-11 ± 20.6	✓	-28 ± 4.5	✓	-20 ± 15.2	✓
<b>α-E2</b>	-25 ± 4.2	✓	29 ± 1.5	✓	-24 ± 19	✓	28 ± 17.7	✓
<b>TESTO</b>	-3 ± 5.6	✓	-31 ± 7.9	<del>X</del>	30 ± 7.6	✓	2 ± 1.9	✓
<b>LEVO</b>	-8 ± 5.1	✓	19 ± 0.9	✓	-22 ± 10.2	✓	18 ± 12.0	✓
<b>ALTRE</b>	-28 ± 4.2	✓	-32 ± 14.5	<del>X</del>	-22 ± 9.5	✓	-29 ± 7.5	✓
<b>MEDRO</b>	6 ± 2.6	✓	-21 ± 0.9	✓	0.2 ± 12.3	✓	-13 ± 6.4	✓
<b>PROG</b>	-0.2 ± 0.6	✓	5 ± 8.6	✓	24 ± 8.7	✓	-6 ± 11.1	✓

\*Spike level 2 (QC2) set at 150 ng·L<sup>-1</sup> for all matrix types.

**Table S4.4.** Summary of R<sup>2</sup>, LODs, and LOQs for the 15 targeted EDCs in the different studied matrixes (HPLC water, tap water, surface water, wastewater influent and wastewater effluent).

Compounds	Range (ng/L)	HPLC water			Tap water			Surface water		
		R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
<b>E3</b>	LOQ - 200	0.9983	0.01	0.03	0.9946	0.10	0.30	0.9921	0.10	0.30
<b>BPA</b>	LOQ - 200	0.9997	1.00	3.00	0.9998	0.10	0.30	0.9992	0.10	0.30
<b>EQUI</b>	LOQ - 200	0.9997	0.01	0.03	0.9997	0.03	0.09	0.9993	0.15	0.45
<b>EQUIL</b>	LOQ - 200	1.0000	0.01	0.03	0.9945	0.10	0.30	0.9999	0.15	0.45
<b>ANDRO</b>	LOQ - 200	0.9990	0.05	0.15	0.9974	0.05	0.15	0.9995	0.15	0.45
<b>β-E2</b>	LOQ - 200	0.9996	0.05	0.15	0.9976	0.10	0.30	0.9999	0.10	0.30
<b>E1</b>	LOQ - 200	0.9998	0.01	0.03	0.9998	0.10	0.30	0.9993	0.10	0.30
<b>EE2</b>	LOQ - 200	0.9996	0.10	0.30	0.9999	0.10	0.30	0.9913	0.50	1.50
<b>NOR</b>	LOQ - 200	0.9999	0.01	0.03	0.9999	0.50	1.50	0.9950	0.50	1.50
<b>α-E2</b>	LOQ - 200	0.9991	0.01	0.03	0.9950	0.10	0.30	0.9997	0.10	0.30
<b>TESTO</b>	LOQ - 200	0.9998	0.01	0.03	0.9974	0.10	0.30	0.9999	0.15	0.45
<b>LEVO</b>	LOQ - 200	0.9995	0.02	0.06	0.9994	0.10	0.30	0.9992	0.50	1.50
<b>MEDRO</b>	LOQ - 200	0.1000	0.01	0.03	0.9967	0.10	0.30	0.9966	0.25	0.75
<b>ALTRE</b>	LOQ - 200	0.9991	0.01	0.03	0.9970	0.10	0.30	0.9998	0.25	0.75
<b>PROG</b>	LOQ - 200	0.9995	0.04	0.12	0.9974	0.10	0.30	0.9997	0.20	0.60

Compounds	Range (ng/L)	Wastewater (influent)			Wastewater (effluent)		
		R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
<b>E3</b>	LOQ - 200	0.9938	0.50	1.50	0.9997	0.16	0.48
<b>BPA</b>	LOQ - 200	0.9906	1.00	3.00	0.9990	0.20	0.60
<b>EQUI</b>	LOQ - 200	0.9949	0.50	1.50	0.9970	0.25	0.75
<b>EQUIL</b>	LOQ - 200	0.9910	0.50	1.50	0.9970	0.25	0.75
<b>ANDRO</b>	LOQ - 200	0.9994	0.50	1.50	0.9996	0.40	1.20
<b>β-E2</b>	LOQ - 200	0.9997	0.50	1.50	0.9999	0.25	0.75
<b>E1</b>	LOQ - 200	0.9998	1.00	3.00	0.9992	0.40	1.20
<b>EE2</b>	LOQ - 200	0.9931	1.00	3.00	0.9995	1.00	3.00
<b>NOR</b>	LOQ - 200	0.9993	1.00	3.00	0.9991	1.00	3.00
<b>α-E2</b>	LOQ - 200	0.9920	1.00	3.00	0.9990	0.50	1.50
<b>TESTO</b>	LOQ - 200	0.9928	0.50	1.50	0.9990	0.40	1.20
<b>LEVO</b>	LOQ - 200	0.9978	1.00	3.00	0.9996	0.30	0.90
<b>MEDRO</b>	LOQ - 200	0.9980	1.00	3.00	0.9985	0.25	0.75
<b>ALTRE</b>	LOQ - 200	0.9975	0.50	1.50	0.9996	0.50	1.50
<b>PROG</b>	LOQ - 200	0.9998	1.00	3.00	0.9999	0.15	0.45

**Table S4.5.** Intra-day and inter-day precision (RSD%) for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (QC1 and QC2, see also Text S4.3). RSDs higher than 20% are indicated in bold.

	Intra-day precision (RSD%)										Inter-day precision (RSD%)									
	QC1*					QC2**					QC1*					QC2**				
	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff
<b>E3</b>	9.3	2.8	4.5	2.4	0.6	2.3	2.1	2.0	0.2	5.4	11.4	6.8	21.0	<b>28.0</b>	9.7	14.6	7.1	0.4	18.9	8.4
<b>BPA</b>	1.0	1.6	2.9	2.4	1.0	1.4	1.2	1.1	2.2	0.2	12.8	1.7	10.3	<b>24.4</b>	2.4	8.7	1.1	5.3	9.7	0.8
<b>EQUIL</b>	3.8	0.6	3.6	4.0	3.4	2.9	1.9	7.9	2.1	0.1	5.9	1.0	15.8	<b>21.2</b>	7.5	4.2	3.5	9.1	17.2	3.3
<b>EQUI</b>	2.3	0.6	3.9	6.0	2.1	6.2	0.4	3.3	2.0	0.5	2.0	2.7	13.7	<b>20.8</b>	7.5	1.4	4.5	7.7	6.7	6.9
<b>ANDRO</b>	2.3	0.9	0.9	1.2	0.9	3.2	0.6	0.5	0.8	0.3	2.6	3.1	5.0	<b>29.7</b>	8.5	1.2	2.7	1.1	9.1	2.7
<b>β-E2</b>	1.1	1.6	1.0	2.0	1.5	2.2	2.5	0.9	1.5	1.2	10.8	0.8	4.9	2.9	2.1	1.8	1.1	2.3	5.7	0.9
<b>E1</b>	2.6	0.6	1.6	3.2	1.5	3.1	1.6	1.9	2.8	2.3	5.0	0.5	2.9	9.0	6.8	3.3	2.8	7.7	13.2	3.2
<b>EE2</b>	2.7	1.6	5.0	14.0	6.1	2.1	1.1	3.2	1.2	1.1	3.9	0.9	8.8	<b>26.9</b>	1.7	1.7	1.3	3.8	<b>29.9</b>	1.7
<b>NOR</b>	3.4	1.5	4.9	3.8	2.8	3.1	0.4	1.4	2.7	10.3	5.2	2.3	9.9	<b>27.3</b>	15.3	3.8	2.4	4.0	14.4	13.3
<b>α-E2</b>	1.7	1.1	0.6	4.0	2.4	1.5	1.4	2.2	1.4	1.5	5.3	1.7	5.3	15.6	2.1	1.8	3.0	2.8	3.8	1.1
<b>TESTO</b>	1.8	0.3	1.6	15.3	1.6	4.5	0.4	0.6	2.8	9.2	5.3	1.2	3.5	16.6	12.8	5.1	3.6	2.5	<b>22.1</b>	8.2
<b>LEVO</b>	1.9	2.3	5.2	7.5	7.2	3.0	0.5	4.2	2.3	3.2	7.9	3.8	11.8	7.4	4.1	5.8	4.0	10.4	7.6	5.7
<b>MEDRO</b>	5.0	1.0	5.8	8.7	4.9	2.8	0.7	4.9	2.2	0.3	4.8	0.7	5.3	8.6	0.6	6.9	3.5	4.8	1.6	4.4
<b>ALTRE</b>	1.0	3.8	4.4	5.0	8.5	4.0	0.5	4.3	5.9	0.4	24.2	13.3	10.0	<b>24.1</b>	16.1	6.6	11.8	2.0	<b>26.1</b>	15.3
<b>PROG</b>	1.6	1.1	1.1	1.4	1.2	3.3	1.3	0.4	1.3	0.9	4.1	1.4	8.0	0.9	7.7	7.9	3.2	0.5	7.0	2.4

\*Spike level 1 (QC1) set at 1 ng·L<sup>-1</sup> for HPLC water, 5 ng·L<sup>-1</sup> for tap water or surface water, and 20 ng·L<sup>-1</sup> for wastewater.

\*\*Spike level 2 (QC2) set at 150 ng·L<sup>-1</sup> for all matrix types.

**Table S4.6.** Accuracy (%) performance of matrix-matched extracted calibrants for HPLC water, tap water (TW), surface water (SW), wastewater influent (Inf) and wastewater effluent (Eff), at two quality control levels (QC1 and QC2, see also Text S4.3). Accuracy values were all within the USEPA acceptance criterion of 70-130%.

	Accuracy%									
	QC1*					QC2**				
	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff	HPLC water	TW	SW	Inf	Eff
<b>E3</b>	96	95	89	71	73	98	98	88	77	99
<b>BPA</b>	72	99	93	75	97	95	96	94	89	98
<b>EQUIL</b>	82	92	92	79	99	99	95	96	89	98
<b>EQUI</b>	94	99	92	84	73	99	98	97	86	97
<b>ANDRO</b>	91	97	92	88	92	92	97	97	98	97
<b>β-E2</b>	98	94	99	81	82	99	98	98	96	96
<b>E1</b>	96	88	95	97	98	98	93	97	97	91
<b>EE2</b>	93	90	91	86	84	98	100	96	96	97
<b>NOR</b>	91	97	75	86	75	100	98	89	98	86
<b>α-E2</b>	86	92	99	93	82	97	91	100	94	91
<b>TESTO</b>	93	97	93	71	99	98	97	99	78	97
<b>LEVO</b>	84	79	99	85	97	87	99	99	96	97
<b>MEDRO</b>	97	99	95	97	99	96	98	98	99	96
<b>ALTRE</b>	96	91	90	71	93	93	98	99	82	97
<b>PROG</b>	88	93	94	72	76	96	96	98	95	98

\*Spike level 1 (QC1) set at 1 ng·L<sup>-1</sup> for HPLC water, 5 ng·L<sup>-1</sup> for tap water or surface water, and 20 ng·L<sup>-1</sup> for wastewater.

\*\*Spike level 2 (QC2) set at 150 ng·L<sup>-1</sup> for all matrix types.

**Table S4.7.** Individual concentrations and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in river surface waters from different locations in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	<b>#1</b>	<b>#2</b>	<b>#3</b>	<b>#4</b>	<b>#5</b>	<b>#6</b>	<b>#7</b>	<b>#8</b>	<b>#9</b>
<b>E3</b>	ND	0.89	ND	ND	ND	ND	0.36	ND	ND
<b>BPA</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUI</b>	2.38	5.18	5.03	1.89	0.59	0.97	0.56	< LOQ	ND
<b>EQUIL</b>	3.73	3.76	2.64	1.86	ND	1.00	0.74	< LOQ	ND
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	5.48	5.07	9.22	4.35	1.30	2.09	1.34	1.18	ND
<b>E1</b>	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	< LOQ	3.90	3.67	5.24	1.20	1.62	2.33	2.56	ND
<b>NOR</b>	ND	14.8	ND	ND	ND	ND	2.09	3.46	< LOQ
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	1.11	1.00	1.52	0.82	< LOQ	0.38	< LOQ	0.43	ND
<b>TESTO</b>	ND	< LOQ	< LOQ	ND	ND	< LOQ	< LOQ	< LOQ	ND
<b>LEVO</b>	ND	2.19	ND	ND	ND	< LOQ	< LOQ	2.44	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	< LOD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	0.66	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	12.7	36.8	22.1	14.2	3.75	6.06	7.42	10.1	< LOQ

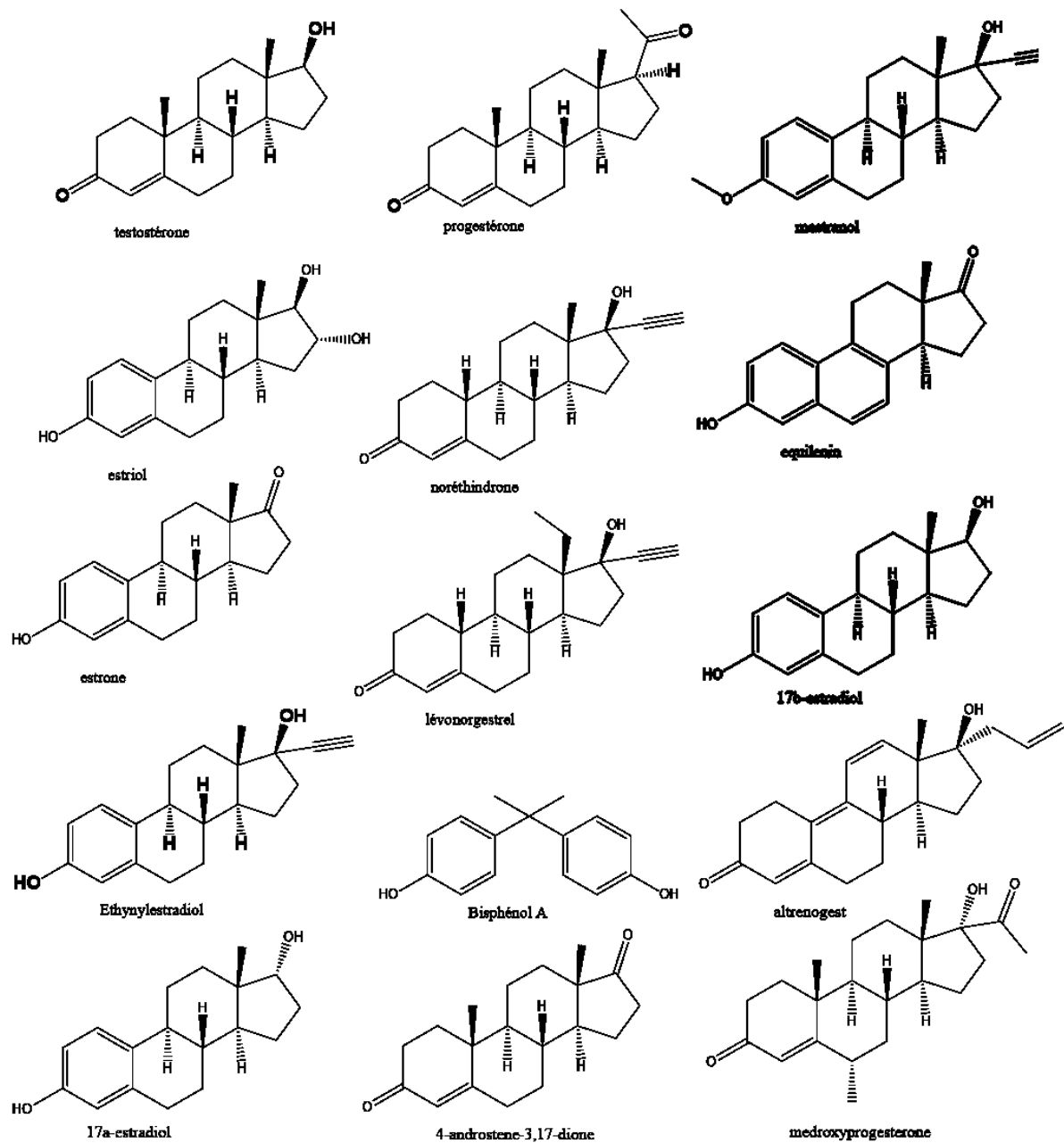
**Table S4.7 (Continued).** Individual concentrations and summed concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in river surface waters from different locations in the province of Quebec (Canada). Concentrations are expressed in ng·L<sup>-1</sup>.

	<b>#10</b>	<b>#11</b>	<b>#12</b>	<b>#13</b>	<b>#14</b>	<b>#15</b>	<b>#16</b>	<b>#17</b>
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	0.92	ND	ND
<b>BPA</b>	10.7	ND	ND	ND	13.0	ND	ND	ND
<b>EQUI</b>	ND	< LOQ	ND	< LOQ	ND	1.10	ND	ND
<b>EQUIL</b>	ND	1.38	ND	1.03	ND	1.88	ND	ND
<b>ANDRO</b>	ND	ND	< LOQ	0.61	ND	0.78	ND	< LOQ
<b>β-E2</b>	< LOQ	1.44	1.00	3.26	< LOQ	1.18	ND	< LOQ
<b>E1</b>	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	3.68	5.71	4.61	4.88	< LOQ	0.94	ND
<b>NOR</b>	2.54	< LOQ	ND	11.5	13.6	13.6	7.71	ND
<b>α-E2</b>	ND	< LOQ	< LOQ	0.58	ND	< LOQ	ND	< LOQ
<b>TESTO</b>	< LOQ	0.50	0.52	0.80	0.59	0.62	< LOQ	< LOQ
<b>LEVO</b>	1.70	4.47	2.99	6.85	< LOQ	5.25	4.69	2.62
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	14.9	11.5	10.2	29.2	32.1	25.4	13.3	2.62

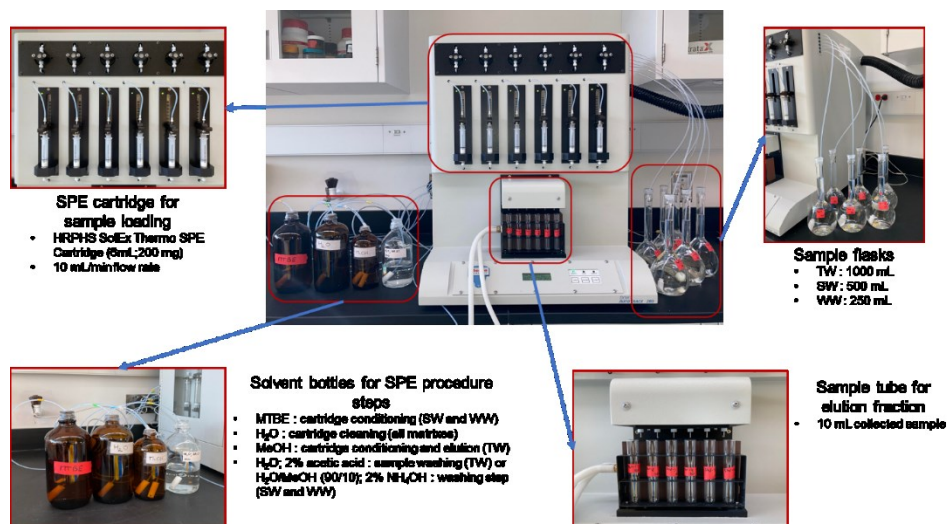
**Table S4.8.** Geographical information and identification of studied sites for the quantification of EDCs in tap water (Province of Quebec).

<b>Sample #</b>	<b>Zone</b>	<b>City</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>TW 1</b>		<b>L'Assomption</b>	45°50'23.83"N	73°24'50.53"O
<b>TW 2</b>		<b>Sainte-Thérèse</b>	45°37'59.87"N	73°50'1.24"O
<b>TW 3</b>	<b>North Shore</b>	<b>Laval</b>	45°34'17.19"N	73°49'46.98"O
<b>TW 4</b>		<b>Saint-Eustache</b>	45°33'32.55"N	73°53'41.18"O
<b>TW 5</b>		<b>Vaudreuil-Dorion</b>	45°24'13.84"N	74° 1'50.82"O
<b>TW 6</b>	<b>Montreal</b>	<b>Montréal</b>	45°30'9.89"N	73°36'55.12"O
<b>TW 7</b>	<b>Island</b>	<b>Pointe-Claire</b>	45°28'19.57"N	73°47'56.77"O
<b>TW 8</b>		<b>Saint-Hyacinthe</b>	45°38'18.71"N	72°57'53.59"O
<b>TW 9</b>		<b>Longueuil</b>	45°31'42.58"N	73°30'55.97"O
<b>TW 10</b>	<b>South Shore</b>	<b>Brossard</b>	45°26'31.41"N	73°29'0.33"O
<b>TW 11</b>		<b>Saint-Jean-sur-Richelieu</b>	45°18'37.68"N	73°15'56.25"O
<b>TW 12</b>		<b>Salaberry-de-Valleyfield</b>	45°14'39.50"N	74° 6'30.55"O

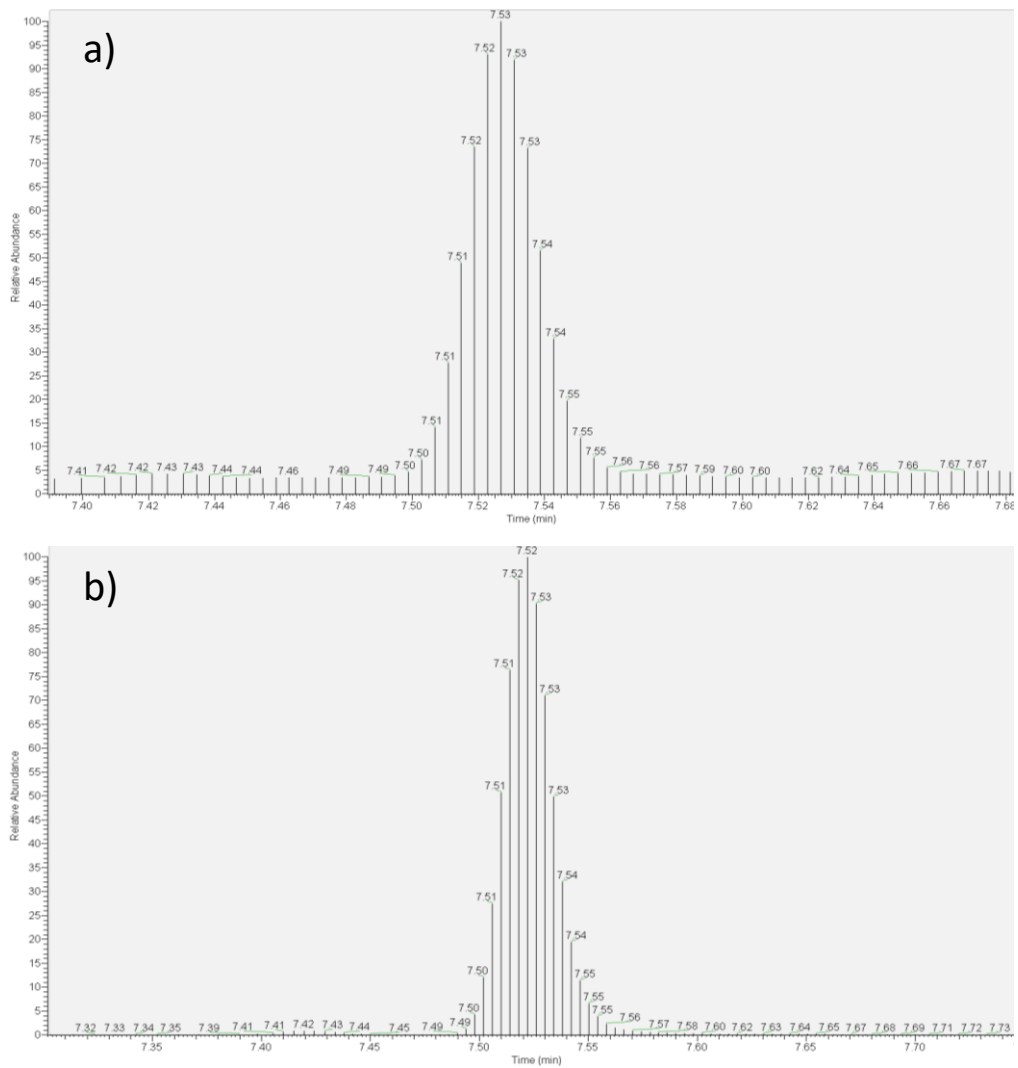




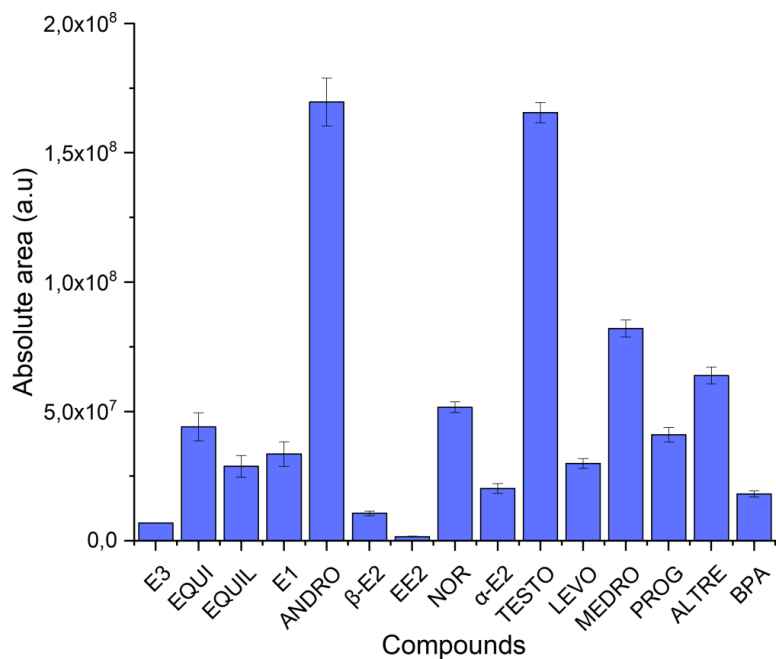
**Figure S4.1.** Chemical structures of the targeted EDCs.



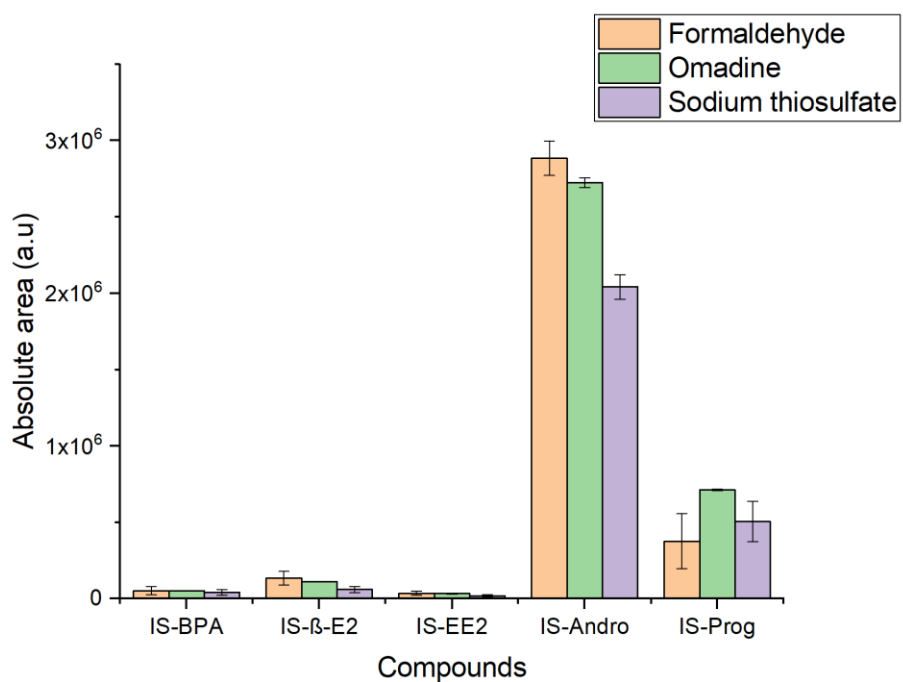
**Figure S4.2.** Illustration of the automated offline solid-phase extraction apparatus used for sample pre-concentration.



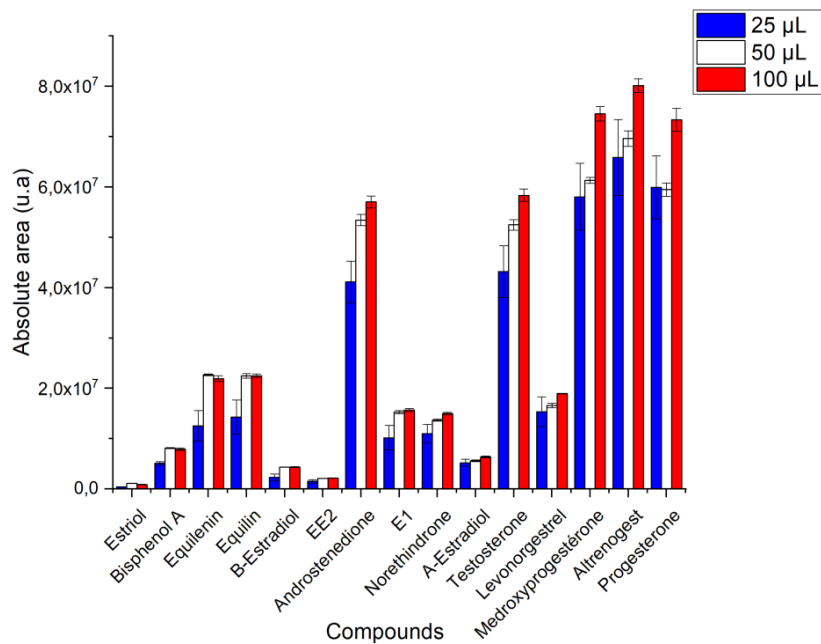
**Figure S4.3.** Number of points per chromatographic peak illustrated for medroxyprogesterone at low (a) and high (b) concentration.



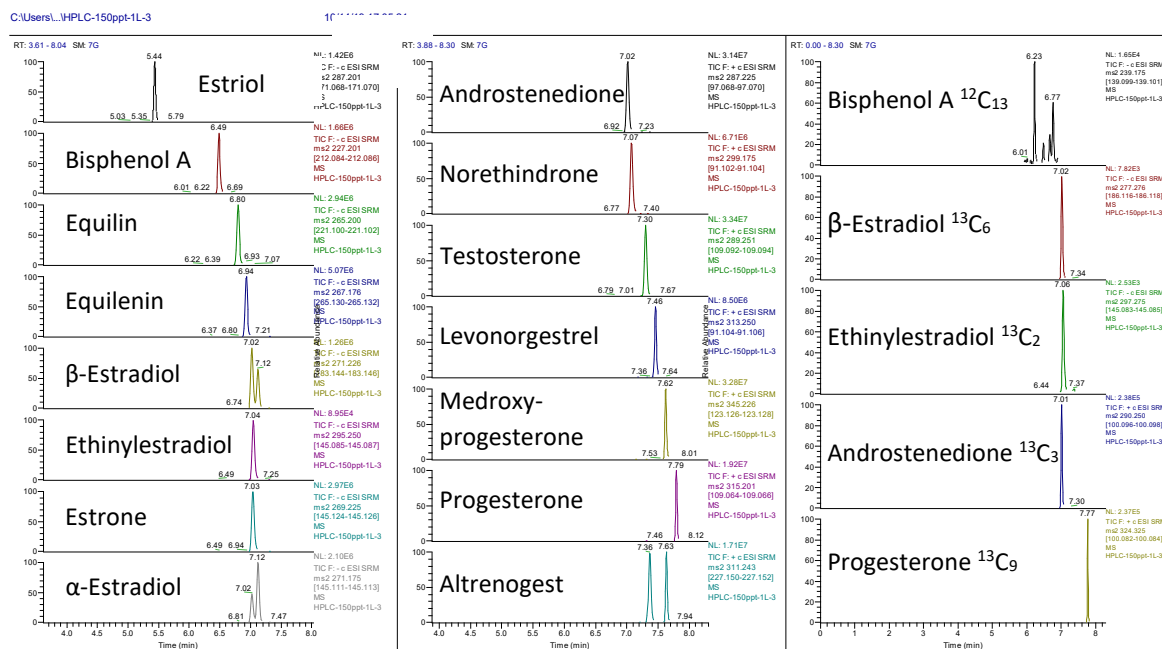
**Figure S4.4.** Analyte mean absolute areas for 5 CCV samples (spike level: 100 ng·L<sup>-1</sup>) regularly injected during an LC-MS sequence of 25 samples. Error bars refer to standard deviations (n = 5).



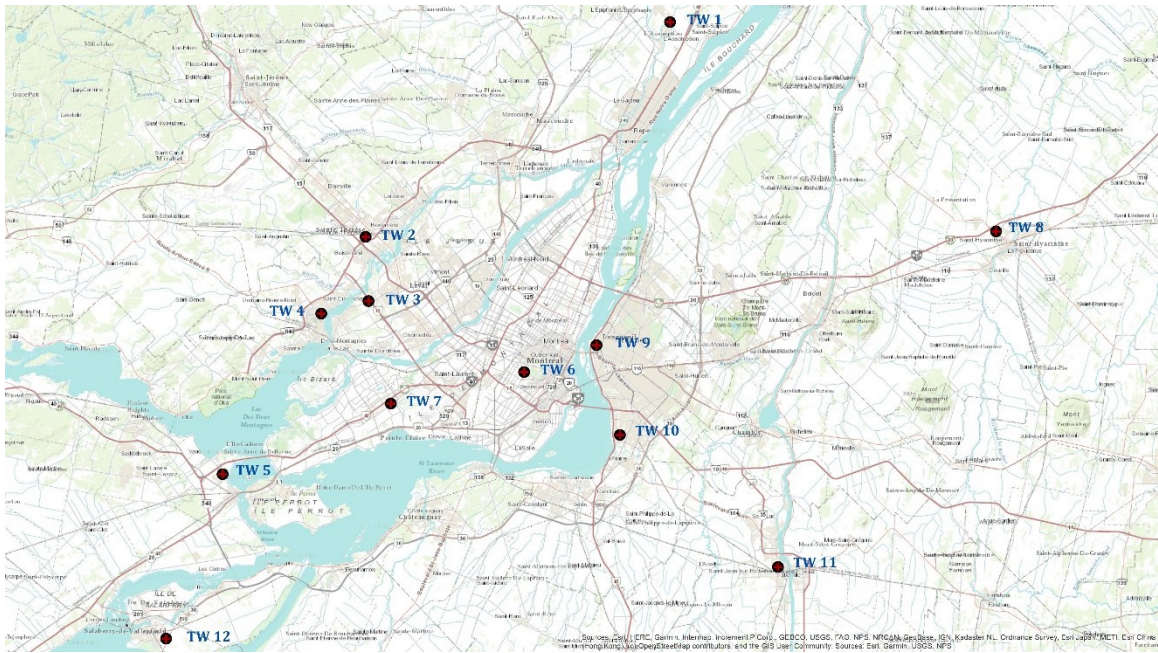
**Figure S4.5.** Variability of IS absolute signal depending on the preservative agent amended to surface water samples (concentration: 100 ng·L<sup>-1</sup>).



**Figure S4.6.** Signal intensity variation depending on the injection volume (fully aqueous reconstitution medium).



**Figure S4.7.** Off-line SPE-UHPLC-MS/MS chromatograms obtained with the optimized parameters (note:  $RT_{\text{alitrenogest}} = 7.63$  min).



**Figure S4.8.** Map of tap water sampling sites (Province of Quebec, Canada)

# **Chapitre 5. Évaluation du risque en lien avec la présence des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase dissoute et la matière particulaire en suspension dans les eaux de surface du Québec, Canada**

Article accepté dans Environmental Advances (2022)

**“Occurrence and seasonal distribution of steroid hormones and bisphenol A in surface waters and suspended sediments of Quebec, Canada”.**

Auteurs : **Ken Goeury, Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Michèle Prévost, Sébastien Sauvé**

Description : Article faisant état de l’analyse sur une année des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la phase dissoute et la phase particulaire ayant pour but d’évaluer la variabilité et la saisonnalité des concentrations d’analytes présents dans un cours d’eau impacté par les effluents de stations d’épuration : la Rivière des Mille-Îles (Québec). Plusieurs échantillonnages furent réalisés toute une année durant afin d’obtenir un cycle complet.

Contributions: Avec l’aide de mon superviseur, j’ai effectué la conception du projet. J’ai réalisé l’ensemble la collecte des échantillons sur le terrain ainsi que la réalisation des manipulations en laboratoire. Par la suite, j’ai procédé au traitement de données et à la rédaction de l'article.

Co-auteurs: Sung Vo Duy et Gabriel Munoz m'ont aidé à réviser l'article.

Co-directrice: Michèle Prévost m'a aidé à réviser l'article.

Directeur: Sébastien Sauvé m'a aidé à la conception du projet et à la révision de l'article.

## Abstract

Limited information is available regarding the seasonal and spatial distribution of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Canadian surface waters. Using improved analytical methods, we set out to evaluate the occurrence and risks of 15 EPA-priority EDCs in the St. Lawrence River and its main tributaries (69 locations). Surface water samples were also collected during a complete seasonal cycle along the Mille Iles River (17 locations), a tributary impacted by wastewater effluents and sewer overflows. In total, 137 surface water samples were analyzed for steroid hormones (altrenogest, androstenedione, equilin, equilenin, ethinylestradiol,  $\alpha$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol, estriol, estrone, levonorgestrel, medroxyprogesterone, norethindrone, progesterone, testosterone) and bisphenol A, in both the dissolved phase and suspended particulate matter (SPM). Of the 15 targeted EDCs, 14 compounds presented positive detections in the dissolved phase and 13 in the SPM. Summed EDC concentrations were reported in the range of 0.4–73  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in dissolved phase samples and 0.1–228  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  in SPM samples. Bisphenol A was rarely detected in the dissolved phase but accumulated at high levels in suspended solids. Summed concentrations of hormones were generally higher during the spring and winter seasons, and lower during the summer. Estradiol ( $\beta$ -E2) presented the most frequent exceedances to the predicted no-effect concentration threshold (28/137 samples above the PNEC, or 20%), while a few exceedances were also reported for ethinylestradiol (4/137 above the PNEC, or 3%). The total estrogenic activity ( $\text{EEQ}_{\text{total}}$ ) was higher than the threshold of 1  $\text{ng E2}\cdot\text{L}^{-1}$  for 26/137 samples, with estriol (E3) and  $\beta$ -E2 the preponderant contributors.

## Keywords

EPA-priority endocrine disruptors; Steroid hormones and bisphenol A; Surface water; Suspended particulate matter ; Seasonal variations



## 5.1 Introduction

The occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in aquatic ecosystems raises concerns due to the continuous inputs from human activities and the toxicity through interference with the hormonal system in exposed organisms. Synthetic hormones are produced for both human and animal consumption. An example is the synthetic estrogens widely used in oral contraceptives [115,491,492], with ethinylestradiol and levonorgestrel the main representatives. Estrogens used in hormone replacement therapy and in hormone therapy for cancer, and androgens (such as testosterone) used to promote strength and muscle mass, are other examples [493]. Animal husbandry is also responsible for significant loads of hormones [494–497]. The natural hormones released in greater quantities by mammals are estrone (E1), the two isomers of estradiol ( $\alpha$ -E2 and  $\beta$ -E2), as well as several metabolites that may vary depending on the species. Cattle also excrete hormones that are administered as growth promoters [135,498]. These include  $\beta$ -E2, E2-benzoate/progesterone, E2-benzoate/testosterone, E2/trenbolone acetate (TBA), and E2-benzoate/TBA [130]. Estrogens such as estrone (E1), estradiol (E2), and ethinylestradiol (EE2) can induce endocrine-related effects on non-targeted aquatic organisms, including developmental and behavioral alterations [71,187,417,499,500]. For instance, declines in fathead minnow (*Pimephales promelas*) populations (due to induced feminization) were reported at EE2 exposure levels as low as part-per-trillion concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in the Experimental Lakes Area (Ontario, Canada) [57]. Bisphenol A (BPA) is used as a precursor in the production of polymers such as polycarbonates, in epoxy resins, as well as a non-polymeric additive in plastics such as polyvinyl chloride. BPA and its analogs have been suggested to cause a range of endocrine-related diseases [122,501–503].

Endocrine disruptors have been the subject of numerous monitoring studies to document their occurrence and fate in aquatic ecosystems. Rivers located in densely urbanized watersheds are particularly at risk from effluents of wastewater treatment plants (WWTPs) released in surface water. Among the natural estrogens, E1 (produced during the menstrual cycles) and estriol (E3, produced during pregnancy) are often the most recurrently detected in wastewater effluents [265,504]. Concentrations of certain hormones may be higher in the treated effluent than in the raw influent due to biotransformation of conjugated species back to initial (unconjugated) forms [224]. The analysis of hormones

in aquatic matrices is often the result of *ad hoc* sampling carried out over a short period of time. Despite relatively regular inputs from human populations, steroid hormone levels can be, however, highly variable both spatially and temporally. Labadie and Budzinski investigated steroid profiles along a river where the WWTP effluent accounted for ~10-30% of the river flow. They noted a sharp decrease in E1 surface water concentrations away from the WWTP outfall, which was not only explained by dilution effects but also by degradation processes, especially in summer months with higher decay rates compared to other seasons [423]. Differences in EDC concentrations were also noted between the wet and dry seasons in a survey of the Jiulong River, China [201]. While the presence of hormones in the dissolved phase is well documented, fewer studies have focused on the presence of hormones in the suspended particulate matter (SPM) [262,285,471,505]. However, suspended sediments can accumulate significant levels of EDCs due to their moderately polar nature, resulting in potentially higher risks for aquatic life [261]. To properly characterize the risks to aquatic organisms from EDC exposure, both the dissolved and particulate phases of the water column shall be considered.

The St. Lawrence River ranks among the largest waterways in North America, with a mean annual discharge of *circa* 12 000 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> at Quebec City (QC, Canada). Along its course between Kingston, ON, and Quebec City, QC, it is impacted by wastewater discharges from more than 4 million people, the largest contributor being the Montreal Metropolitan Area (*Communauté Métropolitaine de Montréal*, CMM) [506]. Discharges of CMM wastewaters represent a combined daily input of 3.5 million m<sup>3</sup>—70% of which originates from the Montreal WWTP, one of the largest sewage treatment plants in North America [506]. A long-term experiment with caged freshwater mussels (*Elliptio complanata*) showed a higher proportion of females within the WWTP effluent plume, compared to mussels exposed in the St. Lawrence upstream from the WWTP reject point [507]. The authors postulated that exposure to steroids such as cholesterol, coprostanol, or estradiol-like compounds may be the reason for the feminization and increased vitellogenin levels [507]. The spatial distribution of EDCs along the St. Lawrence River remains, however, to be documented. Some tributary rivers within the CMM, such as the Mille-Iles River (north of Laval, QC, Canada), are also particularly impacted by urban inputs including treated effluents of multiple WWTPs and combined sewer overflows (CSOs). In

wild mussels (*E. complanata*) collected upstream/downstream from two municipal effluents in the Mille-Iles River, the proportion of females was shown to dramatically increase (from 30% at upstream to 80% at downstream sites) [508]. Another study on mussels caged downstream the two main WWTPs operating along the Mille-Iles River showed impacts on vitellogenin and immune status [509]. River water environmental guidelines and/or predicted no effect concentrations (PNEC) for aquatic species are often in the low  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  levels for estrogenic hormones (Table 1) [373,422,465,510,511]. For instance, British Columbia has established guidelines of  $0.5\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (chronic) and  $0.75\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (acute) for EE2 in surface waters [373]. The European Union Water Framework Directive (EU WFD) has also set stringent guidelines for EU-priority E1 ( $0.4\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\beta$ -E2 ( $0.4\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and EE2 ( $0.035\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [486]. Previous monitoring studies conducted in Eastern Canada generally could not make comparisons to guidelines due to limited analytical sensitivity. Detection limits were in the typical range of  $0.5\text{-}50\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for surface waters [382,420,512], which is higher than most available guidelines. In a companion paper [513], we validated methods for the expanded UHPLC-MS/MS analysis of steroid hormones and bisphenol A in diverse water matrixes based on the updated US EPA priority list. The high pre-concentration factor (2000-fold) and specific cleanup procedure resulted in detection limits of  $0.1\text{-}0.5\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  [513], a necessary step in making comparisons to PNEC values as performed in some monitoring studies from Europe and Asia [422,465]. Assessing which of these EDCs are most recurrent in Quebec surface waters, and how concentrations might change with different seasons, are other knowledge gaps to address.

In this case-study, we investigated the occurrence and risks of priority endocrine disruptors in surface waters of Quebec (Canada), targeting both the dissolved and particulate phases. A first sampling (survey 1) was performed at a large spatial scale, including a 200-km reach of the St. Lawrence River and 15 of its tributary rivers along a dense population axis (*ca.* 4 million inhabitants). Surface water samples were collected in a series of cross-sections within the St. Lawrence with assistance of the R/V *Lampsilis*, in order to establish contamination profiles in the different water masses that compose this complex hydrosystem. This is the first study to document the levels of EPA-priority hormones and BPA along a longitudinal gradient of the St. Lawrence River, to the best of our knowledge. The next step (survey 2) involved a seasonal monitoring of steroid

hormones and bisphenol A in the Mille-Iles River (north of Laval, QC, Canada) impacted by multiple urban sources (WWTP effluents, runoff, and CSOs). A series of 17 sample locations were monitored to elucidate spatial distribution and temporal variations. For both surveys, we conducted a preliminary risk assessment for aquatic life by calculating risk quotients (regarding PNEC values) and estrogenic activity. The new data will contribute to current efforts toward updating the lists of emerging contaminants monitored in Canada and verifying compliance with environmental quality guidelines.

## 5.2 Materials and methods

### 5.2.1 Chemicals and standards

Native standards of estrone (E1),  $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2),  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), estriol (E3), ethinylestradiol (EE2), equilin (EQUI), equilenin (EQUIL), androstenedione (ANDRO), levonorgestrel (LEVO), norethindrone (NOR), testosterone (TESTO), progesterone (PROG), medroxyprogesterone (MPROG), and altrenogest (ALT) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) at a purity of 97% or higher. Bisphenol A (BPA; purity 97%) was also acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). Isotopically labelled internal standards (purity  $\geq 98\%$ ), including progesterone- $^{13}\text{C}_3$ , androstenedione- $\text{d}_3$ , estradiol- $^{13}\text{C}_6$  and bisphenol A- $^{13}\text{C}_{12}$ , were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, U.S.A.). Further details on solvents and materials are provided in the Supporting Information (**Text S5.1**).

### 5.2.2 Sample collections

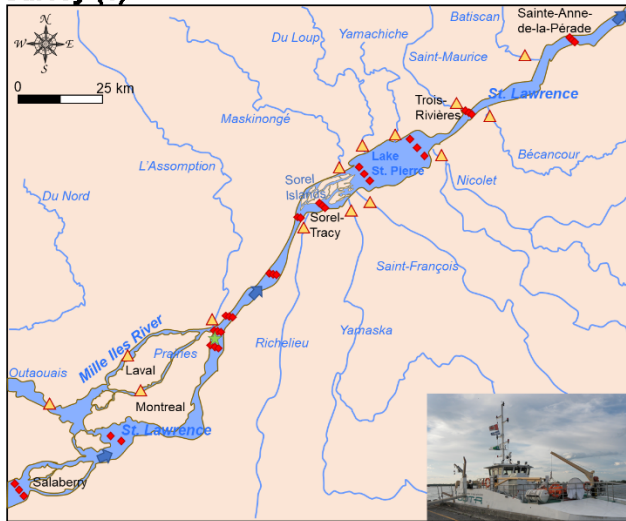
Surface water samples ( $n = 137$ ) were collected during two main surveys: (1) the *Lampsilis* survey; and (2) the Mille-Iles survey. In survey 1, a pilot monitoring exercise was conducted to evaluate the occurrence of EDCs at a large spatial scale in southwestern Quebec, Canada (**Figure 5.1** and SI **Figure S5.1**). A total of 69 samples were collected on the St. Lawrence River and some of its major tributaries in the summer of 2017 [514]. Samples within the St. Lawrence River were collected with the *Lampsilis* R/V. The sampling strategy included a series of cross-sections (generally 3 sampling points to cover

potentially different water masses, south shore, center point, and north shore) at each longitudinal station. Transects within the St. Lawrence River covered the area between Lake St. Francis (Salaberry-de-Valleyfield) and Sainte-Anne-de-la-Pérade, downstream from Trois-Rivières (**Figure 5.1**). Among these samples, 19 were also collected by boat in the archipelago of the Sorel islands (SI **Figure S5.1-c**). Fifteen tributaries of the St. Lawrence River were also investigated (the rivers Assomption, Batiscan, Bécancour, Des Mille Iles, Des Prairies, Du Loup, Du Nord, Maskinongé, Nicolet, Ottawa, Saint-François, Saint-Maurice, Richelieu, Yamachiche, and Yamaska). Further details on geographical locations are presented in SI (**Table S5.1**).

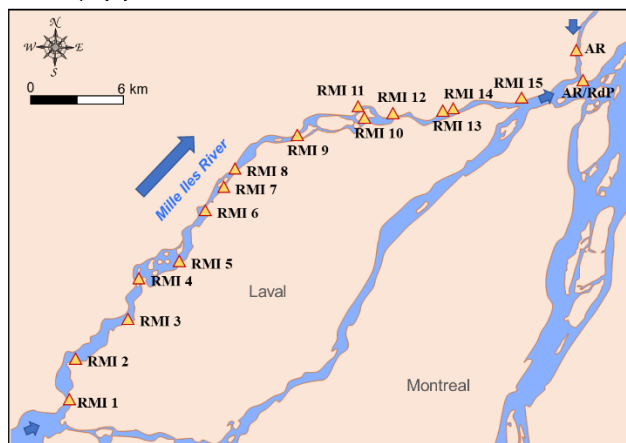
In survey 2, surface water samples were collected during the year 2020 (winter, spring, summer, fall) at 17 locations along the Rivière Des Mille Iles (**Figure 5.1**, see also SI **Table S5.2**). The Rivière Des Mille Iles (north of Laval, QC, Canada) was selected for the repeated sampling exercise (4 seasons) based on a previous study reporting endocrine disruption effects on caged mussels near a municipal wastewater outfall [509]. A total of 68 samples were collected as part of survey 2, covering the area from Sainte-Marthe-sur-le-Lac to Repentigny (RMI1 and AR/RdP, respectively, in **Figure 5.1**).

Water samples were collected in pre-cleaned 4 L amber glass bottles previously amended with preservative (antibacterial growth) agent (2-mercaptopyridine,  $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and extraction salt (sodium chloride,  $116 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). At each water sampling location, the corresponding container was filled with water and the bottle was sealed. Immediately after sample collection, the bottle was vigorously shaken to homogenize the solution and kept on ice in a dark cooling box (temperature  $< 4^\circ\text{C}$ ). Upon reception at the laboratory, samples were filtered and stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis, which occurred no later than 28 days from the sampling date as per EPA protocols [266,420,458]. Prior to analysis, glass fiber filters (GFF,  $0.3 \mu\text{m}$ , Sterlitech Corporation, Kent, WA, U.S.A.) were dried and weighed. To collect the suspended matter, the samples were filtered through the dry filters. The filtered volume depended on the sample and its solid load. The filters were dried and stored frozen ( $-20^\circ\text{C}$ ) until analysis.

### Survey (1)



### Survey (2)



**Figure 5.1.** Maps showing the location of surface water sampling sites as part of Survey (1) (top panel) and Survey (2) (bottom panel). River flow directions are indicated in blue arrows. In Survey (1), samples were collected by performing a series of transects along a 200-km reach of the St. Lawrence River (red diamond symbols) as part of the *Lampsilis* R/V monitoring, while additional samples were collected near the mouth of its major tributary rivers (yellow isosceles symbols). For readability, the 19 sampling sites located in the Sorel Islands area are not shown here but can be found in the zoomed-in map in SI (Figure S1-c). The green star symbol denotes the position of the Montreal WWTP effluent reject point (see also SI Figure S1-b). In Survey (2), 17 locations were monitored along the Mille Iles River: 15 from its source (RMI 1) to its mouth (RMI 15), with two additional samples near the mouth of L'Assomption River (AR and AR/RdP). The sampling of Survey (2) was repeated across 4 seasons.

### 5.2.3 Sample preparation and instrumental analysis

Surface water samples were prepared in a 500 mL glass volumetric flask, purified and preconcentrated as follows. Automated solid-phase extraction involved using a Dionex™ AutoTrace™ 280 Solid-Phase Extraction Instrument (Dionex/Thermo Fischer, USA). The SolEx HRPHS Polymer-Based SPE cartridge (Dionex/Thermo Fischer, USA) was rinsed with a 5 mL MTBE (methylterbutylether) volume and 5 mL methanol volume then conditioned with 5 mL of HPLC water. The water sample (500 mL) was then loaded on the cartridge with a 10 ml/min flow rate. At the end of the loading step, the bottle was rinsed with 10 mL of HPLC water, and the resulting solution was loaded on the cartridge. The sample washing step was performed with two volumes of 5 mL of a solution of HPLC-water/methanol (90/10) containing ammonium hydroxide (2% v/v), followed by 5 mL of HPLC water. Afterward, the SPE cartridge was dried for 40 minutes under a nitrogen flow (connected to the Autotrace lines). The SolEx HRPHS SPE cartridge was subsequently removed from the Autotrace. For the cleaning/elution step, silica (Si-1) SPE cartridges were placed on a vacuum manifold and conditioned with 5 mL of a DCM/acetone mixture (70/30). The loaded SolEx HRPHS cartridge was then placed in tandem above the silica cartridge. Finally, 10 mL of a DCM/acetone solution (70/30) were passed through the cartridges in two 5 mL volumes for elution. Samples were spiked with isotope-labelled internal standards (50 µL of a 0.5 ppm IS mix, i.e., equating to 50 ng·L<sup>-1</sup> as initial concentration in a 500 mL sample) and evaporated to dryness under a nitrogen flow and mild heating (40-50 °C). Prior to analysis, samples were reconstituted in 250 µL of 90:10 (v/v) HPLC water:methanol.

The SPM extraction proceeded as follows. The glass fiber filter was placed into a 15 mL centrifuge tube. A 5 mL mixture of methanol and acetone (3:1 v/v) was then added to the centrifuge tube. The latter was vortex-mixed for 10 seconds (2500 rpm) and sonicated (20 min). Finally, the sample was centrifuged (5000 x g) for 5 minutes. The supernatant was then transferred to a fresh 15 mL centrifuge tube and the extraction process repeated (two extraction cycles in total). The combined fractions were then evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The sample was reconstituted with 3 mL of an ACN / H<sub>2</sub>O mixture (9:1 v/v), vortexed (30 seconds, 2500 rpm), and sonicated (5 min). For cleanup, a C<sub>18</sub> Strata SPE cartridge was conditioned with 3 mL of MeOH followed by 3

mL of an ACN / H<sub>2</sub>O mixture (9:1 v/v). SPM extracts were then percolated through this cartridge. A rinse step was performed with 300 µL of the ACN / H<sub>2</sub>O mixture (9:1 v/v) and isotope-labelled internal standards were added (50 µL of a 0.5 ppm IS mix). Samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen and mild heating (40-50 °C). Samples were reconstituted in 250 µL of 90:10 (v/v) HPLC water:methanol.

Extracts of dissolved phase and SPM samples were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), using a previously optimized method [420]. The injection volume was 100 µL. Chromatographic separation was performed with a Hypersil Gold C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm particle size) thermostated at 55°C. The chromatographic gradient was adjusted to achieve the separation of α- and β-estradiol isomers. Analyte ionisation was achieved using a heated electrospray ionisation (heated-ESI) source in fast-polarity switching mode. The TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) was operated in selected reaction monitoring mode [392]. Further details on method acquisition parameters, including chromatographic gradient, ion source settings, and MS/MS transitions, are provided in SI (**Text S5.2 and Table S5.3**).

#### **5.2.4 Analytical method validation**

Validation was conducted to evaluate the method performance in terms of linearity, limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), extraction recovery, precision, and whole-process efficiency (i.e., whole-method accuracy).

Full details on the method development and validation for the surface water matrix are provided in a companion paper [513]. Surface water matrix-matched calibration curves had determination coefficients ( $R^2$ ) greater than 0.9950 for all targeted EDCs. Method LODs ranged from 0.10 ng·L<sup>-1</sup> to 0.50 ng·L<sup>-1</sup> and LOQs from 0.30 ng·L<sup>-1</sup> to 1.5 ng·L<sup>-1</sup>. Absolute recoveries ranged from 74% to 97% for almost all compounds except ALTRE (42%). Intra-day and inter-day precision were assessed at two spike levels and were in the overall range of 0.4%-7.9% and 0.4%-21.0%, respectively. Whole-method accuracy



(assessed via matrix spikes to surface water) ranged from 75% to 99% at QC1 (5.0 ng·L<sup>-1</sup>) and from 88% to 100% at QC2 (150 ng·L<sup>-1</sup>).

Experimental details on the validation procedure for the SPM matrix are provided in SI (Texts S5.3-S5.5 and Table S5.4). SPM matrix-matched calibration curves were constructed by spiking incremental levels of certified EDCs (0.10 ng·g<sup>-1</sup> to 500 ng·g<sup>-1</sup> sediments) covering eight calibration levels. A linear regression line fit with inverse weighting (1/x) was applied, yielding R<sup>2</sup> > 0.9980 for all targeted EDCs. Method LODs and LOQs ranged from 0.10 ng·g<sup>-1</sup> to 3.00 ng·g<sup>-1</sup> and from 0.30 ng·g<sup>-1</sup> to 9.00 ng·g<sup>-1</sup>, respectively. Under optimized extraction and cleanup conditions, absolute recoveries ranged from 57% to 101% for all compounds (SI Figure S5.2). Intra-day precision (% RSD) ranged from 1.0% to 10.0% for QC1 (20.0 ng·g<sup>-1</sup>) and from 0.8% to 6.1% for QC2 (180 or 450 ng·g<sup>-1</sup>, depending on the compound). Inter-day precision (% RSD) ranged from 0.9% to 25.6% for QC1 and from 0.5% to 14.5% for QC2. Whole-method accuracy was also determined at the same spike levels and ranged from 75% to 98% at QC1 and from 88% to 98% at QC2.

### 5.2.5 Quality assurance/quality control

Quality assurance and quality control elements were routinely included following in-house methods [420,452,489]. Field blanks were included by filling the sample container with HPLC water in the field and analyzing it in parallel to other field samples (i.e., involving filtration, off-line SPE, and LC-MS/MS analysis). An additional field/equipment blank was collected onboard the R/V Lampsilis, by rinsing the Niskin sampling bottle with deionized water and collecting the rinsate in a container bottle. Method blanks were also prepared in the laboratory and consisted in 500-mL HPLC water aliquots for the dissolved phase procedure, and a clean GFF filter (with no SPM/sediment) for the SPM procedure. No target analytes were detected in such blanks except low levels of bisphenol A (< LOQ).

Matrix-matched calibration curves were run for each LC-MS/MS batch sequence with suitable determination coefficients (acceptance criterion applied: R<sup>2</sup> > 0.9900 as per US EPA requirements). The surface water samples used to produce the composite

calibration curve were selected for their very low or even non-detectable EDC concentrations. For survey (1), samples collected in the St. Lawrence River upstream of Montreal were selected. For survey (2), samples collected in the upstream section of the Mille-Iles River (before the first major WWTP outfall) were selected. For the SPM, the matrix-matched calibration was performed using a sediment sample collected in the St. Lawrence River near Saint-Romuald (Lévis, QC, Canada), with non-detectable ambient hormone levels. After the initial calibration, quality control samples were regularly injected (after every 10 samples along the batch sequence) to monitor precision. The RSD% of these continued calibration verification (CCV) standards ranged from 2.7% to 7.1% in the dissolved phase and from 1.6% to 6.2% in the SPM.

Duplicate samples were collected at specific locations (RML-4, RML-9, RML-12, and Ar/RdP) to evaluate the whole-method precision including the sampling step. In the dissolved phase, the relative percent difference (RPD%) among duplicates ranged from 0.70% to 37% with an overall average of 8.7%. In the SPM, the RPD% ranged from 2.3% to 18% with an overall average of 11%.

## 5.2.6 Risks to aquatic organisms

Risk quotients (RQs) were enlisted to perform ecological risk assessment for surface water [422,465]. RQs were derived as the ratio between the measured environmental concentration (MEC) and the predicted no effect concentration (PNEC), when available (**Table 5.1**). Each surface water sample was then assigned the following category [515]: minimal risk ( $RQ < 0.01$ ); low risk ( $0.01 \leq RQ < 0.1$ ); moderate risk ( $0.1 \leq RQ < 1$ ); and high risk ( $RQ \geq 1$ ).

In addition, estrogenic factors expressed as estradiol equivalents ( $EEQ_i$ ) were calculated as the measured environmental concentration of the particular compound ( $C_i$ ) multiplied by the relative estrogenicity factor ( $EEF_i$ ). If several  $EEF_i$  values were noted in the reviewed literature, the highest value was selected as a worst-case scenario [422].  $EEF_i$  were 1 for E2 (reference chemical), 0.25 for E1, 0.3448 for E3, 1.25 for EE2, and 0.00012 for bisphenol A [34]. Total estrogenic activities ( $EEQ_{total}$ ) were then estimated as the summation of individual  $EEQ_i$  values [34,465].

### 5.2.7 Statistics and GIS

Statistical analyses were performed with the R statistical software version 4.1.1 (R Core Team 2021, Vienna, Austria). Statistical significance was set at a p-value cutoff of 0.05. Mean and median  $\Sigma$ EDC concentrations were computed using statistical approaches described by Helsel [516] for non-detect data that avoid substitution of <LOD by a constant. In the parametric approach, measured concentrations are fitted a log-normal distribution prior to imputation of non-detect data; for datasets of higher censoring percentages, nonparametric approaches are preferred as described in Huston and Juarez-Colunga [517]. The *censtats* function of the NADA R-package (*Nondetects and data analysis for environmental data*) was used to generate summary statistics [517,518] For moderate censoring percentages (<50%) a Kaplan-Meier method was used, while for higher censoring percentages (up to 80%), a regression on order statistics (ROS) was used [516,517,519]. Wilcoxon's signed rank tests for paired data were used to evaluate statistical differences of  $\Sigma$ EDC concentrations between seasons (survey 2). The mapping of sampling site locations was created using ArcMap™ (ArcGIS® software, ESRI).

**Table 5.1.** Summary of compiled predicted no-effect concentrations (PNEC, ng/L) for estrogenic endocrine-disruptors. The retained PNEC is indicated in bold font. The lowest PNEC across references was used to derive RQs in the present study, except for EE2 where the British Columbia (Canada) guideline for the protection of freshwater aquatic life (chronic exposure) was used. The table also reports the descriptive statistics of risk quotients (RQ) in surface water samples from the present study, including average and maximum RQ values on the overall dataset (n = 137), number of samples within each risk quotient class (minimal risk (RQ <0.01); low risk (0.01 ≤ RQ <0.1); moderate risk (0.1 ≤ RQ <1); and high risk (RQ ≥1)), and % of samples with exceedances to the PNEC for surveys (1) and (2) (n = 69 and 68, respectively).

	PNEC (ng/L)						RQ (Average, n = 137)	RQ (Max, n = 137)	Number of samples, minimal risk	Number of samples, low risk	Number of samples, moderate risk	Number of samples, high risk	% samples from survey (1) exceeding the PNEC	% samples from survey (2) exceeding the PNEC
	[422] <sup>1</sup>	[465] <sup>2</sup>	[373] <sup>3,4</sup>	[510] <sup>5</sup>	[511] <sup>6</sup>									
β-E2	<b>0.4</b>	0.58	-	-	-	2	0.39	5.61	104/137	0/137	5/137	28/137	0	41.2
E1	<b>3.6</b>	3.7	-	-	-	6	0.037	0.39	119/137	2/137	16/137	0/137	0	0
E3	60	<b>51</b>	-	-	-	60	0.014	0.16	117/137	8/137	12/137	0/137	0	0
EE2	0.035*	-	<b>0.50</b>	0.75	0.35	0.10	0.096	5.54	133/137	0/137	0/137	4/137	4.3	1.5
BPA	240	<b>129</b>	-	-	-	-	0.022	0.48	99/137	30/137	8/137	0/137	0	0

<sup>1</sup> Lowest PNEC values compiled from the NORMAN Database. <sup>2</sup> PNEC defined as the hazardous concentration for 5% of species (HC<sub>5%</sub>) (i.e., 95% of species would not display any adverse effects). <sup>3</sup> Criterion for the protection of freshwater aquatic life, chronic exposure. <sup>4</sup> Criterion for the protection of freshwater aquatic life, acute exposure. <sup>5</sup> Median HC<sub>5%</sub>, derived from species sensitivity distribution (SSD) using no observed effect concentrations (NOECs) for reproductive effects. <sup>6</sup> SSD methodology (E2, EE2) or VTG induction studies (E1, E3).

\*Directive 2011/876/EC.

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Endocrine disruptors in southwestern Quebec (Survey 1)

During the summer of 2017, a large-scale monitoring was conducted in southwestern Quebec ( $n = 69$ ), including a 200-km reach of the St. Lawrence River and the major tributaries to the St. Lawrence that feed into the fluvial section.

In the dissolved phase, 33% of samples had detectable levels of at least one target EDC. Summed EDC levels ( $\Sigma$ EDC) averaged 2.4 ng/L in the dissolved phase (ROS method). Overall, the individual concentration levels detected in the dissolved phase never exceeded 20 ng.L<sup>-1</sup> (**Table 5.2**). The main contributor present in this sample series was E3, with concentrations ranging from 4.6 to 7.9 ng.L<sup>-1</sup> (23% detection rate). ANDRO, EE2 and PROG were quantified at 2, 3 and 4 sites respectively with contamination levels ranging from 1.2 to 1.6 ng.L<sup>-1</sup>. BPA was only quantified at one site (17 ng.L<sup>-1</sup>).

**Table 5.2.** Detection frequency (% of samples above the reporting limit) and concentration ranges (min – max of samples with detections) of endocrine disruptors detected in the St. Lawrence River and tributaries (Survey 1, n = 69). Concentrations are indicated in ng.L<sup>-1</sup> and ng.g<sup>-1</sup> for the dissolved phase and the SPM, respectively.

	Dissolved phase (n = 69)			Suspended particulate matter (n = 69)		
	% samples above RL	Min (ng/L)	Max (ng/L)	% samples above RL	Min (ng/g)	Max (ng/g)
E3	23.2	4.6	7.9	0	-	-
BPA	1.4	-	16.6	71.0	2.2	139.3
EQUI	0	-	-	0	-	-
EQUIL	0	-	-	5.8	1.8	1.8
ANDRO	4.3	1.2	1.6	0	-	-
β-E2	0	-	-	0	-	-
E1	0	-	-	0	-	-
EE2	4.3	1.2	1.4	0	-	-
NOR	0	-	-	1.4	-	4.6
TESTO	0	-	-	0	-	-
LEVO	0	-	-	4.3	23.0	181.7
MEDRO	0	-	-	33.3	2.5	2.7
PROG	5.8	1.2	1.3	0	-	-
ΣEDCs	33.3	1.2	16.6	84.1	1.8	189.1

In terms of spatial distribution, the highest EDC concentrations within the St. Lawrence River were often found in the water masses collected in the north portion of each transect. For instance, in the archipelago of the Sorel Islands, the concentrations of positive samples ranged from 1.2 ng.L<sup>-1</sup> to 17 ng.L<sup>-1</sup> and 42% of the samples corresponding to this area presented levels high enough to be quantified (**Table S5.5**). This could reflect the influence of the Ottawa and Mille Ile rivers (highly impacted by urban inputs), whose waters flow north of the main inputs from the Laurentian Great Lakes, with limited mixing until further downstream [520].

In the SPM (SPM in river water = 4.0 – 31.0 mg.L<sup>-1</sup>), 84% of samples from survey 1 had detectable levels of at least one target EDC. The mean  $\Sigma$ EDC was 12 ng/g and the median 5.4 ng/g (Kaplan-Meier method). Only a few analytes could be quantified in suspended sediments (**Table 5.2** and **Table S5.6**). BPA was the most frequently detected (present in 71% of samples, range in positive samples: 2.2 ng.g<sup>-1</sup> to 139 ng.g<sup>-1</sup>; mean and median: 7.7 ng/g and 4.5 ng/g, respectively (Kaplan-Meier method)). The highest BPA concentration was observed at site TCM-3 (139 ng.g<sup>-1</sup>), within the effluent plume of the Montreal WWTP. MPROG was quantified in 23 samples (max 2.7 ng.g<sup>-1</sup>), LEVO in 3 samples (max 42 ng.g<sup>-1</sup>), EQUIL in 4 samples (max 1.8 ng.g<sup>-1</sup>) and NOR in only 1 sample (4.6 ng.g<sup>-1</sup>).

### 5.3.2 Seasonal sampling of the Mille-Iles River (Survey 2)

During the seasonal monitoring, a total of 68 surface water samples (17 sampling site locations for each season) were taken along the Rivière des Mille Iles from Sainte-Marthe-sur-le-Lac (RML 1) to Charlemagne/Repentigny (AR/RdP) in Quebec, Canada (**Figure 5.1** and **Figure S5.1**). Four sampling campaigns were conducted between March and November 2020 representing different seasons.

#### 5.3.2.1 Dissolved phase samples

***Occurrence and spatial distribution.*** Overall, 95.6% of dissolved phase samples from survey 2 (n = 68) presented positive detections to at least one target EDC. The

nonparametric Kaplan-Meier estimates for the mean and median  $\Sigma$ EDC were  $9.9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $7.3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Compound-specific descriptive statistics are presented in **Table 5.3**. Of the 15 target EDCs, 14 were variously detected in dissolved phase samples. Bisphenol A was the most frequently detected (detection rate of 56%), while estradiol was also recurrent ( $\beta$ -E2: 49%). Most of the quantified target compounds had concentrations of the order of  $0.5\text{-}5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (**Table 5.3**). Only three compounds had maximum concentrations exceeding  $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , namely BPA (max  $62 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), PROG ( $17 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and NOR ( $15 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

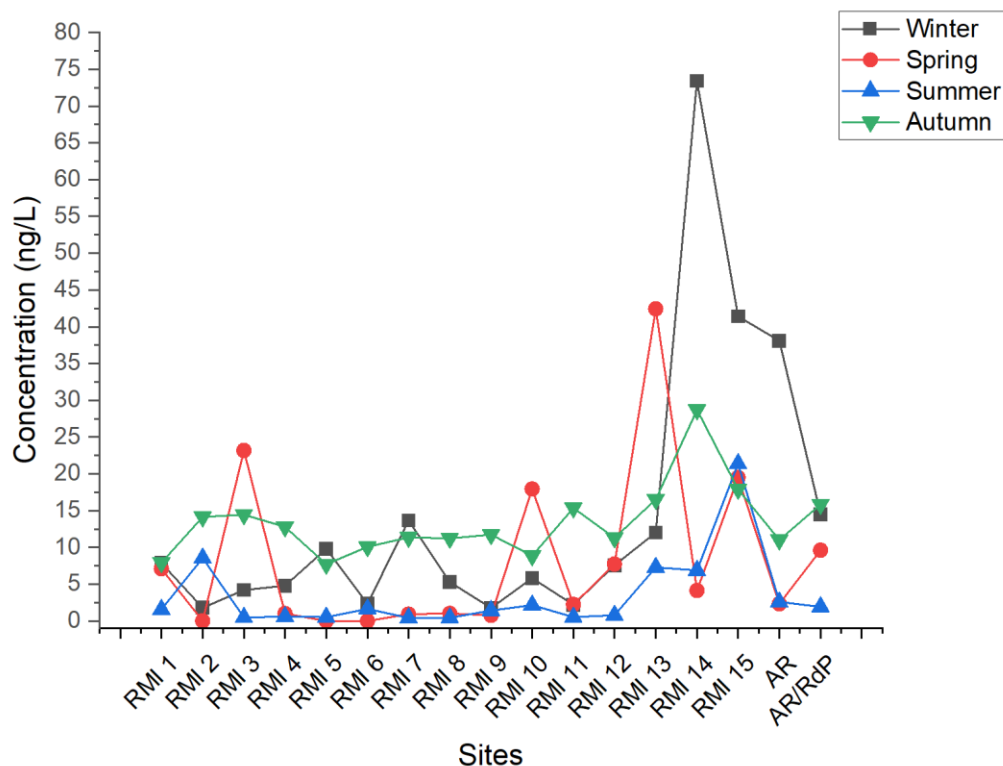
Levels of EDCs found in the present survey are comparable with other studies (**Table S5.7**). Previous surveys reported concentrations of free estrogens ranging from  $0.20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $51 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in China, Canada, France and the USA, while higher levels were punctually observed in Latin America ( $< \text{LOQ} - 3610 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [152,167,525,526,247,264,382,499,521–524]. Determined concentrations for progestogens are also consistent with previous studies ( $0.07 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $38 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [527].

In terms of spatial distribution (**Figure 5.2**), dissolved concentrations generally tended to increase from upstream to downstream along the river. This reflects the significant discharges into the Mille Iles River from various anthropogenic and natural sources. Locations RMI 3 and RMI 10 were associated with slightly increasing EDC concentrations compared to other vicinal locations, ascribed to the proximity of WWTP discharge points (less than 5 km and 10 km upstream from RMI 3 and RMI 10, respectively). It is, however, at locations RMI 13-14 that the concentrations increased the most drastically (**Figure 5.2**). Although the nearest large WWTP is located about ten kilometers further upstream, the higher levels of EDCs may reflect the proximity with high density urbanizations (e.g., Terrebonne and other surrounding towns) as well as the lateral inputs from the Mascouche River. This peak is found in each season although its exact spatial location and intensity varies between spring / winter and summer / autumn. Dilution effects, the hydrological regime of the Mille Iles River and its tributaries, as well as photodegradation rates among other factors are likely confounders for these variations.



**Table 5.3.** Detection frequency (% of samples above the reporting limit) and concentration ranges (min – max of samples with detections) of endocrine disruptors detected in the Mille Iles River (Survey 2, n = 68). Concentrations are indicated in ng.L<sup>-1</sup> and ng.g<sup>-1</sup> for the dissolved phase and the SPM, respectively. Mean SPM-water distribution coefficients (Log  $K_d$ , L.kg<sup>-1</sup>) are also provided with corresponding standard deviations (SD), when applicable.

	Dissolved phase (n = 68)			Suspended particulate matter (n = 68)			Log $K_d$
	% samples above RL	Min (ng/L)	Max (ng/L)	% samples above RL	Min (ng/g)	Max (ng/g)	Mean + SD
E3	17.6	0.30	1.0	0	-	-	
BPA	55.9	1.0	62.3	16.2	2.4	228	3.71
EQUI	32.4	0.47	4.8	0	-	-	
EQUIL	26.5	0.62	0.89	22.1	0.62	116	
ANDRO	25.0	0.48	1.2	5.9	0.33	0.75	
β-E2	48.5	0.11	2.2	10.3	1.5	3.1	3.63 ± 0.16
E1	26.5	0.33	1.4	23.5	0.11	29.6	2.09 ± 0.05
EE2	1.5	2.8	2.8	2.9	25.9	63.9	
NOR	14.7	0.41	14.5	2.9	5.1	8.8	3.65
α-E2	0	-	-	23.5	2.6	37.0	
TESTO	26.5	0.56	2.2	0	-	-	
LEVO	20.6	0.05	4.1	10.3	1.5	4.5	2.96
MEDRO	29.4	0.59	2.5	2.9	0.32	0.48	
ALTRE	2.9	0.66	1.1	4.4	0.33	1.2	
PROG	23.5	0.66	17.7	11.8	1.6	5.8	3.31
Sum	95.6	0.42	73.4	69.1	0.15	228	



**Figure 5.2.** Spatial distribution of summed EDC concentrations ( $\Sigma$ EDCs, ng/L) in the Rivière des Mille Îles, color-coded according to the surveyed season.

**Seasonal variations.** Detailed concentrations of target EDCs arranged per season are provided in SI (Tables S5.8-S5.11 for the dissolved phase and S5.12-S5.15 for the SPM). Mean concentrations of  $\Sigma$ EDC varied according to the sampling season, with  $14.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (winter),  $8.4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (spring),  $3.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (summer), and  $13.3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (autumn). Pairwise comparisons between groups are summarized in SI (Table S5.16). The  $\Sigma$ EDC was significantly lower in the summer period compared to winter (Wilcoxon signed-rank test,  $p$ -value = 0.0008), spring ( $p$ -value = 0.049), or autumn ( $p$ -value = 0.00003). Pairwise comparisons indicated non-significant differences in terms of dissolved  $\Sigma$ EDC between the winter, spring, and autumn seasons ( $p$ -values  $>0.05$ ). Some differences were also noted in terms of EDC profiles between sampling seasons (SI Table S5.17). In winter, the main contribution was that of BPA (on average, 59% of  $\Sigma$ EDC) followed by E1 (17%) and

EQUIL (16%). In contrast, BPA was not detected in summer and contributed somewhat lower percentages to the EDC profile in the spring and autumn (35-46% of the  $\Sigma$ EDC). Estradiol ( $\beta$ -E2) contributed significant proportions to the  $\Sigma$ EDC in spring (28%) and summer (50%) but not in winter / autumn (<0.3%). PROG contributed significantly in summer (36%) and autumn (5%) only, while ANDRO, EQUI, MEDRO and TESTO contributed significantly in autumn only (7.9%, 11%, 14%, and 13%, respectively).

There are several hypotheses as to why EDC concentrations were statistically higher in winter, spring and autumn compared to the summer. In spring, one would expect that the flow of the river, increased by the snowmelt, would imply a dilution of endocrine disruptors. However, a decrease in the effectiveness of WWTPs during this season could exert a compensating effect. Snowmelt and spring rain episodes bring a surplus of water to WWTPs, which implies a decrease in the residence time of the water within the treatment plant (reduced filtration time, settling time and treatment / degradation time). Photodegradation is more important in the summer due to the longer exposure to sunlight; microbial activity is also activated at higher temperatures leading to higher decay rates of hormones in the aquatic environment [423]. The significantly higher concentrations in autumn compared to summer can be due to the reduced photodegradation (sample collections carried out in the late fall), milder temperatures, and reduced dilution capability (lower river flowrate).

#### 5.3.2.2 Suspended particulate matter (SPM) samples

***Occurrence and spatial distribution.*** In the SPM samples of survey 2 (n = 68), 69% of samples were positive to at least one target endocrine disruptor. The mean  $\Sigma$ EDC was 19 ng·g<sup>-1</sup> and the median  $\Sigma$ EDC 5.5 ng·g<sup>-1</sup> (Kaplan-Meier estimates). Of the 15 target EDCs, 12 were detected in SPM samples (**Table 5.3**). The compounds with the most frequent detections were E1 (detection rate of 24%),  $\beta$ -E2 (24%), EQUIL (22%), and BPA (16%). Most compounds had maximum concentrations in the range of 1-10 ng·g<sup>-1</sup> (**Table 5.3**), with a few exceptions (e.g., 228 ng·g<sup>-1</sup> for BPA, 64 ng·g<sup>-1</sup> for EE2, and 115 ng·g<sup>-1</sup> for EQUIL).

Concentration levels were similar to a previous study that reported values ranging from < 5.6 ng·g<sup>-1</sup> to 149 ng·g<sup>-1</sup> for steroid hormones in the SPM of the Des Prairies River,

QC, Canada [262]. Nie et al. evaluated SPM samples from China and reported global mean concentration values (from July to May) of E1, E2, E3, EE2 and BPA in SPM that ranged from  $21 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $40 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  [465], also consistent with the range of values found in the present survey.

In terms of spatial distribution, the highest  $\Sigma\text{EDC}$  levels ( $21 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  –  $228 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) are found in the upper part of the river as well as in the far downstream part ( $28 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  –  $46 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Table S5.12-5.15). Major wastewater treatment plants are located in the upper part of the surveyed tract, between points RMI 3 and RMI 8. The discharged effluents from these stations concentrated with steroid hormones and BPA are likely to induce higher levels of contamination in this section of the river.

**Seasonal variations.** Pairwise comparisons ranked the seasons as follows in terms of  $\Sigma\text{EDC}$  levels in the SPM: spring  $\sim$  autumn  $>$  summer  $>$  winter (SI Table S5.18). In winter, very low  $\Sigma\text{EDC}$  were recorded in SPM samples, with only E1, NOR, LEVO and PROG quantified (range:  $0.11 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $4.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). During the spring, concentration levels drastically increased compared to the winter. In addition, the diversity of analytes detected and quantified also increased. Among the quantified analytes, BPA was often predominant in the spring seasons, with levels ranging from  $2.4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $228 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Although they were not the main contributors to the overall concentration, EQUIL, ANDRO, EE2, NOR, LEVO, MEDRO, ALTRE and PROG were also present in a significant number of sites with concentrations ranging from  $0.32 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $64 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . As previously discussed (section 3.2.1), the high flowrate of raw waters entering WWTPs may cause a reduction in the abatement efficiency of micropollutants in the spring (hydrological effect) with less settling of particles and shorter residence times. More overflows can also occur implying more water discharged without treatment. During the summer, only two sites had concentrations above  $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  and another four above  $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . The main contributors were BPA ( $2.6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  –  $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and EQUIL ( $0.62 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  –  $12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). During the fall sampling, only one of the two stereoisomers of estradiol ( $\alpha$ -E2) as well as E1 were quantified. Concentration levels ranged from  $1.8 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  and from  $2.6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $31 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  for E1 and  $\alpha$ -E2, respectively.

Suspended sediment-water distribution coefficients ( $K_d$ , L.kg<sup>-1</sup>) were determined for E1, BPA, NOR, LEVO,  $\beta$ -E2 and PROG and the average values are compiled in SI (**Table S5.19**). BPA, NOR and  $\beta$ -E2 possessed the highest affinity for the SPM, with log  $K_d$  values of 3.7 L.kg<sup>-1</sup>, 3.7 L.kg<sup>-1</sup> and  $3.6 \pm 0.16$  L.kg<sup>-1</sup>, respectively. Intermediate values were obtained from LEVO and PROG with calculated log  $K_d$  at 3.0 and 3.3 L.kg<sup>-1</sup> respectively. E1 had the smallest log  $K_d$  value among target EDCs (2.1 L.kg<sup>-1</sup>). These results are in overall agreement with  $K_d$  values reported in previous studies [261,396,528]. The particle-attached fraction ( $\phi$ ) was also calculated to evaluate the mass balance (% attached to the SPM vs. total in the water column (dissolved + SPM)). The values of  $\phi$  ranged from 0.13% (E1) to 12.0% (NOR), indicating that hormones were predominately in the dissolved phase due to the low SPM loads in the studied rivers.

### 5.3.3 Ecological risk assessment

Ecological risk assessment was conducted considering available PNEC values derived from chronic toxicity data in surface water, as summarized in **Table 5.1**. Considering the overall dataset ( $n = 137$ ), averaged risk quotients in surface water were systematically below unity (**Table 5.1**), with the lowest  $RQ_{\text{average}}$  for estriol (0.014) and the highest for  $\beta$ -estradiol (0.39).

Most samples were assigned the minimal risk class ( $RQ < 0.01$ ) and only two compounds showed exceedances to the PNEC:  $\beta$ -estradiol and EE2 (max RQ values of 5.6 and 5.5, respectively). The maximum concentrations of EE2 in the present survey were also above the current British Columbia criterion for acute exposure at 0.75 ng·L<sup>-1</sup>. About 41% of samples from survey (2) exceeded the PNEC for  $\beta$ -estradiol, and the highest RQ values were observed during the spring seasonal sampling. The findings are in line with field observations in the Mille Iles River, where feminization of wild and caged invertebrates was previously reported [508,509]. Risk quotients were low for bisphenol A (average RQ = 0.022; max RQ = 0.48). The maximum concentration of bisphenol A in

surface water from the present survey ( $62 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was also considerably lower than the current Canadian federal environmental quality guideline set at  $1400 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  [529].

Site-specific estrogenic activities (as estradiol equivalents, EEQ) were derived from the relative estrogenic factors ( $\text{EEF}_i$ ) compiled by Čelić et al. [422]. Site-specific EEQ values and summed estrogenic activities ( $\text{EEQ}_{\text{total}}$ ) are compiled in SI (**Tables S5.20-S5.21**). The total estrogenic potential was above the threshold level of  $1 \text{ ng E2 L}^{-1}$  for 19/69 samples from survey (1) (max  $\text{EEQ}_{\text{total}}$ :  $2.73 \text{ ng E2 L}^{-1}$ ) and 7/68 samples from survey (2) (max  $\text{EEQ}_{\text{total}}$ :  $4.74 \text{ ng E2 L}^{-1}$ ) [422,530,531]. Three compounds occasionally surpassed the threshold levels:  $\beta$ -E2 (2 of 137 samples), E3 (16/137), and EE2 (4/137).

Of the 15 tributary rivers investigated in survey 1, six had  $\text{EEQ}_{\text{total}}$  above the threshold level: Bécancour, Des Prairies, Mille-Iles, Ottawa, Saint-François, and Yamaska. Of 54 surface water samples collected within the St. Lawrence River, 13 were above the  $\text{EEQ}_{\text{total}}$  threshold level, and most of the estrogenic activity was attributed to E3 (**Table S5.20**). Interestingly, certain samples collected downstream Montreal and located near the north shore of the St. Lawrence River—i.e., samples REP-1, CON-1, SORAV-1, ISO-3, ISO-4, ISO-5, ISO-6, ISO-7, ISO-19, corresponding to the water mass originating from the Ottawa/Mille-Iles/Des Prairies rivers—exceeded the threshold level for  $\text{EEQ}_{\text{E3}}$ . In contrast, none of the samples collected near the center point or south shores (blue-green waters originating from the Great Lakes) did. This is likely due to inputs of estradiol and estriol by wastewater effluents in the Ottawa/Mille-Iles continuum [420], and subsequent transport (and transformation of E2 to E3) in the downstream sections (i.e., Repentigny, Contrecoeur, Sorel, Sorel Islands).  $\text{EEQ}_{\text{total}}$  exceedances to the estrogenic potential threshold in survey 2 (Mille-Iles River, **Table S5.21**) were mostly attributed to E2—and, to a lower extent, to E3— which could also support this hypothesis.

## 5.4 Conclusions

In this study, EPA-priority endocrine disruptors were investigated at a large spatial scale in Quebec surface waters, for the first time. Sensitive analytical methods based on sample pre-concentration and UHPLC-MS/MS were enlisted to inform their occurrence and levels. A first survey evaluated the spatial distribution of priority EDCs in the St. Lawrence River and its major tributaries. Bisphenol A, ethinylestradiol, androstenedione and progesterone were quantified in St. Lawrence River samples in the aqueous phase while in the SPM, only Bisphenol A, medroxyprogesterone, equilenin, norethindrone and levonorgestrel were quantified. The highest concentrations in the St. Lawrence were located near or downstream the outfall plume of a major WWTP, as well as in sample locations downstream the Montreal Island and close to the north shore, reflecting the influence of the Ottawa and Mille Iles rivers. A second survey evaluated the occurrence of EDCs during different seasons, focusing on the Mille Iles River, an urban river with prior reports of endocrine disrupting effects. Our results indicate a sharp difference in terms of dissolved EDC levels in the summer, significantly lower than other seasons. In the SPM, EDC levels were higher in the spring, which may reflect decreased abatement efficiency of WWTPs due to the hydrological regime. Measured concentrations were compared to PNECs to perform an ecological risk assessment. Only  $\beta$ -E2 was present at levels high enough to pose a potentially high risk for a high number of sites. It is noted that endocrine-disrupting compounds other than those investigated here are continuously released to aquatic environments, including other bisphenols, alkylphenols, and industrial chemicals. In view of the accumulation potential in solids, further investigations are required to evaluate their levels in sediments and perform risk assessments.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank Thermo Fisher Scientific for scientific and technical support. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the NSERC Industrial Chair on Drinking Water at Polytechnique Montréal, and the Canadian Foundation for Innovation.



## 5.5 Supplementary material

### SI texts

#### Text S5.1. Additional details on materials

Water, acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dichloromethane (DCM) and acetone (ACT) of HPLC-grade quality were obtained from Fischer Scientific (Whitby, ON, Canada). Tert-Butyl methyl ether (MTBE) were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A) Sodium chloride (NaCl, purity >99.5%), 2-mercaptopyridine-N-Oxide (Omadine salt, purity 99%) and ammonium fluoride (purity >98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). HRPHS SolEx SPE Cartridges (6 mL; 200 mg, Dionex) was used to process the pre-treatment step. It was placed in tandem above a Silica Si-1 (6 mL; 500mg; Phenomenex) SPE cartridges. C<sub>18</sub> Strata SPE cartridge (3 mL; 100 mg; Phenomenex) was used for the SPM extraction and clean-up step.

#### Text S5.2. Instrument settings

Source parameters were as follows: sheath gas (60 arbitrary unit), auxiliary gas (15 arbitrary unit), sweep gas (0 arbitrary unit), ion spray voltage (+3kV or -3kV, polarity switching), capillary temperature (350°C), vaporizer temperature (400°C). The scan time was set at 20 ms, yielding at least 10 points per chromatographic peak. The first and third quadrupole (Q1 and Q3) were set at unit resolution (0.7 Da FWHM). The collision gas pressure in the collision cell (q2) was fixed at 1.5 mTorr. Compound-dependent MS/MS parameters with the finally retained method are provided in SI **Table S5.1**.

#### Text S5.3. Validation procedure for the SPM matrix

Intra-day precision was evaluated at two concentration levels (QC1 and QC2) based on the relative standard deviation (RSD) of the analyte to IS area ratio. The RSD% was determined with five replicates analyzed within the same working day (intra-day precision) and repeated on a second (n = 5) and third workday (n = 5). Inter-day precision was thus derived from the overall RSD% (n = 15 for each of the two QC levels examined). For the SPM matrix, the spiked concentration for QC1 was 20 ng·g<sup>-1</sup> while QC2 was set at a

concentration of 180 ng·g<sup>-1</sup> / 450 ng·g<sup>-1</sup> for all sample types. In accordance with EPA requirements, precision was considered acceptable if the RSD remained below 20%.

For each matrix type, accuracy (%) was determined as complementary parameter at the two concentration levels previously defined for the precision assessment (QC1 and QC2, n = 3 each), as per the following formula:

$$Accuracy (\%) = (C_{measured}/C_{expected}) * 100$$

Where C<sub>measured</sub> represents the spiked concentration quantified upon the retained calibration curve approach (i.e., matrix-matched), and C<sub>expected</sub> represents the theoretical spiked concentration in the sample.

In accordance with EPA requirements, accuracy was considered acceptable if the measured concentration remained within ± 30% of the theoretical one (i.e., accuracy range = 70 – 130%).

#### **Text S5.4.** Selection of the extraction and cleanup procedure for the SPM matrix

We investigated an analytical method for extracting and purifying EPA-priority hormones and bisphenol A from suspended particulate matter (SPM), based on a previously developed multi-residue method for pharmaceuticals, pesticides, and hormones in river sediment and SPM [262]. This study tested several types of extraction solvents such as MeOH 100%, ACN 100%, Acetone 100%, Ethyl acetate 100% as well as various volumetric mixtures of MeOH / Acetone (1:3 v/v; 1:1 v/v; 3:1 v/v). In view of the results obtained in this previous study, we opted for a mixture of MeOH/Acetone (3:1 v/v) to perform the extraction. We then tested two conditions for the clean-up elution step: the first was based on the use of a 7:3 v/v ACN/MeOH mixture while the second was based on a mixture of the same nature with a proportion of 9:1 v/v. The extraction efficiency ranged from 10% to 94% when the elution solvent mix was ACN/MeOH (7:3 v/v) while higher values ranging from 57% to 101% were obtained when solvent proportion differed (9:1 v/v) (**Figure S5.1**). The latter elution condition was therefore selected for the SPM method.

#### **Text S5.5.** Analytical method performance for the SPM matrix

The linearity range of the SPM matrix-matched calibration curve generally extended over 0.10 - 500 ng·g<sup>-1</sup>, which is adequate with determined concentrations in the environment that are usually in the order of nanograms per gram. The herein developed method presented acceptable determination coefficients ( $R^2 > 0.9987$ ). Related LOD and LOQ are provided in **Table S5.2**. The LOD in SPM ranged from 0.10 ng·g<sup>-1</sup> to 3.00 ng·g<sup>-1</sup> and LOQ from 0.30 ng·g<sup>-1</sup> to 9.00 ng·g<sup>-1</sup>. Only few studies focused on steroids hormones in SPM but to the best of our knowledge, such LOD/LOQ performance is improved compared to previous literature [532,533].

Absolute extraction efficiencies (evaluated via fortification experiments to a background sediment matrix) ranged from 57% to 101% with the finally retained procedure (**Figure S5.1**). As the calibration curve was submitted to the whole procedure (i.e., calibration levels spiked before extraction), losses are efficiently compensated by the quantification procedure, allowing the whole-method accuracy to remain within acceptable ranges (see the next paragraph for details).

Whole-method accuracy was determined in matrix-matched SPM samples (**Table S5.3**) and proved satisfactory. Matrix spike accuracy ranged from 70% to 99% at QC1 and from 88% to 99% at QC2. The accuracy performance is similar or better than reported values in previous studies focused on hormones. The presented results are in agreement with the tolerance threshold of  $\pm 30\%$  (i.e., accuracy range = 70 – 130%) usually set in U.S. EPA methods [266].

**Table S5.1.** Geographical information of sampling sites as part of Survey (1) in the St. Lawrence River and 15 of its tributaries. Corresponding sampling maps are also shown in SI Figure S1.

<b>Sample #</b>	<b>Area</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>ISO1</b>		46°2'52.68"N	73°10'45.93"O
<b>ISO2</b>		46° 2'52.94"N	73°10'26.05"O
<b>ISO3</b>		46° 3'16.69"N	73° 9'19.13"O
<b>ISO4</b>		46° 5'7.76"N	73°10'4.55"O
<b>ISO5</b>		46° 4'44.93"N	73° 9'15.49"O
<b>ISO6</b>		46° 4'12.90"N	73° 8'6.33"O
<b>ISO7</b>		46° 7'9.91"N	73° 7'22.42"O
<b>ISO8</b>		46° 7'3.93"N	73° 7'5.00"O
<b>ISO9</b>		46° 5'24.52"N	73° 4'28.43"O
<b>ISO10</b>	<b>Sorel Islands</b>	46° 4'47.69"N	73° 2'2.80"O
<b>ISO11</b>		46° 4'39.76"N	73° 1'38.11"O
<b>ISO12</b>		46° 4'22.59"N	73° 0'46.93"O
<b>ISO13</b>		46° 7'17.15"N	73° 4'35.68"O
<b>ISO14</b>		46° 6'26.42"N	73° 2'32.55"O
<b>ISO15</b>		46° 6'19.50"N	72°59'44.68"O
<b>ISO16</b>		46° 5'55.51"N	72°59'29.91"O
<b>ISO17</b>		46° 8'42.81"N	73° 1'56.00"O
<b>ISO18</b>		46° 8'51.03"N	73° 0'53.84"O
<b>ISO19</b>		46° 9'47.28"N	72°59'44.71"O
<b>PT-ASS1 (<i>L'Assomption</i>)</b>		45°45'4.08"N	73°28'2.81"O
<b>PT-BAT1 (<i>Batiscan</i>)</b>	<b>Tributaries to the St. Lawrence</b>	46°31'14.43"N	72°16'54.24"O
<b>PT-BEC1 (<i>Bécancour</i>)</b>		46°20'37.12"N	72°26'38.13"O
<b>PT-FRA1 (<i>St. François</i>)</b>		46° 4'3.59"N	72°48'57.70"O
<b>PT-LOUP1 (<i>Du Loup</i>)</b>		46°15'21.97"N	72°56'19.39"O

<b>PT-MASK1</b> ( <i>Maskinongé</i> )		46°10'55.70"N	73° 2'0.58"O
<b>PT-MILLE5</b> ( <i>Mille Iles</i> )		45°36'54.97"N	73°47'38.25"O
<b>PT-NIC1</b> ( <i>Nicolet</i> )		46°13'33.81"N	72°37'32.99"O
<b>PT-OUT1</b> ( <i>Outaouais</i> )		45°27'30.30"N	74° 5'27.97"O
<b>PT-PRAI5</b> ( <i>Des Prairies</i> )		45°32'5.29"N	73°43'39.35"O
<b>PT-RIC1</b> ( <i>Richelieu</i> )		46° 2'28.73"N	73° 7'4.71"O
<b>PT-RN1</b> ( <i>Du Nord</i> )		45°33'45.43"N	74°20'12.45"O
<b>PT-YAM1</b> ( <i>Yamachiche</i> )		46°16'23.92"N	72°48'19.05"O
<b>PT-YAMS1</b> ( <i>Yamaska</i> )		46° 0'17.60"N	72°54'38.61"O
<b>SM1</b> ( <i>St. Maurice</i> )		46°21'30.83"N	72°32'18.31"O
<b>BOU1</b>		45°39'12.31"N	73°29'11.95"O
<b>BOU2</b>		45°38'40.49"N	73°28'17.37"O
<b>BOU3</b>		45°39'1.34"N	73°27'0.08"O
<b>BOU4</b>		45°34'12.84"N	73°30'13.71"O
<b>CON1</b>		45°51'40.74"N	73°17'11.57"O
<b>CON2</b>		45°51'25.39"N	73°16'30.41"O
<b>CON3</b>		45°51'3.67"N	73°15'51.22"O
<b>LSF1</b>		45°13'54.33"N	74°14'57.59"O
<b>LSF2</b>		45°12'54.05"N	74°13'36.79"O
<b>LSF3</b>		45°11'39.51"N	74°12'2.13"O
<b>LSL1</b>	<b>St. Lawrence River</b>	45°24'30.85"N	73°50'53.99"O
<b>LSL2</b>		45°23'0.36"N	73°49'14.27"O
<b>LSPA1</b>		46°15'39.80"N	72°45'47.84"O
<b>LSPA2</b>		46°14'12.27"N	72°43'46.31"O
<b>LSPA3</b>		46°12'43.00"N	72°41'10.49"O
<b>REP1</b>		45°44'58.55"N	73°25'31.08"O
<b>REP2</b>		45°44'41.69"N	73°25'1.96"O
<b>REP4</b>		45°44'41.52"N	73°24'0.22"O
<b>SM2</b>		46°21'10.46"N	72°32'4.12"O
<b>SM3</b>		46°20'47.61"N	72°31'35.59"O
<b>SM4</b>		46°20'24.69"N	72°31'0.37"O

<b>SORAM1</b>	46° 3'49.64"N	73° 6'30.42"O
<b>SORM2</b>	46° 3'30.07"N	73° 6'0.54"O
<b>SORAM3</b>	46° 3'10.62"N	73° 5'31.24"O
<b>SORAV1</b>	46°11'13.18"N	72°56'39.00"O
<b>SORAV2</b>	46° 9'40.08"N	72°55'31.51"O
<b>SORAV3</b>	46° 8'1.67"N	72°54'13.21"O
<b>STA1</b>	46°33'34.80"N	72°10'27.51"O
<b>STA2</b>	46°33'12.07"N	72° 9'52.40"O
<b>STA3</b>	46°32'42.04"N	72° 9'18.16"O
<b>TCM1</b>	45°42'15.05"N	73°30'21.28"O
<b>TCM2</b>	45°41'39.49"N	73°28'42.15"O
<b>TCM3</b>	45°41'9.09"N	73°27'3.88"O
<b>TRA1</b>	46° 0'30.53"N	73°11'6.33"O
<b>TRA2</b>	46° 0'12.08"N	73°10'20.26"O

---

**Table S5.2.** Geographical information of sampling sites as part of **Survey (2)** along the Mille Iles River.

<b>Sample #</b>	<b>City</b>	<b>Location</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>RMI 1</b>		<b>Rue des Érables</b>	45°31'56.70"N	73°52'47.96"O
<b>RMI 2</b>		<b>Rue Riviera</b>	45°33'28.24"N	73°52'37.31"O
<b>RMI 3</b>		<b>Rue de Bordeaux</b>	45°34'43.37"N	73°50'6.18"O
<b>RMI 4</b>		<b>Rue Nipigon</b>	45°36'10.10"N	73°49'29.14"O
<b>RMI 5</b>	<b>Laval</b>	<b>Parc de la Rivière-des-Mille-Îles</b>	45°36'31.65"N	73°47'52.83"O
<b>RMI 6</b>		<b>Parc des Érables</b>	45°38'29.32"N	73°46'26.26"O
<b>RMI 7</b>		<b>Plage Jacques Cartier</b>	45°39'13.29"N	73°45'34.72"O
<b>RMI 8</b>		<b>Pont Athanase-David</b>	45°39'40.25"N	73°45'11.64"O
<b>RMI 9</b>		<b>Rue de la Plage des Îles</b>	45°40'49.70"N	73°42'3.25"O
<b>RMI 10</b>		<b>Rue Florimond-Gauthier</b>	45°41'20.40"N	73°39'0.17"O
<b>RMI 11</b>		<b>Parc de Vérone</b>	45°41'40.87"N	73°39'8.74"O
<b>RMI 12</b>		<b>Parc Jardins Vitré</b>	45°41'29.32"N	73°38'9.03"O
<b>RMI 13</b>	<b>Terrebonne</b>	<b>Amont Rivière Mascouche</b>	45°41'31.24"N	73°35'37.59"O
<b>RMI 14</b>		<b>Aval Rivière Mascouche</b>	45°41'33.53"N	73°35'29.05"O
<b>RMI 15</b>		<b>Rue Kennedy</b>	45°42'8.20"N	73°31'22.51"O
<b>AR</b>	<b>Charlemagne</b>	<b>Rivière L'Assomption</b>	45°43'33.94"N	73°29'1.01"O
<b>AR/RdP</b>	<b>Repentigny</b>	<b>Confluent Rivière L'Assomption/Rivière des Prairies</b>	45°42'44.35"N	73°28'45.04"O

**Table S5.3.** Optimized tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters for the targeted analytes in both positive and negative mode (selected reaction monitoring (SRM), fast-polarity switching electrospray ionization).

Compounds	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	RF lens (V)	Collision energy (V)	Intensity ranking	IS
<b>E3</b>	287	145	105	43	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		171	105	39	1	
<b>BPA</b>	227	133	66	28	2	Bisphenol-A- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
		212	66	19	1	
<b>EQUIL</b>	265	221	82	36	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		222	82	29	2	
<b>EQUI</b>	267	143	75	35	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		265	75	25	1	
<b>ANDRO</b>	287	97	52	24	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	52	26	2	
<b>β-E2</b>	271	145	88	42	2	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	88	42	1	
<b>E1</b>	269	145	97	41	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		159	97	39	2	
<b>EE2</b>	295	145	97	43	1	Ethinylestradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
		159	97	37	2	
<b>NOR</b>	299	91	56	44	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	53	2	
<b>α-E2</b>	271	145	95	44	1	Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
		183	95	39	2	
<b>TESTO</b>	289	97	54	24	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		109	54	27	1	
<b>LEVO</b>	313	91	56	45	1	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		128	56	59	2	
<b>MEDRO</b>	345	97	58	28	2	Androstenedione-d <sub>3</sub>
		123	58	27	1	
<b>PROG</b>	315	97	55	24	2	Progesterone-d <sub>9</sub>
		109	55	27	1	
<b>ALTRE</b>	311	277	23	64	1	Progesterone-d <sub>9</sub>
		269	15	64	2	



**Table S5.4.** Summary of R<sup>2</sup>, LODs, LOQs, precision and accuracy for the 15 targeted EDCs in suspended particulate matter.

	Linear range (ng/g)	R <sup>2</sup>	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Precision (Intraday)		Precision (Interday)		Accuracy	
					QC1 (RSD%)	QC2 (RSD%)	QC1 (RSD%)	QC2 (RSD%)	QC1 (Accuracy%)	QC2 (Accuracy%)
<b>E3</b>	LOQ - 200	0.9999	0.50	1.50	1.0	2.4	5.1	7.2	81.1	88.8
<b>BPA</b>	LOQ - 500	0.9996	1.00	3.00	2.4	1.5	23.0	6.8	81.1	91.0
<b>EQUIL</b>	LOQ - 500	1.0000	0.10	0.30	2.0	3.1	12.8	0.5	98.5	88.3
<b>EQUI</b>	LOQ - 500	0.9990	0.10	0.30	3.9	3.2	25.6	14.5	89.9	99.2
<b>ANDRO</b>	LOQ - 500	0.9996	0.10	0.30	1.4	2.9	2.6	3.8	93.5	98.7
<b>β-E2</b>	LOQ - 500	0.9993	0.50	1.50	4.4	2.6	3.3	2.1	88.6	97.8
<b>E1</b>	LOQ - 500	0.9997	0.10	0.30	2.0	3.2	7.1	2.1	93.4	97.2
<b>EE2</b>	LOQ - 500	0.9993	3.00	9.00	1.5	1.1	0.9	1.8	85.2	88.0
<b>NOR</b>	LOQ - 200	0.9993	1.00	3.00	4.4	2.3	2.0	1.8	98.3	93.6
<b>α-E2</b>	LOQ - 500	0.9987	0.50	1.50	3.2	3.0	7.7	2.4	69.8	87.7
<b>TESTO</b>	LOQ - 500	0.9999	0.50	1.50	4.4	0.8	4.6	1.2	98.3	98.5
<b>LEVO</b>	LOQ - 500	1.0000	0.50	1.50	1.2	2.0	6.3	3.0	92.8	98.4
<b>MEDRO</b>	LOQ - 500	0.9994	0.10	0.30	4.5	1.4	4.2	4.4	89.5	97.6
<b>ALTRE</b>	LOQ - 200	0.9991	0.10	0.30	10.0	6.1	17.5	12.7	83.8	92.0
<b>PROG</b>	LOQ - 500	1.0000	0.50	1.50	1.0	1.2	0.5	1.0	75.4	91.6

457 **Table S5.5.** Individual concentrations of EDCs in aqueous phase samples of **Survey (1)**, collected in the St. Lawrence River and major  
 458 tributaries (province of Quebec, Canada). Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup>.

459

<b>Compounds</b>	<b>E3</b>	<b>BPA</b>	<b>EQUI</b>	<b>β-E2</b>	<b>ANDRO</b>	<b>E1</b>	<b>EE2</b>	<b>NOR</b>	<b>TESTO</b>	<b>MPROG</b>	<b>PROG</b>
<b>Site</b>											
<b>Detection frequency (%)</b>	23	1.5	0	0	4.3	0	4.3	0	0	0	5.8
<b>ISO1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO3</b>	5.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO4</b>	5.49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO5</b>	4.85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO6</b>	4.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO7</b>	4.68	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO8</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO9</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.21	ND	ND	ND	ND
<b>ISO10</b>	ND	16.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO11</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO12</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO13</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO14</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO15</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO16</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO17</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<b>ISO18</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ISO19</b>	4.61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-ASS1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-BAT1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-BEC1</b>	5.22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-FRA1</b>	7.92	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-LOUP1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-MASK1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-MILLE5</b>	5.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-NIC1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-OUT1</b>	6.76	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-PRAI5</b>	5.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-RIC1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-RN1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-YAM1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PT-YAMS1</b>	5.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.19
<b>SM1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BOU1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BOU2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BOU3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BOU4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>CON1</b>	5.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>CON2</b>	ND	ND	ND	ND	1.19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.18
<b>CON3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSF1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSF2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.22	ND	ND	ND	ND	ND

<b>LSF3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.36	ND	ND	ND	ND
<b>LSL1</b>	6.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSL2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSPA1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSPA2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LSPA3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>REP1</b>	6.35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>REP2</b>	ND	ND	ND	ND	1.32	ND	ND	ND	ND	ND	1.19
<b>REP4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAM1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAM2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAM3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAV1</b>	7.52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAV2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SORAV3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SM2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SM3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SM4</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>STA1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>STA2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>STA3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TCM1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TCM2</b>	ND	ND	ND	ND	1.63	ND	ND	ND	ND	ND	1.29
<b>TCM3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TRA1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TRA2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

**Table S5.6.** Individual concentrations of EDCs in suspended particulate matter (SPM) samples of **Survey (1)**, collected in the St. Lawrence River and major tributaries (province of Quebec, Canada). Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Compounds Site	BPA	EQUI	EQUIL	NOR	TESTO	LEVO	MPROG	PROG
ISO1	3.82	ND	ND	ND	ND	ND	2.53	ND
ISO2	2.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO3	ND	ND	1.77	ND	ND	ND	ND	ND
ISO4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO5	3.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO6	4.50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO7	5.44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.47	ND
ISO9	9.40	ND	1.78	ND	ND	ND	2.51	ND
ISO10	16.6	ND	ND	ND	ND	ND	2.47	ND
ISO11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.48	ND
ISO13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO14	3.22	ND	ND	ND	ND	ND	2.49	ND
ISO15	3.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO16	5.44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO17	7.26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO18	5.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ISO19	4.49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-ASS1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-BAT1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-BEC1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-FRA1	3.23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-LOUP1	6.99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-MASK1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-MILLE5	ND	ND	1.79	ND	ND	ND	2.52	ND
PT-NIC1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.47	ND

PT-OUT1	36.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-PRAI5	3.41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-RIC1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.49	ND
PT-RN1	31.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-YAM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PT-YAMS1	ND	ND	ND	4.60	ND	ND	ND	ND
SM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOU1	5.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOU2	8.85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOU3	3.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOU4	3.94	ND	ND	ND	ND	ND	2.58	ND
CON1	ND	ND	1.79	ND	ND	ND	ND	ND
CON2	8.57	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CON3	6.09	ND	ND	ND	ND	23.0	ND	ND
LSF1	8.89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSF2	6.32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSF3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSL1	4.56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSL2	4.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSPA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.62	ND
LSPA2	3.50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LSPA3	15.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REP1	5.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REP2	5.56	ND	ND	ND	ND	ND	2.62	ND
REP4	7.99	ND	ND	ND	ND	ND	2.60	ND
SM2	3.95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SM3	8.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SM4	6.75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SORAM1	3.44	ND	ND	ND	ND	ND	2.54	ND
SORAM2	7.43	ND	ND	ND	ND	ND	2.52	ND
SORAM3	6.33	ND	ND	ND	ND	ND	2.50	ND
SORAV1	3.27	ND	ND	ND	ND	ND	2.73	ND
SORAV2	5.71	ND	ND	ND	ND	ND	2.63	ND
SORAV3	5.36	ND	ND	ND	ND	ND	2.53	ND
STA1	3.35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

STA2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
STA3	6.85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCM1	10.9	ND	ND	ND	ND	ND	2.51	ND
TCM2	8.87	ND	ND	ND	ND	ND	2.61	ND
TCM3	139	ND	ND	ND	ND	ND	2.52	ND
TRA1	9.16	ND	ND	ND	ND	54.8	ND	ND
TRA2	4.75	ND	ND	ND	ND	182	2.64	ND

---

**Table S5.7.** Concentration ranges (ng·L<sup>-1</sup>) of the targeted endocrine disruptors in surface water samples reported in this and other studies. (n.a.: not analysed; n.d.: not detected).

Sampling Area	Analytical method	Concentration range (ng/L)															Reference
		E3	BPA	EQUI	EQUIL	ANDRO	β-E2	E1	EE2	NOR	α-E2	TESTO	LEVO	MEDRO	ALTRE	PROG	
<b>Mille Ile River, Canada</b>	LC-MS/MS (ESI)	nd-1.02	nd-62.3	nd-4.78	nd-0.89	nd-1.21	nd-2.24	nd-1.39	nd-2.77	nd-14.5	nd	nd-2.23	nd-4.09	Nd-2.46	nd-1.07	nd-17.2	<b>This study</b>
<b>Tributary Rivers of Laguna Lake, Philippines</b>	LC-MS/MS	n.a	554-5344	n.a	n.a	n.a	n.d	167 - 203	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d	[534]
<b>Tamagawa River, Japan</b>	LC-MS/MS (ESI)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0.8 1.0	3.4 - 6.6	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[189]
<b>Tributary Rivers of Buyukcekmece Lake, Turkey</b>	LC-MS/MS	n.d - 16.0	n.a	n.a	n.a	n.a	< 0.5 - 10.2	< 0.5 - 6.04	< 0.5 - 14.0	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[198]
<b>Kaoping River, Taiwan</b>	LC-MS/MS	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d - 10.0	n.d	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[535]
<b>Langat River, Malaysia</b>	LC-MS/MS	n.a	1.18 - 8.24	n.a	n.a	n.a	< 0.17 - 0.20	0.09 - 0.18	< 0.35 - 0.88	n.a	n.a	< 0.02 - 0.03	n.a	n.a	n.a	< 0.02 - 0.04	[462]
<b>Tributaries of Huangpu River, China</b>	GC-MS	0.1 - 1.3	3.35 - 19.2	n.a	n.a	n.a	2.0 - 13.8	1.0 - 1.9	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[533]
<b>Rivers of southern Jiangsu, China</b>	LC-MS	n.d - 47.85	48.24 - 725.94	n.a	n.a	n.a	n.d - 52.71	n.d - 11.23	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[480]
<b>Bahe River, China</b>	GC-MS	< 0.3 - 5.2	< 1.5 - 1573.1	n.a	n.a	n.a	1.2 - 23.9	2.4 - 55.9	<0.1 - 31.5	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[536]



<b>Iguazu River Basin, Brazil</b>	HPLC	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	nd - 13.45	n.d - 1.80	n.d - 5.90	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d - 0.45	[537]
<b>River Rhine and tributaries, Germany</b>	ELISA	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1.3 - 9.2	n.a	0.3 - 1.0	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[538]
<b>Mondego River, Portugal</b>	GC-MS	n.a	8.5 - 185	n.a	n.a	n.a	1.5 - 18	1.0 - 15	0.3 - 11	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[539]
<b>Main River Bodies of Romagna Area, Italy</b>	LC-MS/MS	n.a	< 0.99 - 244	n.a	n.a	n.a	< 1.35	< 0.62 - 6.9	< 1.66	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[463]
<b>Arno River, Italy</b>	LC-MS/MS	2.11 - 2.65	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d	0.43 - 0.62	4.21 - 4.78	n.a	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[271]
<b>Mississippi River, USA</b>	GC-MS	n.a	0.35 - 6.43	n.a	n.a	n.a	n.d	1.12 - 1.81	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[540]
<b>River Zala, Hungary</b>	LC-MS/MS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1.29 - 3.40	n.a	n.a	2.74 - 10.17	[481]	
<b>Piracicaba River, Brazil</b>	LC-MS/MS	n.d - 46	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d - 56	n.d - 14	n.d - 150	n.a	n.a	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.d - 26	[183]
<b>Mississippi River, USA</b>	LC-MS/MS	n.d	n.a	n.d	n.a	n.a	0.09	0.18 - 0.62	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[541]
<b>River Ganga, India</b>	GC-MS	n.a	40 - 4460	n.a	n.a	n.d - 4.5	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[542]
<b>Blanice River, Czech Republic</b>	LC-MS/MS	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	< 0.08	< 0.06	< 0.06	1.1	[543]	

**Table S5.8.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples **Survey (2)** (Mille Iles River) during the **winter**. Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup>.

<b>Laval</b>									
	<b>RMI 1</b>	<b>RMI 2</b>	<b>RMI 3</b>	<b>RMI 4</b>	<b>RMI 5</b>	<b>RMI 6</b>	<b>RMI 7</b>	<b>RMI 8</b>	<b>RMI 9</b>
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>BPA</b>	6.08	ND	2.47	2.96	8.34	1.48	11.86	3.52	ND
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	0.82	0.84	0.80	0.86	0.82	0.84	0.82	0.81	0.81
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>β-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>E1</b>	0.95	0.93	0.95	0.97	ND	ND	0.99	0.94	0.95
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	0.66	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	7.85	1.78	4.21	4.78	9.81	2.32	13.67	5.28	1.76

	<b>Terrebonne</b>						<b>Charle.</b>	<b>Rep.</b>
	<b>RMI 10</b>	<b>RMI 11</b>	<b>RMI 12</b>	<b>RMI 13</b>	<b>RMI 14</b>	<b>RMI 15</b>	<b>AR</b>	<b>AR/RdP</b>
<b>E3</b>	ND	0.38	ND	ND	0.38	ND	0.36	ND
<b>BPA</b>	3.91	ND	5.53	9.36	62.28	37.73	16.90	9.97
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	0.78	0.47	0.78	0.71	0.53
<b>EQUIL</b>	0.80	0.76	0.79	0.78	0.89	0.86	0.82	0.85
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>β-E2</b>	ND	ND	ND	ND	0.56	0.33	0.85	ND
<b>E1</b>	1.10	1.06	1.25	1.10	1.25	ND	1.22	1.04
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.77	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	7.58	1.70	14.47	2.02
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	5.81	2.19	7.57	12.01	73.40	41.40	38.09	14.52

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.9.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples **Survey (2)** (Mille Iles River) during the **spring**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

<b>Laval</b>									
	<b>RMI 1</b>	<b>RMI 2</b>	<b>RMI 3</b>	<b>RMI 4</b>	<b>RMI 5</b>	<b>RMI 6</b>	<b>RMI 7</b>	<b>RMI 8</b>	<b>RMI 9</b>
<b>E3</b>	1.02	ND	0.41	0.68	ND	ND	0.59	ND	ND
<b>BPA</b>	6.08	ND	22.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	0.65	0.31	ND	ND	0.32	1.02	0.77
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	7.10	ND	23.18	1.00	0.00	0.00	0.92	1.02	0.77

<b>Terrebonne</b>							<b>Charle.</b>	<b>Rep.</b>
	<b>RMI 10</b>	<b>RMI 11</b>	<b>RMI 12</b>	<b>RMI 13</b>	<b>RMI 14</b>	<b>RMI 15</b>	<b>AR</b>	<b>AR/RdP</b>
<b>E3</b>	ND	ND	ND	0.45	0.30	0.35	ND	ND
<b>BPA</b>	17.88	ND	ND	36.17	ND	18.72	1.78	9.62
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	0.85	2.24	0.80	0.95	0.43	0.54	ND
<b>E1</b>	ND	ND	1.25	ND	0.33	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	0.41	0.57	4.15	1.97	ND	ND	ND
<b><math>\alpha</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	0.99	3.04	0.86	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	0.62	ND	0.59	ND	ND	ND
<b>Total</b>	17.92	2.25	7.73	42.42	4.14	19.50	2.32	9.62

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.10.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples **Survey (2)** (Mille Iles River) during the **summer**. Concentrations are indicated in ng·L<sup>-1</sup>.

<b>Laval</b>									
	<b>RMI 1</b>	<b>RMI 2</b>	<b>RMI 3</b>	<b>RMI 4</b>	<b>RMI 5</b>	<b>RMI 6</b>	<b>RMI 7</b>	<b>RMI 8</b>	<b>RMI 9</b>
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.33
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>β-E2</b>	ND	0.74	0.49	0.58	0.53	0.66	0.42	0.43	0.41
<b>E1</b>	ND	1.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	0.56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	1.56	3.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	2.27	ND	ND	ND	0.97	ND	ND	0.68
<b>Total</b>	1.56	8.55	0.49	0.58	0.53	1.63	0.42	0.43	1.42

<b>Terrebonne</b>						<b>Charle.</b>	<b>Rep.</b>	
	<b>RMI 10</b>	<b>RMI 11</b>	<b>RMI 12</b>	<b>RMI 13</b>	<b>RMI 14</b>	<b>RMI 15</b>	<b>AR</b>	<b>AR/RdP</b>
<b>E3</b>	ND	ND	ND	ND	ND	0.87	ND	ND
<b>EQUI</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	0.48	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>β-E2</b>	ND	0.53	ND	0.77	0.69	0.80	0.85	0.76
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	0.33	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	0.59	ND	0.93	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	1.17	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	0.66	ND	1.07	ND	ND
<b>PROG</b>	1.68	ND	0.78	5.25	4.69	17.72	1.75	1.15
<b>Total</b>	2.16	0.53	0.78	7.28	6.88	21.38	2.60	1.91

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.11.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples **Survey (2)** (Mille Iles River) during the **autumn**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	<b>Laval</b>								
	<b>RMI 1</b>	<b>RMI 2</b>	<b>RMI 3</b>	<b>RMI 4</b>	<b>RMI 5</b>	<b>RMI 6</b>	<b>RMI 7</b>	<b>RMI 8</b>	<b>RMI 9</b>
<b>BPA</b>	2.39	1.05	2.30	2.52	1.92	1.58	2.59	4.20	6.51
<b>EQUI</b>	1.47	1.84	1.42	1.30	1.21	1.35	1.41	1.19	1.11
<b>EQUIL</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	0.85	0.96	0.91	1.09	1.09	0.95	0.87	1.11	1.00
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	3.35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	1.64	2.11	1.75	1.73	1.71	1.66	1.65	1.70	1.55
<b>LEVO</b>	ND	2.90	4.09	3.71	ND	2.64	3.49	ND	ND
<b>MEDRO</b>	1.56	1.94	2.10	2.46	1.77	1.92	1.36	1.63	1.37
<b>PROG</b>	ND	ND	1.87	ND	ND	ND	ND	1.39	ND
<b>Total</b>	7.92	14.1	14.4	12.8	7.70	10.1	11.4	11.2	11.7

	<b>Terrebonne</b>						<b>Charle.</b>	<b>Rep.</b>
	<b>RMI 10</b>	<b>RMI 11</b>	<b>RMI 12</b>	<b>RMI 13</b>	<b>RMI 14</b>	<b>RMI 15</b>	<b>AR</b>	<b>AR/RdP</b>
<b>BPA</b>	3.86	9.22	5.91	4.27	4.25	6.88	6.09	12.3
<b>EQUI</b>	0.99	1.06	0.94	1.56	4.78	1.24	0.99	0.96
<b>EQUIL</b>	ND	ND	ND	ND	0.62	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	0.89	1.03	1.07	1.17	0.48	ND	0.99	1.21
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	ND	ND	0.47	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	8.16	ND	ND
<b>TESTO</b>	1.58	1.64	1.58	1.90	2.23	ND	1.54	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	2.53	1.66	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	1.53	1.64	1.79	2.07	2.37	1.61	1.39	1.36
<b>PROG</b>	ND	0.77	ND	3.02	11.83	ND	ND	ND
<b>Total</b>	8.85	15.4	11.3	16.5	28.7	17.9	11.01	15.8

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.12.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of **Survey (2) (Mille Iles River)** during the **winter**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

	Laval								
	RMI 1	RMI 2	RMI 3	RMI 4	RMI 5	RMI 6	RMI 7	RMI 8	RMI 9
<b>E1</b>	ND	ND	0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	5.13	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	1.97	4.46	1.64	1.54	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>n.a</b>	<b>1.97</b>	<b>9.70</b>	<b>1.64</b>	<b>1.54</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>

	Terrebonne						Charle.	Rep.
	RMI 10	RMI 11	RMI 12	RMI 13	RMI 14	RMI 15	AR	AR/Rd P
<b>E1</b>	ND	ND	ND	0.15	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	1.65	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>1.65</b>	<b>0.15</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.13.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of **Survey (2) (Mille Iles River)** during the **spring**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

	Laval								
	RMI 1	RMI 2	RMI 3	RMI 4	RMI 5	RMI 6	RMI 7	RMI 8	RMI 9
<b>BPA</b>	30.8	ND	ND	ND	ND	ND	41.7	228	108
<b>EQUIL</b>	36.6	ND	19.8	15.5	14.1	ND	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	ND	0.75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	63.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	2.02	2.80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	0.32	0.48	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	0.33	ND	1.18	0.74	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	1.73	5.80	ND	ND	1.93	ND	ND	ND	2.20
<b>Total (ng/g)</b>	<b>71.9</b>	<b>9.83</b>	<b>85.0</b>	<b>16.2</b>	<b>16.0</b>	<b>n.a</b>	<b>41.7</b>	<b>228</b>	<b>110</b>

	Terrebonne						Charle.	Rep.
	RMI 10	RMI 11	RMI 12	RMI 13	RMI 14	RMI 15	AR	AR/RdP
<b>BPA</b>	ND	ND	57.5	ND	2.38	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	ND	5.50	ND	ND	18.6	ND	ND	ND
<b>ANDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	25.9	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	8.76	ND	ND	ND
<b>TESTO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	2.75	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND <sub>in SPM</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>ALTRE</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>n.a</b>	<b>5.50</b>	<b>60.3</b>	<b>n.a</b>	<b>55.7</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>	<b>n.a</b>

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.14.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of **Survey (2) (Mille Iles River)** during the **summer**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

	Laval								
	RMI 1	RMI 2	RMI 3	RMI 4	RMI 5	RMI 6	RMI 7	RMI 8	RMI 9
<b>BPA</b>	ND	17.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EQUIL</b>	0.62	12.2	3.73	ND	ND	ND	4.77	ND	ND
<b>ANDRO</b>	ND	0.33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><math>\beta</math>-E2</b>	ND	ND	2.86	ND	3.06	ND	2.82	1.61	ND
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	ND	4.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>0.62</b>	<b>34.5</b>	<b>6.59</b>	<b>n.a</b>	<b>3.06</b>	<b>n.a</b>	<b>7.59</b>	<b>1.61</b>	<b>n.a</b>

	Terrebonne					Charle.	Rep.	
	RMI 10	RMI 11	RMI 12	RMI 13	RMI 14	RMI 15	AR/Rd P	
<b>BPA</b>	2.55	ND	ND	ND	7.66	29.5	14.6	ND
<b>EQUIL</b>	5.48	ND	2.81	ND	5.55	4.96	ND	7.38
<b>ANDRO</b>	ND	ND	0.35	ND	ND	ND	ND	0.52
<b><math>\beta</math>-E2</b>	1.53	1.82	ND	ND	ND	ND	ND	2.11
<b>E1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOR</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>LEVO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MEDRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>PROG</b>	1.70	ND	3.37	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>11.3</b>	<b>1.82</b>	<b>6.53</b>	<b>n.a</b>	<b>13.2</b>	<b>34.5</b>	<b>14.6</b>	<b>10.0</b>

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny



**Table S5.15.** Individual concentrations and total concentrations ( $\Sigma$ EDC) of the targeted endocrine disruptors in SPM samples of **Survey (2) (Mille Iles River)** during the **autumn**. Concentrations are indicated in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Laval									
	RMI 1	RMI 2	RMI 3	RMI 4	RMI 5	RMI 6	RMI 7	RMI 8	RMI 9
$\beta$ -E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E1	29.6	5.04	2.40	4.75	11.4	1.79	2.88	4.03	3.99
$\alpha$ -E2	31.2	10.5	8.96	9.84	9.05	<LOQ	8.22	17.9	13.6
PROG	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>60.8</b>	<b>15.5</b>	<b>11.4</b>	<b>14.6</b>	<b>20.5</b>	<b>1.79</b>	<b>11.1</b>	<b>21.9</b>	<b>17.6</b>

Terrebonne						Charle.	Rep.	
	RMI 10	RMI 11	RMI 12	RMI 13	RMI 14	RMI 15	AR	AR/Rd P
$\beta$ -E2	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND
E1	<LOQ	2.21	<LOQ	12.0	<LOQ	8.45	3.27	4.59
$\alpha$ -E2	6.90	11.5	2.64	16.0	3.68	37.0	6.22	26.4
PROG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total (ng/g)</b>	<b>6.90</b>	<b>13.7</b>	<b>2.64</b>	<b>28.0</b>	<b>3.68</b>	<b>45.5</b>	<b>9.49</b>	<b>31.0</b>

Charle. = Charlemagne and Rep. = Repentigny

**Table S5.16.** Comparison of  $\Sigma$ EDC concentrations in the dissolved phase between seasons (**survey 2**), showing the p-values of the pairwise Wilcoxon's rank-sign tests. Significant differences are highlighted in bold (p-value <0.05).

	Winter	Spring	Summer	Autumn
Winter	-	-	-	-
Spring	0.24	-	-	-
Summer	<b>0.0008</b>	<b>0.049</b>	-	-
Autumn	0.33	0.15	<b>0.0003</b>	-

**Table S5.17.** Relative contributions (%) of the target endocrine disruptors to the summed EDC levels in the dissolved phase of **survey 2** (Mille Iles River), arranged per sampling season. Contributions higher than 5% are highlighted in bold font.

	<i>Mean contribution % to the summed EDC levels</i>			
	Winter	Spring	Summer	Autumn
E3	1.1	<b>11.4</b>	1.6	0
BPA	<b>59.2</b>	<b>45.6</b>	0	<b>35.2</b>
EQUI	0.9	0	0	<b>11.0</b>
EQUIL	<b>16.7</b>	0	0	0.1
ANDRO	0	0	1.1	<b>7.9</b>
$\beta$ -E2	0.3	<b>27.6</b>	<b>49.7</b>	0.1
E1	<b>17.2</b>	1.7	1.2	0
EE2	0.4	0	0	0
NOR	3.9	<b>5.9</b>	0	4.1
$\alpha$ -E2	0	0	0	0
TESTO	0	0	1.1	<b>12.9</b>
LEVO	0	<b>6.1</b>	<b>7.1</b>	<b>9.3</b>
MEDRO	0	1.6	1.0	<b>14.2</b>
ALTRE	0	0	0.8	0
PROG	0.4	0	<b>36.2</b>	5.3

**Table S5.18.** Comparison of  $\Sigma$ EDC concentrations in the SPM between seasons (survey 2), showing the p-values of the pairwise Wilcoxon's rank-sign tests. Significantly different data are highlighted in bold (p-value <0.05).

	Winter	Spring	Summer	Autumn
Winter	-	-	-	-
Spring	<b>0.003</b>	-	-	-
Summer	<b>0.008</b>	<b>0.044</b>	-	-
Autumn	<b>0.00001</b>	0.22	<b>0.039</b>	-

**Table S5.19.** Solid water distribution coefficient Log  $K_d$  ( $K_d$  in  $L.kg^{-1}$ ) of the targeted endocrine disruptors in the surface water samples in the province of Quebec (Canada).

Compound	Seasons	Site	Mean log $K_d$	SD
<b>E1</b>	Winter	RMI 3 / RMI 13	2.09	0.05
<b>BPA</b>	Spring	RMI 1	3.71	/
<b>NOR</b>	Spring	RMI 14	3.65	/
<b>LEVO</b>	Spring	RMI 12	2.96	/
<b><math>\beta</math>-E2</b>	Summer	RMI (3,5,7,8,10,11, AR/RdP)	3.63	0.16
<b>PROG</b>	Summer	RMI 2	3.31	/

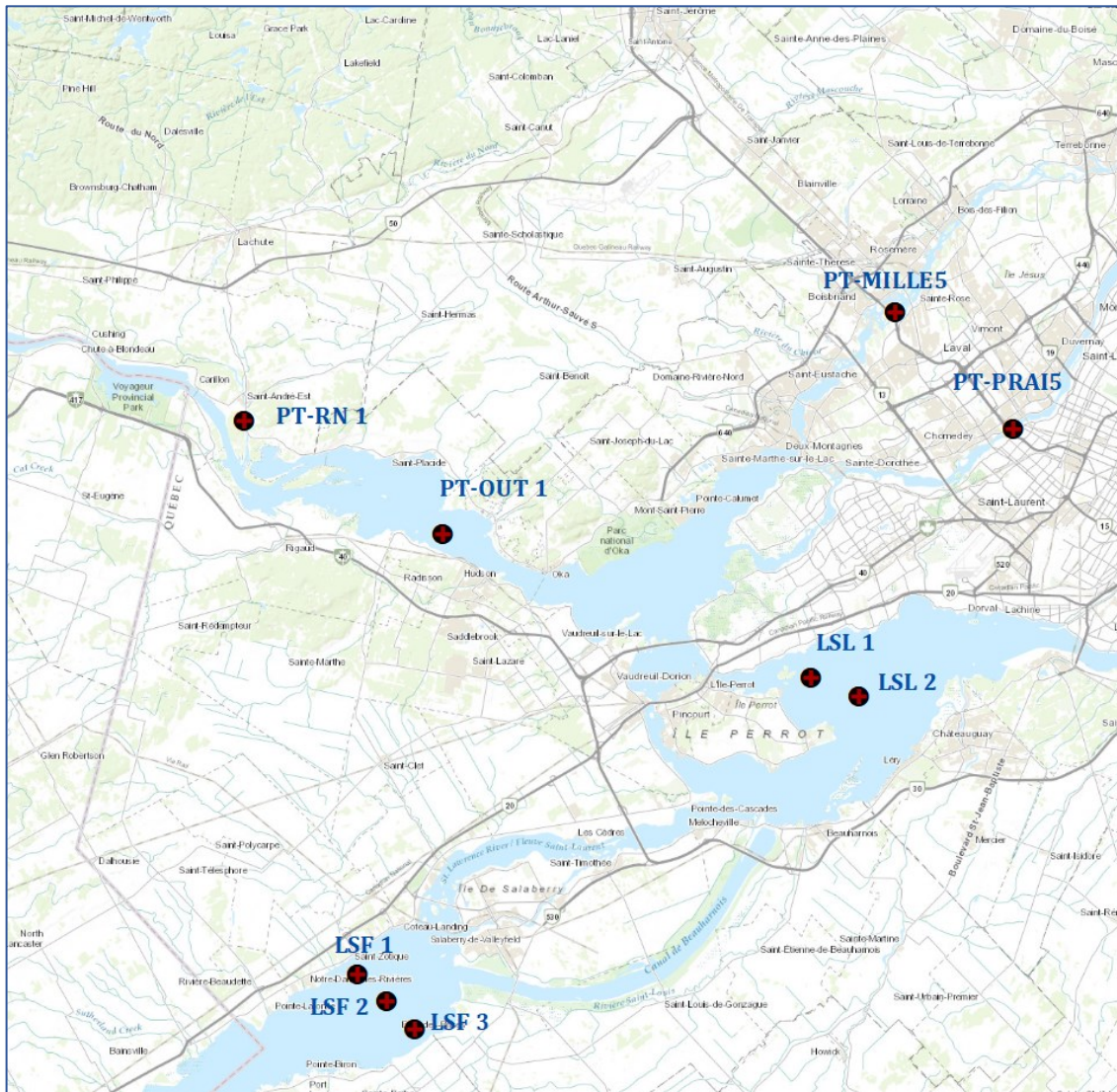
**Table S5.20.** Calculated site-specific estrogenic activities (EEQ, ng E2/L) for survey (1) (n = 69). Values above the threshold of 1 ng E2 / L are highlighted in red font.

	EEQ (ng E2 / L)					EEQ-total
	$\beta$ -Estradiol	Estrone	Estriol	Ethinylestradiol	Bisphenol A	
PT-ASS1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-BAT1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-BEC1	0.000	0.000	1.800	0.000	0.000	1.800
PT-FRA1	0.000	0.000	2.731	0.000	0.000	2.731
PT-LOUP1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-MASK1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-MILLE5	0.000	0.000	1.786	0.000	0.000	1.786
PT-NIC1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-OUT1	0.000	0.000	2.330	0.000	0.000	2.330
PT-PRAI5	0.000	0.000	2.063	0.000	0.000	2.063
PT-RIC1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-RN1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-YAM1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PT-YAMS1	0.000	0.000	1.787	0.000	0.000	1.787
SM1 (St Maurice)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO3	0.000	0.000	2.014	0.000	0.000	2.014
ISO4	0.000	0.000	1.893	0.000	0.000	1.893
ISO5	0.000	0.000	1.673	0.000	0.000	1.673
ISO6	0.000	0.000	1.580	0.000	0.000	1.580
ISO7	0.000	0.000	1.614	0.000	0.000	1.614
ISO8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO9	0.000	0.000	0.000	1.509	0.000	1.509
ISO10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002
ISO11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ISO19	0.000	0.000	1.589	0.000	0.000	1.589
BOU1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BOU2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BOU3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BOU4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CON1	0.000	0.000	2.063	0.000	0.000	2.063
CON2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CON3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LSF1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LSF2	0.000	0.000	0.000	1.519	0.000	1.519
LSF3	0.000	0.000	0.000	1.705	0.000	1.705
LSL1	0.000	0.000	2.111	0.000	0.000	2.111
LSL2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LSPA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LSPA2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LSPA3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
REP1	0.000	0.000	2.189	0.000	0.000	2.189
REP2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
REP4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SM2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SM3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SM4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SORAM1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SORAM2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SORAM3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SORAV1	0.000	0.000	2.592	0.000	0.000	2.592
SORAV2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SORAV3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
STA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
STA2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
STA3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TCM1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TCM2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TCM3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TRA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TRA2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

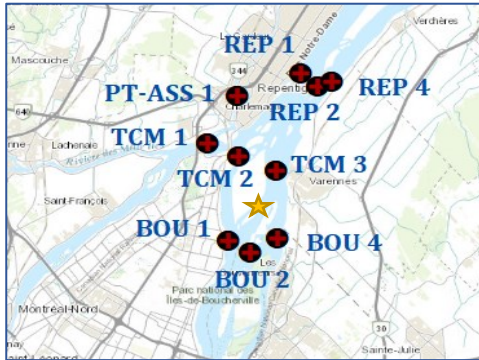
**Table S5.21.** Calculated site-specific estrogenic activities (EEQ, ng E2/L) for survey (2) (n = 68). Values above the threshold of 1 ng E2 / L are highlighted in red font.

	EEQ (ng E2 / L)					EEQ-total
	$\beta$ -Estradiol	Estrone	Estriol	Ethinylestradiol	Bisphenol A	
Winter-RMI 1	0.000	0.238	0.000	0.000	0.001	0.239
Winter-RMI 2	0.000	0.234	0.000	0.000	0.000	0.234
Winter-RMI 3	0.000	0.236	0.000	0.000	0.000	0.237
Winter-RMI 4	0.000	0.243	0.000	0.000	0.000	0.243
Winter-RMI 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Winter-RMI 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Winter-RMI 7	0.000	0.247	0.000	0.000	0.001	0.249
Winter-RMI 8	0.000	0.236	0.000	0.000	0.000	0.236
Winter-RMI 9	0.000	0.238	0.000	0.000	0.000	0.238
Winter-RMI 10	0.000	0.276	0.000	0.000	0.000	0.276
Winter-RMI 11	0.000	0.265	0.130	0.000	0.000	0.394
Winter-RMI 12	0.000	0.314	0.000	0.000	0.001	0.314
Winter-RMI 13	0.000	0.275	0.000	0.000	0.001	0.276
Winter-RMI 14	0.559	0.313	0.132	0.000	0.007	1.010
Winter-RMI 15	0.328	0.000	0.000	0.000	0.005	0.333
Winter-AR	0.848	0.306	0.125	3.460	0.002	4.741
Winter-AR/RdP	0.105	0.261	0.000	0.000	0.001	0.367
Spring-RMI 1	0.000	0.000	0.352	0.000	0.001	0.353
Spring-RMI 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Spring-RMI 3	0.653	0.000	0.142	0.000	0.003	0.798
Spring-RMI 4	0.312	0.000	0.236	0.000	0.000	0.548
Spring-RMI 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Spring-RMI 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Spring-RMI 7	0.325	0.000	0.205	0.000	0.000	0.530
Spring-RMI 8	1.017	0.000	0.000	0.000	0.000	1.017
Spring-RMI 9	0.773	0.000	0.000	0.000	0.000	0.773
Spring-RMI 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002
Spring-RMI 11	0.853	0.000	0.000	0.000	0.000	0.853
Spring-RMI 12	2.244	0.314	0.000	0.000	0.000	2.558
Spring-RMI 13	0.797	0.000	0.154	0.000	0.004	0.956
Spring-RMI 14	0.951	0.082	0.103	0.000	0.000	1.136
Spring-RMI 15	0.429	0.000	0.121	0.000	0.002	0.552
Spring-AR	0.536	0.000	0.000	0.000	0.000	0.536
Spring-AR/RdP	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Summer-RMI 1	0.404	0.000	0.000	0.000	0.000	0.404
Summer-RMI 2	0.745	0.348	0.000	0.000	0.000	1.093
Summer-RMI 3	0.495	0.000	0.000	0.000	0.000	0.495
Summer-RMI 4	0.576	0.000	0.000	0.000	0.000	0.576
Summer-RMI 5	0.526	0.000	0.000	0.000	0.000	0.526
Summer-RMI 6	0.657	0.000	0.000	0.000	0.000	0.657
Summer-RMI 7	0.424	0.000	0.000	0.000	0.000	0.424
Summer-RMI 8	0.428	0.000	0.000	0.000	0.000	0.428
Summer-RMI 9	0.406	0.000	0.115	0.000	0.000	0.521
Summer-RMI 10	0.439	0.000	0.000	0.000	0.000	0.439
Summer-RMI 11	0.530	0.000	0.000	0.000	0.000	0.530
Summer-RMI 12	0.385	0.000	0.000	0.000	0.000	0.385
Summer-RMI 13	0.768	0.000	0.000	0.000	0.000	0.768
Summer-RMI 14	0.689	0.082	0.000	0.000	0.000	0.771
Summer-RMI 15	0.797	0.000	0.298	0.000	0.000	1.095
Summer-AR	0.852	0.000	0.000	0.000	0.000	0.852
Summer-AR/RdP	0.765	0.000	0.000	0.000	0.000	0.765
Autumn-RMI 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-RMI 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-RMI 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Autumn-RMI 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-RMI 12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-RMI 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-RMI 14	0.473	0.000	0.000	0.000	0.001	0.474
Autumn-RMI 15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-AR	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
Autumn-AR/RdP	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001

**Figure S1.** Zoomed-in maps showing the sampling locations of Survey (1) within the St. Lawrence River and select tributary rivers.

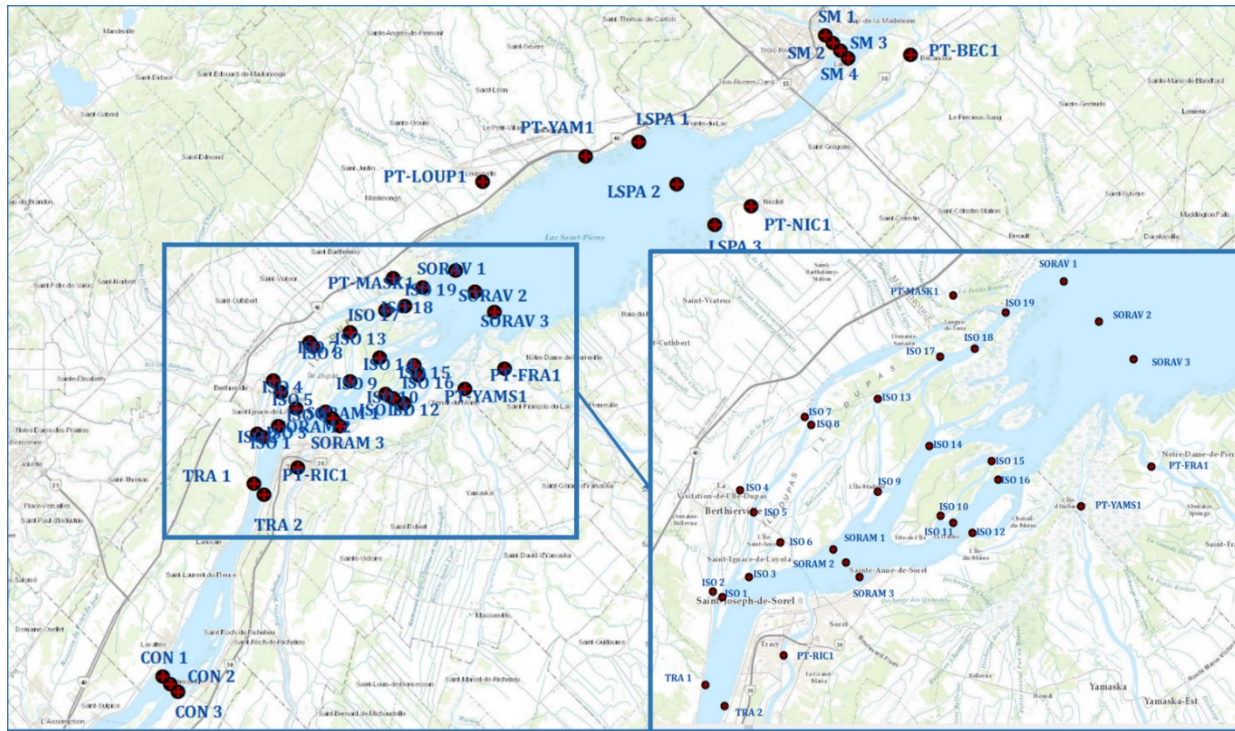


**S1.a.** Zoom-in on the **southwestern area** investigated in survey (1), including sampling points within the St. Lawrence River (LSF: Lake St. Francis; LSL: Lake St. Louis) and tributaries (PT-MILLE: *Milles Iles River*; PT-OUT: *Outaouais River*; PT-PRAI: *Des Prairies River*; and PT-RN: *Du Nord River*).



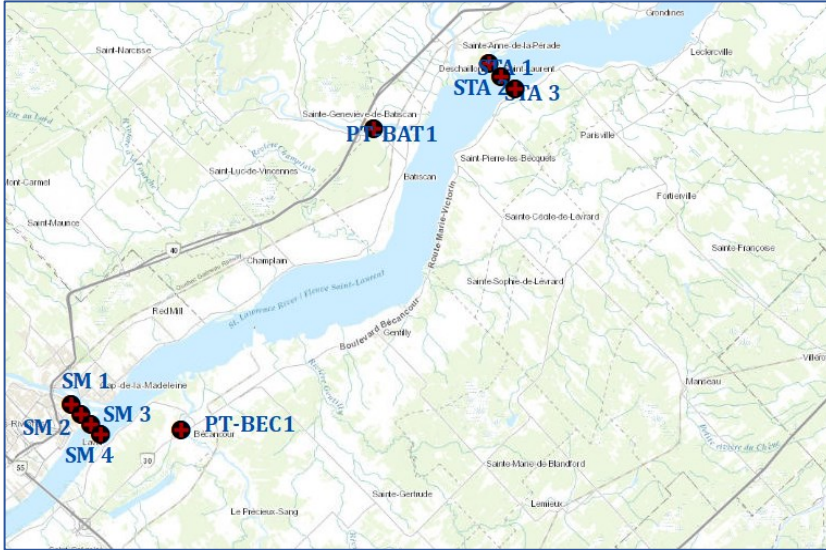
**S1.b.** Zoom-in on the **northeastern tip of the Montreal Island** investigated in survey (1), including sites within the St. Lawrence River (BOU: Boucherville Islands; TCM: Montreal Downstream; REP: Repentigny) and tributary rivers (PT-ASS: *L'Assomption River*). The yellow star represents the position of the Montreal WWTP effluent reject point in the St. Lawrence River, near Ile aux Vaches. On the map, the St. Lawrence River flows in a north to northeastern direction. Sampling locations BOU1/BOU2 are thus immediately upstream the WWTP reject point, while TCM 3 is immediately downstream, i.e., within the WWTP effluent plume.



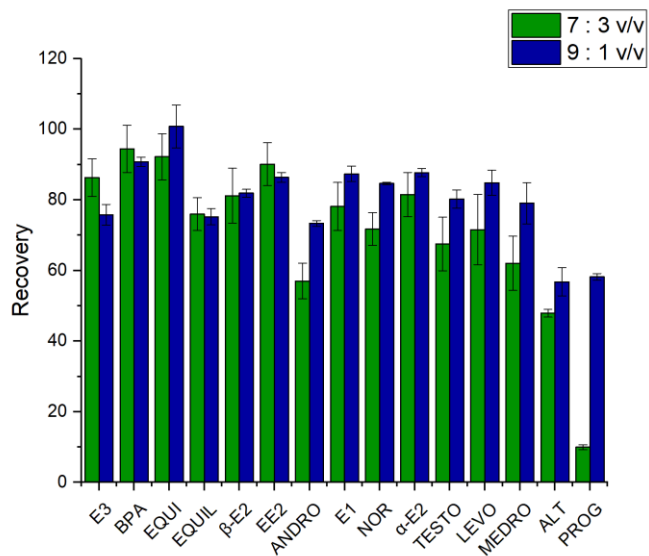


**S1.c.** Zoom-in on the Lake Saint-Pierre area (a natural widening of the St. Lawrence River) investigated in survey (1), including sites within the St. Lawrence River upstream Lake Saint-Pierre (CON: Contrecoeur; TRA: before Sorel-Tracy; SORAM: after Sorel-Tracy), within Lake Saint-Pierre (SORAV: transect at the beginning of Lake St. Pierre; LSPA: transect at the end of Lake St. Pierre), and downstream Lake Saint-Pierre (SM 2-4: St. Lawrence River near the city of Trois-Rivières). For clarity, the bottom left pane shows a zoom-in on the Sorel Islands area (ISO 1-19). Tributary rivers to the St. Lawrence in the north shores are denoted as PT-LOUP (*Du Loup River*), PT-MASK (*Maskinongé River*), PT-YAM (*Yamachiche River*), and SM-1 (*St. Maurice River*). Tributary rivers to the St. Lawrence in the south shores are denoted as PT-BEC (*Bécancour River*), PT-FRA (*Saint-François River*), PT-NIC (*Nicolet River*), PT-RIC (*Richelieu River*), and PT-YAMS (*Yamaska River*).





**S1.d.** Zoom-in on the **northeastern area**, including transects within the St. Lawrence River near the city of Trois-Rivières (SM 2-4) and near the city of Sainte-Anne-de-la-Pérade (STA 1-3). Tributary rivers to the St. Lawrence within this area are denoted as PT-BAT (*Batiscan River*), PT-BEC (*Bécancour River*), and SM-1 (*St. Maurice River*).



**Figure S2.** Extraction and clean-up recoveries for hormones depending on the used clean-up mixture (elution solvent used at the cleanup step: ACN/MeOH 7:3 v/v or ACN/MeOH 9:1 v/v). In light of the results, the second method was selected.

# Chapitre 6. Conclusions

## 6.1 Conclusions

Même si certains contaminants émergents sont étudiés depuis plusieurs décennies, il convient de constater que l'intérêt que la communauté scientifique leur porte peut fluctuer mais ne se dément pas. Les hormones stéroïdiennes, justement, font partie de cette catégorie de contaminants naturels et synthétiques dont l'émergence n'est pas des plus récentes mais demeurent tout de même des composés d'intérêt très actuel. Les hormones stéroïdiennes, comme nous l'avons mentionné, sont des perturbateurs endocriniens notoires dont les impacts sur l'environnement et sur la santé humaine sont mesurés depuis plusieurs décennies à travers le monde (pour des niveaux supérieurs à ceux retrouvés dans l'eau du robinet). Étant donné leur utilisation massive dans divers domaines, ces molécules présentent un risque environnemental qu'il est important d'évaluer. De plus, leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent une mobilité non négligeable dans l'eau et dans les sols, une persistance significative, ainsi qu'une toxicité pouvant être importante lorsque les concentrations sortent des niveaux endogènes. La présence suspectée de ces composés à des niveaux très faibles dans les matrices environnementales telles que l'eau du robinet, l'eau de surface, les eaux usées ainsi que dans la matière particulaire en suspension fut une des motivations de ce travail réalisé en plusieurs segments.

Avec des concentrations aussi faibles que du  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  voire du sub  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dans certaines matrices aquatiques en phase dissoute (eau de surface, eau du robinet), il était nécessaire de développer des méthodes analytiques suffisamment sensibles, robustes et efficaces tout en diminuant le temps d'analyse et le nombre d'injections pour une liste d'hormone la plus étendue possible. Une norme en particulier a motivé l'élaboration d'une telle méthode : la norme européenne de la directive cadre sur l'eau (EU WFD) pour l'EE2 dans les eaux de surface de  $0,035 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Un des piliers de référence de cette thèse fut incontestablement la méthode 539.1 de l'US EPA qui nous sert de base pour l'élaboration des méthodes analytiques développées au laboratoire.

Dans le **Chapitre 3**, la méthode analytique de type SPE en ligne rapide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, sensible et robuste, basée sur la liste de perturbateurs

endocriniens prioritaires de l'EPA, a permis d'atteindre des limites de détection allant de 0,050 ng·L<sup>-1</sup> à 1,0 ng·L<sup>-1</sup>. La sélectivité et la sensibilité de cette méthode analytique ont permis la détection du bisphénol A, des œstrogènes, des progestatifs, des androgènes et des stéroïdes, à des niveaux du ng·L<sup>-1</sup> ou en dessous dans certains échantillons environnementaux. Cette dernière est basée sur une simple pré-filtration des échantillons à l'aide de filtres en fibre de verre, suivie de l'ajout d'étalons internes marqués par des isotopes et d'une analyse directe par SPE - UHPLC-MS/MS en ligne, et représente une amélioration considérable du temps d'analyse total par rapport à d'autres méthodes hors lignes. Pour la première fois, la conformité aux critères de performance de la méthode EPA 539.1 a été validée pour une liste étendue de perturbateurs endocriniens et de matrices (eau du robinet, eau de surface et affluents et effluents d'eaux usées). La méthode a donné des résultats satisfaisants en termes de justesse (biais généralement compris entre ± 10 %), de linéarité ( $R^2 > 0,9980$  dans la plupart des cas) et de variations d'étalons internes entre les échantillons (± 18 %). Cette étude a permis de mettre en lumière la présence des hormones stéroïdiennes et du BPA ainsi que leur ubiquité dans les matrices aqueuses du Québec. En effet, le bisphénol A, l'estradiol, la noréthindrone, la testostérone, l'androstènedione, l'éthinylestradiol et l'estriol ont été détectés dans les échantillons d'eau du robinet (<LOQ – 2,8 ng·L<sup>-1</sup>). Le bisphénol A, l'estrone, de la noréthindrone et le  $\beta$ -estradiol ont été détectés dans des échantillons d'eau de surface (<LOQ – 17 ng·L<sup>-1</sup>). Quant à l'estriol, le bisphénol A, l'équiline, l'androstènedione,  $\beta$ -estradiol, l'estrone, la testostérone et le lévonorgestrel ont été détectés de manière variable dans les échantillons d'eaux usées brutes (<LOQ – 300 ng·L<sup>-1</sup>), tandis que l'estriol, le bisphénol A, l'équilénine, le  $\beta$ -estradiol, l'estrone, de la noréthindrone, l' $\alpha$ -estradiol, de la testostérone et de la progestérone ont été trouvés dans les effluents d'eaux usées traitées (<LOQ – 240 ng·L<sup>-1</sup>).

Le **Chapitre 4** a mis en avant une méthode analytique proche de celle développée dans le **Chapitre 3** mais basée sur la SPE hors ligne automatisée (volume d'échantillon élevé) employant le Dionex™ AutoTrace™. Cette dernière présentait l'avantage de gagner en réplicabilité et répétabilité. L'objectif ici était de conserver les acquis de la méthode en ligne tout en se fixant un nouvel objectif qui consistait en l'atteinte d'une limite de détection de 0.4 ng·L<sup>-1</sup> pour E1 et  $\beta$ -E2, et de 0.035 ng·L<sup>-1</sup> pour EE2. En effet, il s'agissait des limites de détection maximales acceptables selon l'EU WFD dans l'eau de surface. Les LOD obtenues

ici pour E1 et  $\beta$ -E2 ( $0,1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les eaux de surface) sont conformes aux exigences de l'EU WFD et sont également comparables aux limites de détection de la méthode standard EPA 1698 ( $0,1\text{--}0,2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau ambiante). Notre  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  actuelle ( $0,50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les eaux de surface) ne permet pas d'atteindre la recommandation de l'UE ; l'exigence stricte de limite de détection reste un défi pour les analystes, même lorsqu'ils utilisent des méthodes standards (par exemple, méthode 1698 :  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  de  $0,1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau ambiante). Cependant, notre  $\text{LOD}_{\text{EE2}}$  est du même ordre de grandeur que les lignes directrices de la Colombie-Britannique visant à la protection des organismes d'eau douce (fixées respectivement à  $0,50$  et  $0,75 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  pour l'exposition chronique et aiguë). Bien que les objectifs n'aient été que partiellement atteints, les performances analytiques de la méthode ont permis de détecter voire de quantifier certains analytes cibles dans les différentes matrices environnementales étudiées. Les concentrations totales d'EDC sont ainsi restées faibles dans l'eau du robinet ( $<\text{LOQ} = 0,92 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tandis que des fréquences de détection et des niveaux de contamination plus élevés ont été signalés dans les eaux de surface ( $2,6\text{--}37 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et les eaux usées municipales ( $10\text{--}424 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

En utilisant des méthodes analytiques améliorées, dans le **Chapitre 5**, nous avons entrepris d'enquêter sur l'occurrence et les risques associés à la présence de 15 perturbateurs endocriniens prioritaires EPA dans les eaux de surface du Québec (Canada). Pour cette étude, les phases dissoutes et particulaires (SPM) ont été ciblées. Un premier échantillonnage (campagne d'échantillonnage #1) a été réalisée à grande échelle spatiale, incluant un tronçon de 200 km du fleuve Saint-Laurent et 15 de ses affluents le long d'un axe de population dense (environ 4 millions d'habitants). Des échantillons d'eau de surface ( $n = 69$ ) ont été prélevés dans une série de sections transversales dans le Saint-Laurent lors d'une campagne d'échantillonnage sur le navire de recherche *Lampsilis*, pour établir des profils de contamination dans les différentes masses d'eau qui composent cet hydrosystème complexe. Il s'agit de la première étude à documenter les niveaux d'hormones et de BPA le long d'un gradient longitudinal du fleuve Saint-Laurent et ses affluents. Dans la section suivante (campagne d'échantillonnage #2), nous avons effectué une surveillance saisonnière des hormones stéroïdiennes et du bisphénol A dans la rivière des Mille-Îles (au nord de Laval, QC, Canada), une rivière fortement impactée par de multiples rejets urbains (ruissellement urbain, effluents de stations d'épurations situées en amont de la rivière et égouts unitaires).

Une série de 17 sites d'échantillonnage a été surveillée au cours de différentes saisons afin d'évaluer la distribution spatiale et les variations temporelles des concentrations d'hormones. Dans l'ensemble, ces dernières s'étendaient de 0,4 à 73 ng·L<sup>-1</sup> dans les échantillons en phase dissoute et de 0,1 à 228 ng·g<sup>-1</sup> dans les échantillons de matière particulaire en suspension. Aussi, nous avons constaté que le bisphénol A s'accumulait à des niveaux élevés dans les solides en suspension, la concentration la plus élevée correspondant à l'aval immédiat du point de rejet de la station d'épuration de Montréal. Pour les deux enquêtes, nous avons effectué une évaluation préliminaire du risque sur la vie aquatique en calculant les quotients de risque par rapport aux concentrations sans effets prévus (PNEC) et l'activité œstrogénique. L'estradiol ( $\beta$ -E2) a dépassé le seuil dans 28/137 échantillons, tandis que quelques rares dépassements ont également été notés pour l'éthinylestradiol (4/137 au-dessus de la PNEC). L'activité oestrogénique totale (EEQ<sub>total</sub>) était supérieure au seuil de 1 ng E2·L<sup>-1</sup> pour 26/137 échantillons, avec l'estriol (E3) et le  $\beta$ -E2 comme contributeurs prépondérants. Notre relevé saisonnier le long de la rivière des Mille Îles a également démontré des dépassements fréquents (41 %) de la PNEC pour le  $\beta$ -E2 et de 1,5% pour EE2. Quant au fleuve Saint-Laurent, son suivi longitudinal a montré des dépassements de PNEC pour 4,3% des échantillons (EE2). Ces résultats ont fourni une confirmation importante aux études antérieures qui ont observé des taux alarmants de féminisation chez les invertébrés aquatiques en cage dans la rivière des Mille Îles. Les nouvelles données contribuent aux efforts actuels pour mettre à jour les listes de contaminants émergents surveillés au Canada et ainsi vérifier le respect des directives de qualité environnementale.

Cette thèse rend compte de l'élaboration d'un ensemble de techniques analytiques des hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques ainsi que du bisphénol A dans un nombre de matrices environnementales conséquent. En améliorant les performances de techniques préexistantes, des limites de détection très faibles ont poussé l'analyse des contaminants émergents à l'état de trace plus loin encore. De tels niveaux permettent d'appréhender de manière plus exhaustive les risques environnementaux liés à la présence plus ou moins ubiquitaire de ces perturbateurs endocriniens tant dans des lieux susceptibles d'être contaminés que dans des lieux présumés exempts de toute contamination. L'étude de cours d'eau de premier plan comme le fleuve Saint-Laurent ou de cours d'eau secondaires tels que la Rivière des Mille-Îles a mis en exergue les niveaux de concentrations des différents

composés cibles et bien qu'inférieurs aux normes de qualité en vigueur, les effets chroniques à long terme restent toutefois préoccupants. C'est par ailleurs une perspective importante quant à l'avenir d'un projet tel que celui défendu dans cette thèse, à savoir le suivi saisonnier des perturbateurs endocriniens tels que les hormones stéroïdiennes dans différentes masses d'eau mais surtout le suivi de leur devenir environnemental. Ainsi, il sera plus aisé d'évaluer les risques pour l'environnement et la population à l'aide de techniques analytiques performantes telles que celles qui furent développés dans le cadre de ce doctorat.

## 6.2 Perspectives

Avec une population mondiale qui augmente d'année en année et une augmentation de l'exploitation animale constante, il est probable que la concentration des hormones stéroïdiennes dans l'environnement tendra à augmenter si rien n'est fait pour les éliminer des effluents d'eaux usées. Plusieurs défis de première importance seront donc à relever à l'image du traitement des eaux usées ou de l'eau potable. Les différentes méthodes analytiques développées et employées dans cette thèse ont permis d'atteindre des niveaux ultra-traces. La rapidité d'exécution, la sélectivité ainsi que la versatilité de ces méthodes en ont fait des outils de choix pour l'analyse des hormones stéroïdiennes et du BPA dans les matrices aqueuses environnementales. Toutefois, les limites de détections obtenues ne permirent pas d'atteindre les niveaux requis pour rencontrer les critères imposés par l'Union Européenne (ex : EE2 :  $0,035 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Avec la multiplicité des molécules de cette famille et celle plus large des perturbateurs endocriniens, il serait judicieux d'élargir la gamme d'analytes *a minima* avec d'autres bisphénols que le BPA ou dans une autre mesure, élargir cette gamme à certains composés prioritaires parmi d'autres familles de perturbateurs endocriniens telles que les phtalates, les alkylphénols, les pesticides, les composés perfluorés. Une méthode multi-résidus pharmaceutiques pourrait également être établie, qui inclurait outre les hormones stéroïdiennes, les produits pharmaceutiques tels que l'acétaminophène, l'ibuprofène, la carbamazépine, ou le diclofenac pour ne citer que quelques exemples, ou encore le nirmatrelvir/ritonavir qui est le principe actif du Paxlovid<sup>®</sup>, qui sera éventuellement utilisé à large échelle dans le cadre du traitement contre le SARS-CoV-2 ou COVID-19. Une ribambelle de techniques analytiques existe d'ores et déjà mais il est rare de voir autant de

classes de molécules être analysées simultanément à des niveaux aussi bas, dans de multiples matrices [272,460].

Au-delà du nombre d'analytes étudiés, il apparaît que l'étude saisonnière des contaminants émergents et plus particulièrement ici des hormones, revêt une importance capitale lorsque l'on souhaite comprendre le comportement de ces substances dans l'environnement. En effectuant un suivi plus approfondi (p. ex., échantillonnages haute-fréquence, zone géographique plus étendue), à l'image de ce qui a été entrepris dans le **Chapitre 5**, l'étude des effets à long terme et des effets chroniques serait facilitée. Pour ce faire, une amélioration des méthodes actuelles serait nécessaire pour atteindre notamment l'exigence de l'UE WFD pour la détection de l'EE2 dans les eaux de surface [112]. Il serait envisageable par exemple d'utiliser des volumes de chargement plus élevés (1-2 L) avec la cartouche SPE actuelle, en remplacement des volumes de 500 mL ou de 250 mL utilisés. Des formats de cartouche SPE avec une quantité plus élevée de phase stationnaire (par exemple, 500 mg) serait également possible. Pour favoriser la détection d'EE2, des conditions spécifiques pourraient être utilisées en lieu et place des conditions instrumentales sélectionnées comme compromis pour la détection des 15 EDC prioritaires selon l'US EPA. Les options incluent une composition de phase mobile différente et une analyse séparée des EDC en mode ion négatif, ce qui conduit à un nombre plus élevé de points par pics chromatographiques et à une sensibilité légèrement améliorée par rapport au réglage actuel de commutation de polarité [113]. L'analyse de EE2 en mode ion positif après SPE et dérivation, faisant intervenir par exemple le chlorure de dansyle, pourrait également conduire à une amélioration des limites de détection en LC-MS [61,114]. L'utilisation de méthodes basées sur la GC (après une dérivation appropriée) avec une instrumentation de dernière génération pourrait également aider à atteindre le degré élevé de sensibilité requis par la directive-cadre sur l'eau de l'UE. Toutes les options citées ci-dessus pourraient certainement conduire à une sensibilité améliorée, mais entraîneraient une réduction du débit de la méthode en raison du temps de chargement SPE plus long et de l'ajout d'une étape de dérivation chimique.

Afin d'évaluer le risque environnemental avec plus de finesse et de ne pas se limiter à des prises d'échantillons ponctuelles, il serait important de mener des campagnes



d'échantillonnage sur une base plus régulière à une fréquence plus élevée. Il serait intéressant de réaliser le même type de campagne saisonnière sur un cours d'eau tel que la Rivière des Mille-Iles en collectant des échantillons tous les mois, toutes les semaines voire tous les jours. Il serait également envisageable d'utiliser des échantillonneurs passifs tels que les POCIS (*polar organic chemical integrative sampler*) qui permettent de collecter les analytes sur des périodes beaucoup plus longues (typiquement 1 à 3 semaines) en adsorbant les analytes sur une phase stationnaire de type Oasis HLB par exemple. Toutefois, ce type de suivi représente un défi important en termes de logistique et de coût qu'il est parfois difficile à relever.

Avec l'avènement de nouveaux appareils de spectrométrie de masse à haute résolution plus sensibles et la démocratisation du processus de *data mining*, l'analyse non ciblée d'échantillons environnementaux pourrait être facilitée. Ces analyses permettent d'envisager la recherche et la détection de produits de sous-dégradation ou de métabolites de molécules mères encore inconnus. Cela ouvrirait la porte à une compréhension poussée du devenir environnemental de tels composés et permettrait de découvrir éventuellement de nouvelles voies de dégradation de ces contaminants émergents organiques dans l'environnement. À mesure que de nouveaux composés seraient découverts, l'évaluation du risque environnemental qu'ils représentent, serait également accessible aidant ainsi à une appréciation accrue des interactions contaminants-organismes.

Aussi, l'analyse des hormones stéroïdiennes et des bisphénols dans les matrices environnementales, à l'instar des autres contaminants organiques naturels ou synthétiques est un domaine en perpétuelle évolution. Chaque année, de nouvelles molécules sont mises sur le marché et sont susceptibles d'être déversées dans l'environnement, parfois avec des effets sur le système endocrinien. Chaque molécule qui apparaît suggère une méthode analytique adaptée qui permet d'évaluer sa présence dans l'environnement, et de décider de la nécessité de conduire des tests écotoxicologiques plus approfondis. Le perfectionnement et la sophistication des techniques et méthodes analytiques reste donc un prérequis nécessaire à l'évaluation du risque environnemental.

Enfin, l'ensemble de ces travaux visait à améliorer l'évaluation des niveaux de concentrations dans la grande région de Montréal dans le but de suivre l'évolution et les améliorations des traitements de l'eau potable et des eaux usées. En effet, avec la construction

d'un nouveau bassin d'ozonation prévu à l'horizon 2025, de nouveaux défis seront à relever et de nouveaux suivis seront nécessaires. Actuellement, la station J.R Marcotte de Montréal (1987) est dotée d'un système de traitement primaire (physique) qui repose sur la réduction des matières en suspension par floculation/coagulation. Ce traitement bien qu'efficace d'un point de vue physico-chimique ne permet pas de dégrader les molécules organiques telles que les pesticides, les produits pharmaceutiques et bien entendu, les hormones.

L'ozonation a été envisagée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cette méthode permet de désinfecter de façon plus efficace les eaux usées comparativement à un traitement aux U.V. Aussi, l'ozonation permet une très bonne oxygénation de l'eau et enfin, elle rend possible l'oxydation d'un grand nombre de composés organiques, en particulier ceux possédant des insaturations riches en électrons (alcènes, alcynes, phénols, etc.) sensibles à l'oxydation [544]. En effet, l'ozone ( $O_3$ ) est réputé pour ses qualités d'oxydant puissant. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré l'efficacité de cet élément en présentant des taux d'abattement allant respectivement de plus de 61% à plus de 95% pour le  $\beta$ -E2 et pour le BPA [545,546]. Les avantages d'un tel traitement seraient indiscutables si plusieurs limites ne se présentaient pas rapidement. Si les molécules initiales sont dégradées par l'action de l'ozone, les produits de sous-dégradation sont dans leur quasi-intégralité inconnus. Se pose alors un problème majeur : ces produits sont-ils plus toxiques que les molécules initiales? Plusieurs études se sont penchées sur cette question et il apparaît très clairement que la réponse est oui pour certains composés. Bien que les études ne s'entendent pas toutes sur les effets des sous-produits de dégradation, il est possible de noter un retard dans le passage du stade larvaire au stade de juvénile chez certains poissons. Dans des études traitant de la génotoxicité et de la mutagénicité, la formation de sous-produits d'oxydation tels que les cétones ou les aldéhydes s'est accompagnée d'une toxicité accrue [547,548].

Afin, de diminuer ces impacts et la formation de sous-produits toxiques, la littérature suggère d'agrémenter l'ozonation d'un post-traitement (sable, poudre de charbon activée) [548,549]. Il est à noter que le temps de résidence dans le bassin d'ozonation influence la quantité de sous-produits relargués dans l'environnement [550]. De futures études permettraient d'apprécier la performance de tels systèmes et leur applicabilité de grandes structures telles que les stations de traitement des eaux usées.

Avec un nouveau procédé de traitement des eaux usées qui sera mis en place dans les prochaines années, le développement de techniques analytiques sensibles et polyvalentes est une nécessité. Permettre à des municipalités comme Montréal d'effectuer des suivis réguliers et les plus exhaustifs possibles représente un intérêt majeur quant aux politiques de santé publique à mener et aux innovations à apporter aux systèmes de traitement parfois vieillissants et obsolètes. Avec l'ozonation, le développement de techniques analytiques à haute résolution permettant la recherche et l'identification d'analytes non-ciblés deviendra indispensable pour évaluer de manière plus fine le risque environnemental et les recherches menées dans cet ouvrage pourraient en être le point de départ.

## 7. Références

- [1] R. Carson, *Silent spring*, Houghton Mifflin Harcourt, 1962.
- [2] R. Mariane, D. Souza, D. Seibert, H. Beatriz, F. De Jesus, M.R. Fagundes-klen, R. Bergamasco, Occurrence , impacts and general aspects of pesticides in surface water : A review, *Process Saf. Environ. Prot.* 135 (2020) 22–37. doi:10.1016/j.psep.2019.12.035.
- [3] A. Sadowski, A. Baer-nawrocka, Land Use Policy Food and environmental function in world agriculture — Interdependence or competition ?, *Land Use Policy.* 71 (2018) 578–583. doi:10.1016/j.landusepol.2017.11.005.
- [4] M. Grung, Y. Lin, H. Zhang, A. Orderdalen, J. Huang, G. Zhang, T. Larssen, Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China — A review, *Environ. Int.* 81 (2015) 87–97. doi:10.1016/j.envint.2015.04.013.
- [5] L.P. Belzunces, S. Tchamitchian, J.-L. Brunet, Neural effects of insecticides in the honey bee, *Apidologie.* 43 (2012) 348–370. doi:10.1007/s13592-012-0134-0.
- [6] F.A. Caliman, M. Gavrilesco, F.A. Caliman, M. Gavrilesco, G.A.T. Univer-, E. Protec-, Review Pharmaceuticals , Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review, *Clean.* 37 (2009) 277–303. doi:10.1002/clen.200900038.
- [7] D. Montes-grajales, M. Fennix-agudelo, W. Miranda-castro, Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources : A review, *Sci. Total Environ.* 595 (2017) 601–614. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.286.
- [8] A.B. Lindstrom, M.J. Strynar, E.L. Libelo, Polyfluorinated Compounds : Past , Present , and Future, *Environ. Sci. Technol.* (2011). doi:10.1021/es2011622.
- [9] E. Pignotti, M. Farré, D. Barceló, E. Dinelli, Occurrence and distribution of six selected endocrine disrupting compounds in surface- and groundwaters of the Romagna area, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 21153–21167.

doi:10.1007/s11356-017-9756-0.

- [10] N. Schmidt, V. Fauvelle, J. Castro-jiménez, K. Lajaunie-salla, C. Pinazo, C. Yohia, R. Sempéré, Occurrence of perfluoroalkyl substances in the Bay of Marseille ( NW Mediterranean Sea ) and the Rhône River, *Mar. Pollut. Bull.* 149 (2019) 110491. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110491.
- [11] T.J. Mcgrath, A.S. Ball, B.O. Clarke, Critical review of soil contamination by polybrominated diphenyl ethers ( PBDEs ) and novel brominated flame retardants ( NBFRs ); concentrations , sources and congener profiles \*, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 741–757. doi:10.1016/j.envpol.2017.07.009.
- [12] L. Jinhui, C. Yuan, X. Wenjing, Polybrominated diphenyl ethers in articles : a review of its applications and legislation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 4312–4321. doi:10.1007/s11356-015-4515-6.
- [13] A. Covaci, S. Harrad, M.A. Abdallah, N. Ali, R.J. Law, D. Herzke, C.A. De Wit, Novel brominated flame retardants : A review of their analysis , environmental fate and behaviour, *Environ. Int.* 37 (2020) 532–556. doi:10.1016/j.envint.2010.11.007.
- [14] P. Xiong, X. Yan, Q. Zhu, G. Qu, J. Shi, C. Liao, G. Jiang, A Review of Environmental Occurrence , Fate , and Toxicity of Novel Brominated Flame Retardants, *Environ. Sci. Technol.* (2019). doi:10.1021/acs.est.9b03159.
- [15] H.M. Pickard, A.S. Criscitiello, C. Spencer, M.J. Sharp, D.C.G. Muir, A.O. De Silva, C.J. Young, Continuous non-marine inputs of per- and polyfluoroalkyl substances to the High Arctic : a multi-decadal temporal record, *Atmos. Chem. Phys.* 18 (2018) 5045–5058. doi.org/10.5194/acp-18-5045-2018
- [16] K.M. Stroski, K. Hoang, J.K. Challis, L.G. Chaves-barquero, M.L. Hanson, C.S. Wong, Science of the Total Environment Wastewater sources of per- and polyfluorinated alkyl substances ( PFAS ) and pharmaceuticals in four Canadian Arctic communities, *Sci. Total Environ.* 708 (2020) 134494. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134494.
- [17] L.H. Keith, Recent advances in the identification and analysis of organic pollutants in

- water, *Life Sci.* 19 (1976) 1631–1635. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90067-9)
- [18] N.D. Bedding, A.E. McIntyre, R. Perry, J.N. Lester, Organic contaminants in the aquatic environment I. Sources and occurrence, *Sci. Total Environ.* 25 (1982) 143–167. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(82\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(82)90083-3)
- [19] J. de Boer, Persistent organic pollutant analysis—what level of sensitivity and selectivity do we need?, *Environ. Anal.* (2010). <https://doi.org/10.3390/ijerph16224361>
- [20] R. Silva, C. Leite, S. Vilela, Water contamination by endocrine disruptors : Impacts , microbiological aspects and trends for environmental protection \*, *Environ. Pollut.* 235 (2018) 546–559. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.098.
- [21] M. Chen, K. Ohman, C. Metcalfe, M.G. Ikonomou, P.L. Amaty, J. Wilson, Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in Wastewater Treatment Effluents and in the Water Supply System, *Water Qual. Res. J. Canada.* 41 (2006) 351–364. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2006.039>
- [22] R. Münze, C. Hannemann, P. Orlinskiy, R. Gunold, A. Paschke, K. Foit, J. Becker, O. Kaske, E. Paulsson, M. Peterson, H. Jernstedt, J. Kreuger, G. Schüürmann, M. Liess, Science of the Total Environment Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities, *Sci. Total Environ.* 599–600 (2017) 387–399. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.008.
- [23] A.Y. Lin, S.C. Panchangam, Occurrence of perfluorinated compounds in the aquatic environment as found in science park effluent , river water , rainwater , sediments , and biotissues, *Environ. Monit. Assess.* (2014) 3265–3275. doi:10.1007/s10661-014-3617-9.
- [24] S. Sauvé, M. Desrosiers, A review of what is an emerging contaminant, *Chem. Cent. J.* (2014) 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- [25] J. Wilkinson, P.S. Hooda, J. Barker, S. Barton, J. Swinden, Occurrence , fate and transformation of emerging contaminants in water : An overarching review of the fi

- eld \*, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 954–970. doi:10.1016/j.envpol.2017.08.032.
- [26] D.C.G. Muir, P.H. Howard, Are There Other Persistent Organic Pollutants? A Challenge for Environmental Chemists †, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7157–7166. doi:10.1021/es061677a.
- [27] D.C.G. Muir, P.H. Howard, Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2277–2285. doi:10.1021/es903383a.
- [28] C.J. Houtman, Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe, *J. Integr. Environ. Sci.* 8168 (2010). doi:10.1080/1943815X.2010.511648.
- [29] P.H. Howard, D.C.G. Muir, Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce II: Pharmaceuticals, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6938–6946. doi:10.1021/es201196x.
- [30] X. Zhang, R.A. Di, P.A. Helm, E.J. Reiner, P.H. Howard, D.C.G. Muir, J.G. Sled, K.J. Jobst, Compositional space : A guide for environmental chemists on the identification of persistent and bioaccumulative organics using mass spectrometry, *Environ. Int.* 132 (2019) 104808. doi:10.1016/j.envint.2019.05.002.
- [31] P.H. Howard, D.C.G. Muir, Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce. III: Byproducts, Impurities, and Transformation Products, *Environ. Sci. Technol.* (2013) 5259–5266. doi:10.1021/es4004075.
- [32] N. Elfikrie, Y. Bin Ho, S. Zulfa Zaidon, H. Juahir, E.S.S. Sin, Occurrence of pesticides in surface water , pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers in Tengi River Basin , Malaysia, *Sci. Total Environ.* 712 (2020). doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136540.
- [33] Y. Shiwaku, P. Lee, P. Thepaksorn, B. Zheng, A. Koizumi, K.H. Harada, Spatial and temporal trends in perfluorooctanoic and perfluorohexanoic acid in well , surface , and tap water around a fluoropolymer plant in Osaka , Japan, *Chemosphere.* 164 (2016) 603–610. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.006.

- [34] M. Celic, B.D. Skrbic, S. Insa, J. Zivancev, M. Petrovic, Occurrence and assessment of environmental risks of endocrine disrupting compounds in drinking , surface and wastewaters in Serbia, *Environ. Pollut.* 262 (2020). doi:10.1016/j.envpol.2020.114344.
- [35] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, J. Gan, Chiral pharmaceuticals : A review on their environmental occurrence and fate processes, *Water Res.* 124 (2017) 527–542. doi:10.1016/j.watres.2017.08.003.
- [36] Y. Hu, X. Yan, Y. Shen, M. Di, J. Wang, Occurrence , behavior and risk assessment of estrogens in surface water and sediments from Hanjiang River , Central China, *Ecotoxicology.* (2019) 143–153. doi:10.1007/s10646-018-2007-4.
- [37] S.M. Havens, C.J. Hedman, J.D.C. Hemming, M.G. Mieritz, M.M. Shafer, J.J. Schauer, Science of the Total Environment Occurrence of estrogens , androgens and progestogens and estrogenic activity in surface water runoff from beef and dairy manure amended crop fi elds, *Sci. Total Environ.* 710 (2020) 136247. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136247.
- [38] J. Gong, D. Duan, Y. Yang, Y. Ran, D. Chen, Seasonal variation and partitioning of endocrine disrupting chemicals in waters and sediments of the Pearl River system , South China \*, *Environ. Pollut.* 219 (2016) 735–741. doi:10.1016/j.envpol.2016.07.015.
- [39] M. Williams, R.S. Kookana, A. Mehta, S.K. Yadav, B.L. Tailor, B. Maheshwari, Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre, *Sci. Total Environ.* 647 (2019) 1256–1265. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.084.
- [40] P. Westlund, V. Yargeau, Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater ef fl uent using yeast-based bioassays, *Sci. Total Environ.* 607–608 (2017) 744–751. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.032.
- [41] J. Wang, S. Wang, Removal of pharmaceuticals and personal care products ( PPCPs ) from wastewater : A review, *J. Environ. Manage.* 182 (2016) 620–640. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.049.



- [42] W.W. Lai, Y. Lin, H. Tung, S. Lo, A.Y. Lin, Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen, *Emerg. Contam.* 2 (2016) 135–144. doi:10.1016/j.emcon.2016.05.001.
- [43] A. Gogoi, P. Mazumder, V. Kumar, G.G.T. Chaminda, A. Kyoungjin, M. Kumar, Groundwater for Sustainable Development Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment : A review, *Groundw. Sustain. Dev.* 6 (2018) 169–180. doi:10.1016/j.gsd.2017.12.009.
- [44] A. Pal, Y. He, M. Jekel, M. Reinhard, K.Y. Gin, Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle Untreated water Sewer system, *Environ. Int.* 71 (2014) 46–62. doi:10.1016/j.envint.2014.05.025.
- [45] R. Naidu, V. Andres, A. Espana, Y. Liu, J. Jit, Emerging contaminants in the environment : Risk-based analysis for better management, *Chemosphere.* 154 (2016) 350–357. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.068.
- [46] M. Oliver, M. Wiczerzak, S. Reis, A.C. Lima, M.A. Segundo, M. Miró, Ecotoxicological equilibria of triclosan in Microtox , XenoScreen YES / YAS , Caco2 , HEPG2 and liposomal systems are affected by the occurrence of other pharmaceutical and personal care emerging contaminants, *Sci. Total Environ.* 719 (2020). doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137358.
- [47] E.R. Kabir, M.S. Rahman, I. Rahman, A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (2015) 241–258. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009.
- [48] E. Diamanti-kandarakis, J. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, Endocrine-Disrupting Chemicals : An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342. doi:10.1210/er.2009-0002.
- [49] F.A. Caliman, M. Gavriescu, F.A. Caliman, M. Gavriescu, G.A.T. Univer-, E. Protec-, Pharmaceuticals , Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review, *Clean.* 37 (2009) 277–303.

doi:10.1002/clen.200900038.

- [50] L.N. Vandenberg, T. Colborn, T.B. Hayes, J.J. Heindel, D.R. Jacobs Jr, D.-H. Lee, T. Shioda, A.M. Soto, F.S. vom Saal, W. V Welshons, Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses, *Endocr. Rev.* 33 (2012) 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- [51] T. Colborn, C. Clement, *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*, Princeton Scientific Pub. Co., 1992.
- [52] T. Colborn, F.S. Vom Saal, A.M. Soto, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans., *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 378–384.
- [53] M.S. Marty, E.W. Carney, J.C. Rowlands, *Endocrine Disruption: Historical Perspectives and Its Impact on the Future of Toxicology Testing*, *Toxicol. Sci.* 120 (2011) 93–108. doi:10.1093/toxsci/kfq329.
- [54] C. Barrios-estrada, M.D.J. Rostro-alanis, B.D. Muñoz-gutiérrez, M.N. Iqbal, S. Kannan, R. Parra-saldívar, Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review, *Sci. Total Environ.* 612 (2018) 1516–1531. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.013.
- [55] E. Somm, A. Toulotte, C.R. Cederroth, C. Combescure, S. Nef, M.L. Aubert, P.S. Hüppi, Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1549–1555. doi:10.1289/ehp.11342.
- [56] N.J. Cabaton, C. Canlet, P.R. Wadia, M. Tremblay-Franco, R. Gautier, J. Molina, C. Sonnenschein, J.-P. Cravedi, B.S. Rubin, A.M. Soto, D. Zalko, Effects of Low Doses of Bisphenol A on the Metabolome of, *Environ. Health Perspect.* (2013) 586–593. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205588>
- [57] K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick, Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 8897–8901. doi:10.1073/pnas.0609568104.
- [58] W.M. Howell, D.A. Black, S.A. Bortone, Abnormal Expression of Secondary Sex Characters in a Population of Mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for

Environmentally-Induced Masculinization, *Copeia*. 1980 (1980) 676–681.  
doi:10.2307/1444443.

- [59] T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers, *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival?--a Scientific Detective Story*, (1996).
- [60] M.A. Haegele, R.H. Hudson, Reduction of courtship behavior induced by DDE in male ringed turtle doves, *Wilson Bull.* (1977) 593–601.
- [61] J.P. McCarty, A.L. Secord, Nest-building behavior in PCB-contaminated tree swallows, *Auk*. 116 (1999) 55–63. <https://doi.org/10.2307/4089453>
- [62] J.P. McCarty, A.L. Secord, Reproductive ecology of tree swallows (*Tachycineta bicolor*) with high levels of polychlorinated biphenyl contamination, *Environ. Toxicol. Chem. An Int. J.* 18 (1999) 1433–1439. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180713>
- [63] J. Oehlmann, U. Schulte-Oehlmann, M. Tillmann, B. Markert, Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylphenol as Xeno-Estrogens, *Ecotoxicology*. 9 (2000) 383–397. doi:10.1023/A:1008972518019.
- [64] J.G. Vos, E. Dybing, H.A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambré, J. V Tarazona, I. Brandt, A.D. Vethaak, Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation, *Crit. Rev. Toxicol.* 30 (2000) 71–133. doi:10.1080/10408440091159176.
- [65] H.B. Daly, Reward reductions found more aversive by rats fed environmentally contaminated salmon, *Neurotoxicol. Teratol.* 13 (1991) 449–453. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90094-D](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90094-D)
- [66] H.B. Daly, The evaluation of behavioral changes produced by consumption of environmentally contaminated fish, *Vulnerable Brain Environ. Risks* (Isaacson RL, Jensen KF, Eds). 1 (1992) 151–170.
- [67] S.A. Ferguson, K.M. Flynn, K.B. Delclos, R.R. Newbold, Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure, *Neurotoxicol. Teratol.* 22 (2000) 583–591. <https://doi.org/10.1016/S0892->

- [68] S.I. Sideroff, J.A. Santolucito, Behavioral and physiological effects of the cholinesterase inhibitor carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate), *Physiol. Behav.* 9 (1972) 459–462. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90175-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90175-8)
- [69] L.E. Gray Jr, J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott, J. Laskey, A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat, *Toxicol. Sci.* 12 (1989) 92–108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/12.1.92>
- [70] J. Ostby, R.L. Cooper, W.R. Kelce, L.E. Gray Jr, The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats, *Toxicol. Ind. Health.* 15 (1999) 37–47. <https://doi.org/10.1177/074823379901500105>
- [71] S.M. Zala, D.J. Penn, Abnormal behaviours induced by chemical pollution : a review of the evidence and new challenges, *Anim. Behav.* (2004) 649–664. doi:10.1016/j.anbehav.2004.01.005.
- [72] A.C. Gore, D. Crews, L.L. Doan, M. La Merrill, H. Patisaul, A. Zota, Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs), *Endocr. Soc.* (2014) 21–22.
- [73] L. Barr, G. Metaxas, C.A.J. Harbach, L.A. Savoy, P.D. Darbre, Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum, *J. Appl. Toxicol.* (2012) 219–232. doi:10.1002/jat.1786.
- [74] R.H. Gee, A. Charles, N. Taylor, P.D. Darbre, Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells, *J. Appl. Toxicol.* (2008) 78–91. doi:10.1002/jat.
- [75] C.F. Elaine Maria, P.M. Spritzer, A. Hohl, T.A.S.S. Bachega, Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* (2014) 153–161. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000003031>
- [76] T. Takeuchi, O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai, Y. Taketani, Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction, *Endocr. J.* 51 (2004) 165–169.

<https://doi.org/10.1507/endocrj.51.165>

- [77] E. Kandaraki, A. Chatzigeorgiou, S. Livadas, E. Palioura, F. Economou, M. Koutsilieris, S. Palimeri, D. Panidis, E. Diamanti-Kandarakis, Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) E480–E484. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1658>
- [78] P. Fechner, P. Damdimopoulou, G. Gauglitz, Biosensors Paving the Way to Understanding the Interaction between Cadmium and the Estrogen Receptor Alpha, *PLoS One.* 6 (2011) e23048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023048>.
- [79] J. Santodonato, Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity, *Chemosphere.* 34 (1997) 835–848. doi:[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00012-X).
- [80] N.-E. Skakkebaek, R.-D. Meyts, K.M. Main, Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion, *Hum. Reprod.* 16 (2001) 972–978. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2001.tb05770.x>
- [81] S. Irvine, E. Cawood, D. Richardson, E. MacDonald, J. Aitken, Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years, *Bmj.* 312 (1996) 467–471. doi:<https://doi.org/10.1136/bmj.312.7029.467>
- [82] K. Van Waeleghem, N. De Clercq, L. Vermeulen, F. Schoonjans, F. Comhaire, Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men, *Hum. Reprod.* 11 (1996) 325–329. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/11.2.325>
- [83] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years., *Br. Med. J.* 305 (1992) 609 LP – 613. doi:[10.1136/bmj.305.6854.609](https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609).
- [84] D.A. Adamopoulos, A. Pappa, S. Nicopoulou, E. Andreou, M. Karamertzanis, J. Michopoulos, V. Deligianni, M. Simou, *Andrology: Seminal volume and total sperm*

number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977–1993, *Hum. Reprod.* 11 (1996) 1936–1941. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019520.

- [85] N. Itoh, F. Kayama, J. Tatsuki, T. Tsukamoto, Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy, young Japanese men? Results from the Sapporo area, *J. Androl.* 22 (2001) 40–44. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02151.x>
- [86] I. Tortolero, G. Bellabarba Arata, R. Lozano, C. Bellabarba, I. Cruz, J.A. Osuna, Semen analysis in men from Merida, Venezuela, over a 15-year period, *Arch. Androl.* 42 (1999) 29–34. <https://doi.org/10.1080/014850199263011>
- [87] P.E. Rasmussen, K. Erb, L.G. Westergaard, S.B. Laursen, No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1,055 Danish men born between 1950 and 1970, *Fertil. Steril.* 68 (1997) 1059–1064. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00377-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00377-4)
- [88] N. Jørgensen, A.-G. Andersen, F. Eustache, D.S. Irvine, J. Suominen, J.H. Petersen, A.N. Andersen, J. Auger, E.H.H. Cawood, A. Horte, Regional differences in semen quality in Europe, *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1012–1019. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.1012>
- [89] S. Rehman, Z. Usman, S. Rehman, M. Aldraihem, N. Rehman, G. Ahmad, Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health, *Transl. Androl. Urol.* 7 (2018) 490–503. doi:10.21037/tau.2018.05.17.
- [90] H.A. Jeng, Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Male Reproductive Health, *Front. Public Heal.* 2 (2014) 1–12. doi:10.3389/fpubh.2014.00055.
- [91] R.M. Sharpe, N.E. Skakkebaek, Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet.* 341 (1993) 1392–1396. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E)
- [92] F.H. Comhaire, A.M.A. Mahmoud, F. Schoonjans, Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium), *Reprod. Toxicol.* 23 (2007) 133–137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.001>.
- [93] K. Bay, C. Asklund, N.E. Skakkebaek, A.-M. Andersson, Testicular dysgenesis

- syndrome: possible role of endocrine disrupters, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20 (2006) 77–90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.004>.
- [94] P. Nicolopoulou-Stamati, M.A. Pitsos, The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system, *Hum. Reprod. Update.* 7 (2001) 323–330. doi:[10.1093/humupd/7.3.323](https://doi.org/10.1093/humupd/7.3.323).
- [95] T.R. Zoeller, Environmental chemicals targeting thyroid, *Hormones.* 9 (2010) 28–40. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1250>
- [96] P. Abraham, A. Avenell, C.M. Park, W.A. Watson, J.S. Bevan, A systematic review of drug therapy for Graves' hyperthyroidism, *Eur. J. Endocrinol.* 153 (2005) 489–498. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01993>
- [97] R. Anand-Ivell, K. Crofton, R. Ivell, J. Köhrle, A. Kortenkamp, Panel discussion [of paper: Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures], *Int. J. Androl.* 31 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00857.x>
- [98] P.W. Ladenson, P.A. Singer, K.B. Ain, N. Bagchi, S.T. Bigos, E.G. Levy, S.A. Smith, G.H. Daniels, American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction, *Arch. Intern. Med.* 160 (2000) 1573–1575. doi:[10.1001/archinte.160.11.1573](https://doi.org/10.1001/archinte.160.11.1573)
- [99] R.M. McClain, Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 333 (1995) 131–142. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00139-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00139-5)
- [100] A.J. Klecha, M.L.B. Arcos, L. Frick, A.M. Genaro, G. Cremaschi, Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases, *Neuroimmunomodulation.* 15 (2008) 68–75. <https://doi.org/10.1159/000135626>
- [101] S.H. Safe, Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 346–351.
- [102] E.H. Starling, The Chemical Correlation of the Functions of the Body, *Lancet.* (1905) 423–425. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103346>

- [103] A. Butenandt, G. Hanisch, Über die Umwandlung des Dehydro-androsterons in  $\Delta^4$ -Androsten-ol-(17)-0n-(3) (Testosteron); ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin (Vorläuf. Mitteil.), *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.* 68 (1935) 1859–1862. doi:10.1002/cber.19350680937.
- [104] M. Dhont, History of oral contraception, *Eur. J. Contracept. Reprod. Heal. Care.* 15 (2010) S12–S18. doi:10.3109/13625187.2010.513071.
- [105] S.W. Junod, L. Marks, Women's Trials: The Approval of the First Oral Contraceptive Pill in the United States and Great Britain, *J. Hist. Med. Allied Sci.* 57 (2002) 117–160. doi:10.1093/jhmas/57.2.117.
- [106] E.W. Sutherland, Studies on the Mechanism of Hormone Action, *Science* (80-. ). 177 (1972) 401–408. <http://www.jstor.org/stable/1734699>. DOI: 10.1126/science.177.4047.401
- [107] J.R. Tata, One hundred years of hormones, *EMBO Rep.* 6 (2005) 490–496. doi:10.1038/sj.embor.7400444.
- [108] A.P. Dianin, Condensation of ketones with phenols, *Z. Russ. Fiz. Obs.* 23 (1891) 492.
- [109] A.Y. Hammad, F.M. Awad, W.S.A. Abdelgadir, Determination amount of bisphenol A in drugs and water drinking container in Khartoum State, Sudan, *Int. J. Nutr. Food Sci.* 4 (2015) 609.
- [110] E.C. Dodds, W. Lawson, Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus, *Nature.* 137 (1936) 996. <https://doi.org/10.1038/137996a0>
- [111] A.W. Norman, G. Litwack, *Hormones*, Academic Press, 1997. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-11247-0>
- [112] M. Häggström, D. Richfield, Diagram of the pathways of human steroidogenesis, *WikiJournal Med.* 1 (2014). doi: 10.15347/wjm/2014.005
- [113] H. Fiege, H. Voges, T. Hamamoto, S. Umemura, T. Iwata, H. Miki, Y. Fujita, H. Buysch, D. Garbe, W. Paulus, Phenol Derivatives, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* 26 (2012) 521–581. doi:10.1002/14356007.a19.



- [114] C. Djerassi, Chemical birth of the pill, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (2006) 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.010>
- [115] S. Christin-Maitre, History of oral contraceptive drugs and their use worldwide, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27 (2013) 3–12. doi:10.1016/j.beem.2012.11.004.
- [116] L. Viglino, K. Aboulfadl, M. Prévost, S. Sauvé, Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS, *Talanta.* 76 (2008) 1088–1096. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.008.
- [117] Z. Tang, Z. Liu, H. Wang, Z. Dang, H. Yin, Y. Zhou, Y. Liu, Trace determination of eleven natural estrogens and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant and river water, *Water Res.* 182 (2020) 115976. doi:10.1016/j.watres.2020.115976.
- [118] Z. Fan, J. Hu, W. An, M. Yang, Detection and Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A, Nonylphenol, and Estrogens in Drinking Water of China: Comparison to the Parent Compounds, *Environ. Sci. Technol.* (2013). doi:10.1021/es401504a.
- [119] H. Fiege, H. Voges, T. Hamamoto, S. Umemura, T. Iwata, H. Miki, Y. Fujita, H. Buysch, D. Garbe, W. Paulus, Phenol derivatives, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* (2000). [https://doi.org/10.1002/14356007.a19\\_313](https://doi.org/10.1002/14356007.a19_313)
- [120] K. Kelland, Experts demand European action on plastics chemical, Thomson Reuters, Released Jun. (2010).
- [121] R.E. Chapin, J. Adams, K. Boekelheide, L.E. Gray Jr, S.W. Hayward, P.S.J. Lees, B.S. McIntyre, K.M. Portier, T.M. Schnorr, S.G. Selevan, NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A, *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 83 (2008) 157–395.
- [122] V.A. Santhi, N. Sakai, E.D. Ahmad, A.M. Mustafa, Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water, *Sci. Total Environ.* 427 (2012) 332–338.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.041>

- [123] L.D. Nghiem, A. Manis, K. Soldenhoff, A.I. Schäfer, Estrogenic hormone removal from wastewater using NF / RO membranes, *J. Memb. Sci.* 242 (2004) 37–45. doi:10.1016/j.memsci.2003.12.034.
- [124] S.L. Klosterhaus, R. Grace, M.C. Hamilton, D. Yee, Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary, *Environ. Int.* 54 (2013) 92–99. doi:10.1016/j.envint.2013.01.009.
- [125] Z. Liu, Y. Kanjo, S. Mizutani, Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds ( EDCs ) in wastewater treatment — physical means , biodegradation , and chemical advanced oxidation : A review, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 731–748. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.039.
- [126] K.M. Lai, M.D. Scrimshaw, J.N.U. Lester, Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems, *Sci. Total Environ.* (2002). [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01036-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01036-1)
- [127] P.B. Fayad, Analyse par spectrométrie de masse d’hormones stéroïdiennes dans les eaux usées et abattement par oxydation chimique, 2013. <http://hdl.handle.net/1866/11187>
- [128] K.M. Lai, K.L. Johnson, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3890–3894. doi:10.1021/es9912729.
- [129] X. Bai, F.X.M. Casey, H. Hakk, T.M. DeSutter, P.G. Oduor, E. Khan, Sorption and degradation of 17 $\beta$ -estradiol-17-sulfate in sterilized soil–water systems, *Chemosphere.* 119 (2015) 1322–1328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.016>.
- [130] A.C. Johnson, R.J. Williams, P. Matthiessen, The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study, *Sci. Total Environ.* 362 (2006) 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.014>

- [131] H. Zhang, J. Shi, X. Liu, X. Zhan, Q. Chen, Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China, *Water Res.* 58 (2014) 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.074>
- [132] G.L. Cromwell, T.S. Stahly, R.D. Coffey, H.J. Monegue, J.H. Randolph, Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs, *J. Anim. Sci.* 71 (1993) 1831–1840. doi:10.2527/1993.7171831x.
- [133] L.S. Shore, M. Shemesh, Naturally produced steroid hormones and their release into the environment, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1859–1871. doi:<https://doi.org/10.1351/pac200375111859>.
- [134] Q. Zhang, J.-L. Zhao, G.-G. Ying, Y.-S. Liu, C.-G. Pan, Emission Estimation and Multimedia Fate Modeling of Seven Steroids at the River Basin Scale in China, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7982–7992. doi:10.1021/es501226h.
- [135] S. Biswas, C.A. Shapiro, W.L. Kranz, T.L. Mader, D.P. Shelton, D.D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, D.D. Tarkalson, S.J. van Donk, T.C. Zhang, S. Ensley, Current knowledge on the environmental fate, potential impact, and management of growth-promoting steroids used in the US beef cattle industry, *J. Soil Water Conserv.* 68 (2013) 325 LP – 336. doi:10.2489/jswc.68.4.325.
- [136] J. Liu, G. Lu, Z. Xie, Z. Zhang, S. Li, Z. Yan, Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants, *Sci. Total Environ.* 511 (2015) 54–62. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.033.
- [137] J.A. Arnot, F.A.P.C. Gobas, A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms, *Environ. Rev.* 14 (2006) 257–297. doi:10.1139/A06-005.
- [138] D.R. Griffith, M.C. Kido Soule, H. Matsufuji, T.I. Eglinton, E.B. Kujawinski, P.M. Gschwend, Measuring free, conjugated, and halogenated estrogens in secondary treated wastewater effluent, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2569–2578. doi:10.1021/es402809u

- [139] D. Martinovic-Weigelt, T.A. Minarik, E.M. Curran, J.S. Marchuk, M.J. Pazderka, E.A. Smith, R.L. Goldenstein, C.L. Miresse, T.J. Matlon, M.M. Schultz, H.L. Schoenfuss, Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: I. Spatial and temporal occurrence of estrogenic activity in effluent-dominated systems, *Environ. Int.* 61 (2013) 127–137. doi:10.1016/j.envint.2013.07.018.
- [140] X. Zhao, K.L. Grimes, L.M. Colosi, W. Lung, Attenuation, transport, and management of estrogens: A review, *Chemosphere*. 230 (2019) 462–478. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.086.
- [141] M. Gorga, S. Insa, M. Petrovic, D. Barceló, Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers, *Sci. Total Environ.* 503 (2015) 69–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.037>
- [142] H. Hamid, C. Eskicioglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Res.* 46 (2012) 5813–5833. doi:10.1016/j.watres.2012.08.002.
- [143] A.Z. Aris, A.S. Shamsuddin, S.M. Praveena, Occurrence of 17  $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review, *Environ. Int.* 69 (2014) 104–119. doi:10.1016/j.envint.2014.04.011.
- [144] M.S. Colucci, H. Bork, E. Topp, Persistence of Estrogenic Hormones in Agricultural Soils: I. 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone, *J. Environ. Qual.* 30 (2001) 2070–2076. doi:10.2134/jeq2001.2070.
- [145] S.D. Lucas, D.L. Jones, Biodegradation of estrone and 17  $\beta$ -estradiol in grassland soils amended with animal wastes, *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 2803–2815. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.033>
- [146] Q. Cao, Q. Yu, D.W. Connell, Fate simulation and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in a reservoir receiving recycled wastewater, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 6243–6250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.059>
- [147] G. Cormier, B. Barbeau, H.P.H. Arp, S. Sauvé, The degradation behaviour of nine diverse contaminants in urban surface water and wastewater prior to water treatment,

- Environ. Sci. Process. Impacts. 17 (2015) 2051–2065.  
<https://doi.org/10.1039/C5EM00338E>
- [148] A.Y. Lin, M. Reinhard, Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water, *Environ. Toxicol. Chem. An Int. J.* 24 (2005) 1303–1309.  
<https://doi.org/10.1897/04-236R.1>
- [149] Z. Yu, B. Xiao, W. Huang, P. Peng, Sorption of steroid estrogens to soils and sediments, *Environ. Toxicol. Chem. An Int. J.* 23 (2004) 531–539.  
<https://doi.org/10.1897/03-192>
- [150] R.R. Chowdhury, P.A. Charpentier, M.B. Ray, Photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 219 (2011) 67–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.01.019>
- [151] T. De Mes, G. Zeeman, G. Lettinga, Occurrence and fate of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* 4 (2005) 275. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-3216-x>
- [152] B. Du, G. Fan, W. Yu, S. Yang, J. Zhou, J. Luo, Occurrence and risk assessment of steroid estrogens in environmental water samples: A five-year worldwide perspective, *Environ. Pollut.* 267 (2020) 115405.  
[doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115405](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115405).
- [153] P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H.M. Pinheiro, J.M.S. Cabral, Microbial conversion of steroid compounds: recent developments, *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
- [154] A. Malaviya, J. Gomes, Androstenedione production by biotransformation of phytosterols, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 6725–6737.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.039>
- [155] H. Zhang, J. Ren, Y. Wang, C. Sheng, Q. Wu, A. Diao, D. Zhu, Effective multi-step functional biotransformations of steroids by a newly isolated *Fusarium oxysporum* SC1301, *Tetrahedron.* 69 (2013) 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.10.047>

- [156] K. Sambyal, R.V. Singh, Production aspects of testosterone by microbial biotransformation and future prospects, *Steroids*. 159 (2020) 108651. doi:<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108651>.
- [157] R. Ermawati, S. Morimura, Y. Tang, K. Liu, K. Kida, Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation, *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007) 27–31. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.27>
- [158] J.A. Robinson, Q. Ma, J.P. Staveley, W.J. Smolenski, J. Ericson, Degradation and transformation of 17 $\alpha$ -estradiol in water–sediment systems under controlled aerobic and anaerobic conditions, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (2017) 621–629. <https://doi.org/10.1002/etc.3383>
- [159] P.M. Bradley, L.B. Barber, F.H. Chapelle, J.L. Gray, D.W. Kolpin, P.B. McMahon, Biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol, estrone and testosterone in stream sediments, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 1902–1910. DOI: 10.1021/es802797j
- [160] L.B. Stadler, N.G. Love, Impact of microbial physiology and microbial community structure on pharmaceutical fate driven by dissolved oxygen concentration in nitrifying bioreactors, *Water Res.* 104 (2016) 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.001>
- [161] M.S. Colucci, E. Topp, Dissipation of part per trillion concentrations of estrogenic hormones from agricultural soils, *Can. J. Soil Sci.* 82 (2002) 335–340. <https://doi.org/10.4141/S01-079>
- [162] H.B. Lee, D. Liu, Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites by sewage bacteria, *Water. Air. Soil Pollut.* 134 (2002) 351–366. <https://doi.org/10.1023/A:1014117329403>
- [163] M. D'Alessio, D. Vasudevan, J. Lichwa, S.K. Mohanty, C. Ray, Fate and transport of selected estrogen compounds in Hawaii soils: Effect of soil type and macropores, *J. Contam. Hydrol.* 166 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.07.006>
- [164] J. Li, L. Jiang, X. Liu, J. Lv, Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil–water system, *Int. Biodeterior. Biodegradation.*

76 (2013) 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.004>

- [165] S. Combalbert, V. Bellet, P. Dabert, N. Bernet, P. Balaguer, G. Hernandez-Raquet, Fate of steroid hormones and endocrine activities in swine manure disposal and treatment facilities, *Water Res.* 46 (2012) 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.074>
- [166] F.F. Scherr, A.K. Sarmah, H.J. Di, K.C. Cameron, Degradation and metabolite formation of 17 $\beta$ -estradiol-3-sulphate in New Zealand pasture soils, *Environ. Int.* 35 (2009) 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.002>
- [167] W. Yu, B. Du, L. Yang, Z. Zhang, C. Yang, S. Yuan, M. Zhang, M. Zhang, Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019) 9443–9468. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04402-z>
- [168] Y. Chen, K. Zhang, Y. Zuo, Direct and indirect photodegradation of estriol in the presence of humic acid, nitrate and iron complexes in water solutions, *Sci. Total Environ.* 463–464 (2013) 802–809. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.026>.
- [169] Z. Zhou, B. Chen, X. Qu, H. Fu, D. Zhu, Dissolved Black Carbon as an Efficient Sensitizer in the Photochemical Transformation of 17 $\beta$ -Estradiol in Aqueous Solution, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 10391–10399. doi:10.1021/acs.est.8b01928.
- [170] S. Wang, X. Wang, C. Li, X. Xu, Z. Wei, Z. Wang, R. Qu, Photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol on silica gel and natural soil by UV treatment, *Environ. Pollut.* 242 (2018) 1236–1244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.018>.
- [171] X. Wang, J. Yao, S. Wang, X. Pan, R. Xiao, Q. Huang, Z. Wang, R. Qu, Phototransformation of estrogens mediated by Mn(III), not by reactive oxygen species, in the presence of humic acids, *Chemosphere.* 201 (2018) 224–233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.003>.
- [172] C.M. Whidbey, K.E. Daumit, T.-H. Nguyen, D.D. Ashworth, J.C.C. Davis, D.E. Latch, Photochemical induced changes of in vitro estrogenic activity of steroid

hormones, *Water Res.* 46 (2012) 5287–5296.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.016>

- [173] J.H. Writer, J.N. Ryan, S.H. Keefe, L.B. Barber, Fate of 4-nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol in the Redwood River of Minnesota, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 860–868. DOI: 10.1021/es2031664
- [174] R. Marfil-Vega, M.T. Suidan, M.A. Mills, Assessment of the abiotic transformation of 17 $\beta$ -estradiol in the presence of vegetable matter – II: The role of molecular oxygen, *Chemosphere.* 87 (2012) 521–526.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.054>.
- [175] K.K. Zitnick, N.W. Shappell, H. Hakk, T.M. DeSutter, E. Khan, F.X.M. Casey, Effects of liquid swine manure on dissipation of 17 $\beta$ -estradiol in soil, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1111–1117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.112>.
- [176] C. Qin, D. Troya, C. Shang, S. Hildreth, R. Helm, K. Xia, Surface Catalyzed Oxidative Oligomerization of 17 $\beta$ -Estradiol by Fe<sup>3+</sup>-Saturated Montmorillonite, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 956–964. doi:10.1021/es504815t.
- [177] K. Sun, S. Liang, F. Kang, Y. Gao, Q. Huang, Transformation of 17 $\beta$ -estradiol in humic acid solution by  $\epsilon$ -MnO<sub>2</sub> nanorods as probed by high-resolution mass spectrometry combined with <sup>13</sup>C labeling, *Environ. Pollut.* 214 (2016) 211–218. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.021>.
- [178] M.L. Card, J.L. Schnoor, Y.-P. Chin, Uptake of natural and synthetic estrogens by maize seedlings, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 8264–8271. DOI: 10.1021/jf3014074
- [179] M.L. Card, J.L. Schnoor, Y.-P. Chin, Transformation of natural and synthetic estrogens by maize seedlings, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 5101–5108. DOI: 10.1021/es3040335
- [180] C. Collins, M. Fryer, A. Grosso, Plant uptake of non-ionic organic chemicals, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 45–52. DOI: 10.1021/es0508166
- [181] J.O. Ojogoro, A.J. Chaudhary, P. Campo, J.P. Sumpter, M.D. Scrimshaw,



- Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface waters, *Sci. Total Environ.* 579 (2017) 1876–1884. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.176>.
- [182] J. Im, F.E. Löffler, Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 8403–8416. doi:10.1021/acs.est.6b00877.
- [183] N.H. Torres, M.M. Aguiar, L. Fernando, R. Ferreira, J. Heloisa, P. Américo, Â.M. Machado, E.B. Cavalcanti, Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS / MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*, *Environ. Monit. Assess.* 187 (2015) 379. doi:10.1007/s10661-015-4626-z.
- [184] M.J. Benotti, R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, B.D. Stanford, S.A. Snyder, Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 597–603. DOI: 10.1021/es801845a
- [185] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC–(NCI)– MS in the picogram per liter range, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3201–3206. DOI: 10.1021/es010034m
- [186] L. Gunnarsson, J.R. Snape, B. Verbruggen, S.F. Owen, E. Kristiansson, L. Margiotta-Casaluci, T. Österlund, K. Hutchinson, D. Leverett, B. Marks, C.R. Tyler, Pharmacology beyond the patient – The environmental risks of human drugs, *Environ. Int.* 129 (2019) 320–332. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.075>.
- [187] J.O. Ojogoro, M.D. Scrimshaw, J.P. Sumpter, Steroid hormones in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 792 (2021) 148306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148306>.
- [188] A.C. Belfroid, A. Van Der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schäfer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 101–108. doi:10.1016/S0048-9697(98)00336-2.
- [189] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by

- liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 984 (2003) 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01851-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01851-4)
- [190] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters, *Anal. Chim. Acta.* 501 (2004) 79–88. doi:10.1016/j.aca.2003.09.020.
- [191] A.S. Kolok, D.D. Snow, S. Kohno, M.K. Sellin, L.J. Guillette Jr, Occurrence and biological effect of exogenous steroids in the Elkhorn River, Nebraska, USA, *Sci. Total Environ.* 388 (2007) 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.001>
- [192] X.-Y. Xiao, D. V McCalley, J. McEvoy, Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives, *J. Chromatogr. A.* 923 (2001) 195–204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00955-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00955-4)
- [193] Z. Liu, J.A. Ogejo, A. Pruden, K.F. Knowlton, Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 5149–5161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.047>.
- [194] B.D. Blair, J.P. Crago, C.J. Hedman, R.D. Klaper, Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern, *Chemosphere.* 93 (2013) 2116–2123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>.
- [195] G. Morteani, P. Möller, A. Fuganti, T. Paces, Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and □ sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic), *Environ. Geochem. Health.* 28 (2006) 257–264. <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9040-6>
- [196] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>

- [197] A. Jafari, R. Abasabad, A. Salehzadeh, Endocrine disrupting contaminants in water resources and sewage in Hamadan City of Iran, *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 6 (2009) 89–96.
- [198] E. Aydin, I. Talinli, Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey, *Chemosphere*. 90 (2013) 2004–2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.074>
- [199] F.F. Sodr , I.C. Pescara, C.C. Montagner, W.F. Jardim, Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Microchem. J.* 96 (2010) 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.012>
- [200] C. B gi, J. Schwaiger, H. Ferling, U. Mallow, C. Steineck, F. Sinowatz, W. Kalbfus, R.D. Negele, I. Lutz, W. Kloas, Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*, *Environ. Res.* 93 (2003) 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00082-3)
- [201] M. Ashfaq, Q. Sun, C. Ma, A. Rashid, Y. Li, S.I. Mulla, C.-P. Yu, Occurrence, seasonal variation and risk evaluation of selected endocrine disrupting compounds and their transformation products in Jiulong river and estuary, China, *Mar. Pollut. Bull.* 145 (2019) 370–376. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.016>.
- [202] H. Ishibashi, M. Uchida, K. Yoshimoto, Y. Imamura, R. Yamamoto, Y. Ikenaka, M. Kawai, N. Ichikawa, Y. Takao, N. Tominaga, Occurrence and seasonal variation of equine estrogens, equilin and equilenin, in the river water of Japan: Implication with endocrine-disrupting potentials to Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Pollut.* 239 (2018) 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.029>
- [203] A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Prieto, R. Rodil, M. Olivares, L.- . Fernández, O. Zuloaga, Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2897–2907. doi:10.1007/s00216-012-5717-0.
- [204] S.P. Singh, A. Azua, A. Chaudhary, S. Khan, K.L. Willett, P.R. Gardinali, Occurrence

and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments, *Ecotoxicology*. 19 (2010) 338–350. doi:10.1007/s10646-009-0416-0.

- [205] E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M.-F. Grenier-Loustalot, 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*. 1210 (2008) 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.034>
- [206] E. Vulliet, C. Cren-Olivé, Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 2929–2934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>
- [207] N.A. Al-Odaini, M.P. Zakaria, M.I. Yaziz, S. Surif, Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 6791–6806. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.033>
- [208] H. Chang, Y. Wan, S. Wu, Z. Fan, J. Hu, Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens, *Water Res.* 45 (2011) 732–740. doi:10.1016/j.watres.2010.08.046.
- [209] S. Liu, G.-G. Ying, L.-J. Zhou, R.-Q. Zhang, Z.-F. Chen, H.-J. Lai, Steroids in a typical swine farm and their release into the environment, *Water Res.* 46 (2012) 3754–3768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.006>
- [210] R.L. Jenkins, E.M. Wilson, R.A. Angus, W.M. Howell, M. Kirk, Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent, *Toxicol. Sci.* 73 (2003) 53–59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg042>
- [211] H. Chang, S. Wu, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane, Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1195 (2008) 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.055>

- [212] S.-S. Liu, G.-G. Ying, S. Liu, H.-J. Lai, Z.-F. Chen, C.-G. Pan, J.-L. Zhao, J. Chen, Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7299–7311. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8146-4>
- [213] O. Golovko, P. Šauer, G. Fedorova, H.K. Kroupová, R. Grabic, Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS, *Sci. Total Environ.* 621 (2018) 1066–1073. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.120>.
- [214] A. Yamamoto, N. Kakutani, K. Yamamoto, T. Kamiura, H. Miyakoda, Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4132–4137. DOI: 10.1021/es052593p
- [215] L.S. Shore, O. Reichmann, M. Shemesh, A. Wenzel, M.I. Litaor, Washout of accumulated testosterone in a watershed, *Sci. Total Environ.* 332 (2004) 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.009>
- [216] E. Yamazaki, N. Yamashita, S. Taniyasu, J. Lam, P.K.S. Lam, H.-B. Moon, Y. Jeong, P. Kannan, H. Achyuthan, N. Munuswamy, Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122 (2015) 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.029>
- [217] H.H. Tabak, Steroid hormones as water pollutants. II. Studies on the persistence and stability of natural urinary and synthetic ovulation-inhibiting hormones in untreated and treated waste-waters, *Dev. Ind. Microbiol.* 22 (1981) 497–519.
- [218] M. Clara, N. Kreuzinger, B. Strenn, O. Gans, H. Kroiss, The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants, *Water Res.* 39 (2005) 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.036>
- [219] J.-N. Zhang, G.-G. Ying, Y.-Y. Yang, W.-R. Liu, S.-S. Liu, J. Chen, Y.-S. Liu, J.-L.

- Zhao, Q.-Q. Zhang, Occurrence, fate and risk assessment of androgens in ten wastewater treatment plants and receiving rivers of South China, *Chemosphere*. 201 (2018) 644–654. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.144>.
- [220] Y. Kobayashi, T. Okuda, N. Yamashita, H. Tanaka, S. Tanaka, S. Fuji, The behavior of free/conjugated estrogens during advanced wastewater treatment, *Env. Sanit Eng Res*. 20 (2006) 55–58.
- [221] C. Baronti, R. Curini, G. D’Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, *Environ. Sci. Technol*. 34 (2000) 5059–5066. doi:10.1021/es001359q.
- [222] G. D’ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari, R. Samperi, Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *Sci. Total Environ*. 302 (2003) 199–209. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00342-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00342-X)
- [223] R.F. Chimchirian, R.P.S. Suri, H. Fu, Free synthetic and natural estrogen hormones in influent and effluent of three municipal wastewater treatment plants, *Water Environ. Res*. 79 (2007) 969–974. <https://doi.org/10.2175/106143007X175843>
- [224] M.R. Servos, D.T. Bennie, B.K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S.A. Smyth, T.A. Ternes, Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants, *Sci. Total Environ*. 336 (2005) 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.025>
- [225] M.P. Fernandez, M.G. Ikonou, I. Buchanan, An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters, *Sci. Total Environ*. 373 (2007) 250–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.018>
- [226] A.D. Vethaak, J. Lahr, S.M. Schrap, A.C. Belfroid, G.B.J. Rijs, A. Gerritsen, J. de Boer, A.S. Bulder, G.C.M. Grinwis, R. V Kuiper, An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands, *Chemosphere*. 59 (2005) 511–524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.053>

- [227] M.G. Kibambe, M.N.B. Momba, A.P. Daso, M.C. Van Zijl, M.A.A. Coetzee, Efficiency of selected wastewater treatment processes in removing estrogen compounds and reducing estrogenic activity using the T47D-KBLUC reporter gene assay, *J. Environ. Manage.* 260 (2020) 110135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110135>.
- [228] C.W. Cui, S.L. Ji, H.Y. Ren, Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory, *Environ. Monit. Assess.* 121 (2006) 409–419. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-9139-8>
- [229] J. Martín, D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal, *J. Hazard. Mater.* 239 (2012) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>
- [230] T. Manickum, W. John, Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa), *Sci. Total Environ.* 468 (2014) 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.041>
- [231] C.R. Tyler, A.L. Filby, L.K. Bickley, R.I. Cumming, R. Gibson, P. Labadie, Y. Katsu, K.E. Liney, J.A. Shears, V. Silva-Castro, Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3897–3904. <https://doi.org/10.1021/es803135q>
- [232] A. Iparraguirre, A. Prieto, P. Navarro, M. Olivares, L.-Á. Fernández, O. Zuloaga, Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 339–352. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5074-4>
- [233] A. Kot-Wasik, A. Jakimska, M. Śliwka-Kaszyńska, Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants, *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016) 661. <https://doi.org/10.1007/s10661-016->

- [234] E. Vulliet, J.-B. Baugros, M.-M. Flament-Waton, M.-F. Grenier-Loustalot, Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2143. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1084-z>
- [235] G. Xu, S. Ma, L. Tang, R. Sun, J. Xiang, B. Xu, Y. Bao, M. Wu, Occurrence, fate, and risk assessment of selected endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants and receiving river of Shanghai, China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 25442–25450. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7669-y>
- [236] Z.H. Liu, M. Ito, Y. Kanjo, A. Yamamoto, Profile and removal of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in two municipal wastewater treatment plants by using an ER (AR) competitive ligand binding assay and chemical analyses, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 900. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62356-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62356-6)
- [237] H. Chang, S. Wu, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane, Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1195 (2008) 44–51. [doi:10.1016/j.chroma.2008.04.055](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.055).
- [238] O.T. Komesli, M. Muz, M.S. Ak, S. Bakirdere, C.F. Gokcay, Occurrence, fate and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Turkish wastewater treatment plants, *Chem. Eng. J.* 277 (2015) 202–208. [doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.115](https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.115).
- [239] B. Pauwels, H. Noppe, H. De Brabander, W. Verstraete, Comparison of steroid hormone concentrations in domestic and hospital wastewater treatment plants, *J. Environ. Eng.* 134 (2008) 933–936. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2008\)134:11\(933\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2008)134:11(933))
- [240] V. Mhuka, S. Dube, M.M. Nindi, Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in wastewater and receiving waters in South Africa using LC-Orbitrap<sup>TM</sup> MS, *Emerg. Contam.* 6 (2020) 250–258. [doi:https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.07.002](https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.07.002).



- [241] Q. Yu, J. Geng, H. Ren, Occurrence and fate of androgens in municipal wastewater treatment plants in China, *Chemosphere*. 237 (2019) 124371. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124371>.
- [242] J.E. Drewes, J. Hemming, S.J. Ladenburger, J. Schauer, W. Sonzogni, An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements, *Water Environ. Res.* 77 (2005) 12–23. <https://doi.org/10.2175/106143005X41573>
- [243] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1138 (2007) 32–41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.037>.
- [244] Q. Sun, M. Li, C. Ma, X. Chen, X. Xie, C.-P. Yu, Seasonal and spatial variations of PPCP occurrence, removal and mass loading in three wastewater treatment plants located in different urbanization areas in Xiamen, China, *Environ. Pollut.* 208 (2016) 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.003>
- [245] S. Mohapatra, C.-H. Huang, S. Mukherji, L.P. Padhye, Occurrence and fate of pharmaceuticals in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States, *Chemosphere*. 159 (2016) 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.047>
- [246] A.O. Ifelebuegu, The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8 (2011) 245–254. <https://doi.org/10.1007/BF03326213>
- [247] K.I. Ekpeghere, W.-J. Sim, H.-J. Lee, J.-E. Oh, Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 640 (2018) 1015–1023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>
- [248] W. Ben, B. Zhu, X. Yuan, Y. Zhang, M. Yang, Z. Qiang, Transformation and fate of natural estrogens and their conjugates in wastewater treatment plants: Influence of

- operational parameters and removal pathways, *Water Res.* 124 (2017) 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.065>
- [249] W. Ben, B. Zhu, X. Yuan, Y. Zhang, M. Yang, Z. Qiang, Occurrence, removal and risk of organic micropollutants in wastewater treatment plants across China: Comparison of wastewater treatment processes, *Water Res.* 130 (2018) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.057>
- [250] M.J.L. de Alda, A. Gil, E. Paz, D. Barceló, Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry, *Analyst.* 127 (2002) 1299–1304. <https://doi.org/10.1039/B207658F>
- [251] L. Viglino, K. Aboulfadl, Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS / MS, *Talanta.* 76 (2008) 1088–1096. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.008.
- [252] Z. Fan, S. Wu, H. Chang, J. Hu, Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: Comparison to estrogens, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2725–2733. doi:10.1021/es103429c.
- [253] S. Liu, G.-G. Ying, J.-L. Zhao, L.-J. Zhou, B. Yang, Z.-F. Chen, H.-J. Lai, Occurrence and fate of androgens, estrogens, glucocorticoids and progestagens in two different types of municipal wastewater treatment plants, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 482–491. doi:10.1039/c1em10783f.
- [254] E.P. Kolodziej, J.L. Gray, D.L. Sedlak, Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent, *Environ. Toxicol. Chem. An Int. J.* 22 (2003) 2622–2629. <https://doi.org/10.1897/03-42>
- [255] Q. Yu, J. Geng, H. Ren, Chemosphere Occurrence and fate of androgens in municipal wastewater treatment plants in China, *Chemosphere.* 237 (2019) 124371. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124371.
- [256] S.D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B.J. Vanderford, S.A. Snyder, Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Res.* 41 (2007) 1013–1021.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>.

- [257] N. Nakada, T. Tanishima, H. Shinohara, K. Kiri, H. Takada, Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, *Water Res.* 40 (2006) 3297–3303. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.039>
- [258] H.-B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1094 (2005) 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.070>
- [259] S. Terzić, I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrović, D. Barcelo, J. Müller, T. Knepper, I. Martí, F. Ventura, Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region, *Sci. Total Environ.* 399 (2008) 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.003>
- [260] S. Babić, J. Barišić, A. Bielen, I. Bošnjak, R. Sauerborn Klobučar, I. Ujević, I. Strunjak-Perović, N. Topić Popović, R. Čož-Rakovac, Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*, *J. Hazard. Mater.* 318 (2016) 477–486. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.017>.
- [261] M. Nie, C. Yan, W. Dong, M. Liu, J. Zhou, Y. Yang, Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary, *Chemosphere.* 127 (2015) 109–116. doi:[10.1016/j.chemosphere.2015.01.021](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.021).
- [262] H. Darwano, S.V. Duy, S. Sauvé, A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66 (2014) 582–593. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0007-9>
- [263] D. Liu, J. Liu, M. Guo, H. Xu, S. Zhang, L. Shi, C. Yao, Occurrence, distribution, and risk assessment of alkylphenols, bisphenol A, and tetrabromobisphenol A in surface water, suspended particulate matter, and sediment in Taihu Lake and its tributaries,

Mar. Pollut. Bull. 112 (2016) 142–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.026>

- [264] P. Labadie, H. Budzinski, Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1199–1205. doi:10.1007/s00216-005-3055-1.
- [265] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5059–5066. <https://doi.org/10.1021/es001359q>
- [266] P. Steven C. Wendelken, Method 539 . 1 : Determination Of Twelve Hormones And Bisphenol A in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, US EPA. (2015).
- [267] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta.* 101 (2012) 413–419. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.050>.
- [268] Y. Filali-Meknassi, M. Auriol, C.D. Adams, R.Y. Surampalli, Quantification of Steroid Sex Hormones Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Water Environ. Res.* 79 (2007) 687–696. doi:10.2175/106143007X156781.
- [269] M.J. López De Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 892 (2000) 391–406. doi:10.1016/S0021-9673(00)00068-6.
- [270] M.J. López de Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection, *J.*

- Chromatogr. A. 911 (2001) 203–210. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00517-9).
- [271] L. Ciofi, D. Fibbi, U. Chiuminatto, E. Coppini, L. Checchini, M. Del Bubba, Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater, *J. Chromatogr. A.* 1283 (2013) 53–61. doi:[10.1016/j.chroma.2013.01.084](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.084).
- [272] P. He, D.S. Aga, Comparison of GC-MS/MS and LC-MS/MS for the analysis of hormones and pesticides in surface waters: advantages and pitfalls, *Anal. Methods.* 11 (2019) 1436–1448. <https://doi.org/10.1039/C8AY02774A>
- [273] M. Huerta-fontela, M. Teresa, F. Ventura, Fast liquid chromatography – quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4212–4222. doi:[10.1016/j.chroma.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.007).
- [274] T. Trinh, N.B. Harden, H.M. Coleman, S.J. Khan, Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 1668–1676. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.068>.
- [275] S. Vo Duy, P.B. Fayad, B. Barbeau, M. Prévost, S. Sauvé, Using a novel sol–gel stir bar sorptive extraction method for the analysis of steroid hormones in water by laser diode thermal desorption/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry, *Talanta.* 101 (2012) 337–345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.036>.
- [276] K. Czarny, D. Szczukocki, B. Krawczyk, R. Juszczak, S. Skrzypek, R. Gadzała-Kopciuch, Molecularly imprinted polymer film grafted from porous silica for efficient enrichment of steroid hormones in water samples, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 2858–2866. doi:[10.1002/jssc.201900281](https://doi.org/10.1002/jssc.201900281).
- [277] P. Avar, G. Maasz, P. Takács, S. Lovas, Z. Zrinyi, R. Svigruha, A. Takátsy, L.G. Tóth, Z. Pirger, HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 123–127. doi:[10.1002/dta.1829](https://doi.org/10.1002/dta.1829).

- [278] N. Migowska, M. Caban, P. Stepnowski, J. Kumirska, Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography – mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection, *Sci. Total Environ.* 441 (2012) 77–88. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.043.
- [279] M.J. Rocha, C. Cruzeiro, C. Peixoto, E. Rocha, Annual Fluctuations of Endocrine-Disrupting Compounds at the Lower End of the Lima River, Portugal, and in Adjacent Coastal Waters, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 389–401. doi:10.1007/s00244-014-0063-1.
- [280] E. Vulliet, C. Cren-Olivé, M.-F. Grenier-Loustalot, Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters, *Environ. Chem. Lett.* 9 (2011) 103–114. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0253-7>
- [281] J. Wölz, K. Grosshans, G. Streck, T. Schulze, A. Rastall, L. Erdinger, W. Brack, M. Fleig, D. Kühlers, T. Braunbeck, H. Hollert, Estrogen receptor mediated activity in bankside groundwater , with flood suspended particulate matter and floodplain soil – An approach combining tracer substance , bioassay and target analysis, *Chemosphere.* 85 (2011) 717–723. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.060.
- [282] F.-S. Zhang, Y.-F. Xie, X.-W. Li, D.-Y. Wang, L.-S. Yang, Z.-Q. Nie, Accumulation of steroid hormones in soil and its adjacent aquatic environment from a typical intensive vegetable cultivation of North China, *Sci. Total Environ.* 538 (2015) 423–430. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.067.
- [283] Y. Liu, S. Zhang, G. Ji, S. Wu, R. Guo, J. Cheng, Z. Yan, J. Chen, Occurrence , distribution and risk assessment of suspected endocrine-disrupting chemicals in surface water and suspended particulate matter of Yangtze River ( Nanjing section ), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135 (2017) 90–97. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.09.035.
- [284] J.J.L. Smith, Steroid Estrogens Profiles along River Stretches Arising from Sewage Treatment Works Discharges, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1744–1750. doi:10.1021/es0202107.
- [285] H. Yarahmadi, S.V. Duy, M. Hachad, S. Dorner, S. Sauvé, M. Prévost, Seasonal

variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases, *Sci. Total Environ.* 635 (2018) 144–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.370.

- [286] I. Kohler, J. Schappler, S. Rudaz, Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis, *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 125–141. doi:10.1007/s00216-012-6367-y.
- [287] V. Andreu, Y. Pic, Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 118 (2019). doi:10.1016/j.trac.2019.06.038.
- [288] J. Beck, K. Uwe, I. Ko, A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography – mass spectrometry, *Chemosphere.* 71 (2008) 954–960. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.062.
- [289] X. Zhang, Q. Li, G. Li, Z. Wang, C. Yan, Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 1210–1216. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.03.011.
- [290] C.S. Eskilsson, E. Bjorklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A.* 902 (2000) 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- [291] H. Wang, J. Ding, N. Ren, O. Mae, Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 197–208. doi:10.1016/j.trac.2015.05.005.
- [292] M. Llompart, M. Celeiro, T. Dagnac, Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment, *Trends Anal. Chem.* 116 (2019) 136–150. doi:10.1016/j.trac.2019.04.029.
- [293] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography – mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments, *J. Chromatogr. A.* 1038 (2004) 19–26.

doi:10.1016/j.chroma.2004.03.030.

- [294] M.J.L. De Alda, A. Gil, E. Paz, D. Barceló, Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry Maria, R. Soc. Chem. (2002) 1299–1304. doi:10.1039/b207658f.
- [295] B. Lei, S. Huang, Y. Zhou, D. Wang, Z. Wang, Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China, *Chemosphere*. 76 (2009) 36–42. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.035.
- [296] Z. Zhang, N. Ren, K. Kannan, Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River , Northeastern China, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (2014) 361–369. doi:10.1007/s00244-014-9998-5.
- [297] D. Ensminger, F.B. Stulen, *Ultrasonics: data, equations and their practical uses*, CRC press, 2008.
- [298] D. Williams, *Guide to cleaner technologies: cleaning and degreasing process changes*, US EPA, 1994.
- [299] V. Pichon, A. Combès, N. Delaunay, Immunosorbents in microextraction, *Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 246–255. doi:10.1016/j.trac.2019.02.016.
- [300] P.L. Ferguson, C.R. Iden, A.E. Mcelroy, B.J. Brownawell, Determination of Steroid Estrogens in Wastewater by Immunoaffinity Extraction Coupled with HPLC - Electro spray-MS, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3890–3895. doi:10.1021/ac010327y.
- [301] P. Lucci, O. Nú, M.T. Galceran, Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4828–4833. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.007.
- [302] J. Tang, J. Wang, L. Yuan, Y. Xiao, Z. Yang, Trace analysis of estrogens in milk samples by molecularly imprinted solid phase extraction with genistein as a dummy template molecule and high- performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Steroids*. 145 (2019) 23–31. doi:10.1016/j.steroids.2019.02.010.



- [303] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, Dual derivatization – stir bar sorptive extraction – thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry for determination of 17  $\beta$ -estradiol in water sample, *Sci. Direct*. 1105 (2006) 140–147. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.088.
- [304] C. Hu, M. He, B. Chen, C. Zhong, B. Hu, Polydimethylsiloxane / metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled to high performance liquid chromatography-ultraviolet detector for the determination of estrogens in environmental water samples, *J. Chromatogr. A*. 1310 (2013) 21–30. doi:10.1016/j.chroma.2013.08.047.
- [305] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chem. Inf. Model*. 1217 (2010) 2642–2666. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051.
- [306] E. Dinelli, A. Lima, S. Albanese, M. Birke, D. Cicchella, L. Giaccio, P. Valera, B. De Vivo, Major and trace elements in tap water from Italy, *J. Geochemical Explor*. 112 (2012) 54–75. doi:10.1016/j.gexplo.2011.07.009.
- [307] R. Guedes-alonso, Z. Sosa-ferrera, *Analytical Methods* An on-line solid phase extraction method coupled with UHPLC-MS / MS for the determination of steroid hormone compounds in treated water samples from waste water treatment plants, *Anal. Methods*. 7 (2015) 5996–6005. doi:10.1039/c5ay00807g.
- [308] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants, *J. Chromatogr. A*. 1145 (2007) 102–109. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.055.
- [309] F. Guo, Q. Liu, G. Qu, S. Song, J. Sun, J. Shi, G. Jiang, Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1281 (2013) 9–18. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.044.
- [310] D. Zong-da, C. Yuan-yuan, Y. Cheng-xiong, Synthesis of silica amino-functionalized

microporous organic network composites for efficient on-line solid phase extraction of trace phenols from water, *J. Chromatogr. A.* 1616 (2020) 460791. doi:10.1016/j.chroma.2019.460791.

- [311] J.L. York, R.H.M. Li, K.A. Schug, On-line sample preparation for multiclass vitamin , hormone , and mycotoxin determination in chicken egg yolk using LC-MS / MS, *Food Chem.* 326 (2020) 126939. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126939.
- [312] S. Ouillon, P. Douillet, S. Andre, Coupling satellite data with in situ measurements and numerical modeling to study fine suspended-sediment transport : a study for the lagoon of New Caledonia, *Coral Reefs.* 23 (2004) 109–122. doi:10.1007/s00338-003-0352-z.
- [313] R. Periàñez, Modelling the transport of suspended particulate matter by the Rhone River plume ( France ). Implications for pollutant dispersion, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 351–364. doi:10.1016/j.envpol.2004.05.021.
- [314] M. Fettweis, B.J. Lee, Spatial and Seasonal Variation of Biomineral Suspended Particulate Matter Properties in High-Turbid Nearshore and Low-Turbid Offshore Zones, *Water.* (2017). doi:10.3390/w9090694.
- [315] O. Ros, A. Vallejo, M. Olivares, A. Delgado, N. Etxebarria, A. Prieto, Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A , alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis, *Talanta.* 134 (2015) 247–255. doi:10.1016/j.talanta.2014.11.015.
- [316] S. Yuan, Z. Liu, H. Lian, C. Yang, Q. Lin, Simultaneous determination of estrogenic odorant alkylphenols , chlorophenols , and their derivatives in water using online headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016) 19116–19125. doi:10.1007/s11356-016-7107-1.
- [317] G. Janssens, S. Mangelinckx, D. Courtheyn, N. De Kimpe, B. Matthijs, B. Le Bizec, Simultaneous Detection of Androgen and Estrogen Abuse in Breeding Animals by Gas Chromatography – Mass Spectrometry/ Combustion/Isotope Ratio Mass

- Spectrometry (GC-MS/C/IRMS) Evaluated against Alternative Methods, *J. Agric. Food Chem.* (2015). doi:10.1021/acs.jafc.5b02746.
- [318] B. Woźniak, A. Kłopot, I.M. Żuchowska, K. Sielska, J. Żmudzki, Determination of natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 2013 (2014) 603–611. doi:10.2478/bvip-2014-0093.
- [319] N. Migowska, M. Caban, P. Stepnowski, J. Kumirska, Science of the Total Environment Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography – mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection, *Sci. Total Environ.* 441 (2012) 77–88. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.043.
- [320] S.J. Vaz, *Analytical Chemistry Applied to Emerging Pollutants*, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74403-2>
- [321] H.-X. Wang, Y. Zhou, Q.-W. Jiang, Enhanced screening efficiency for endocrine-disrupting chemicals in milk and powdered milk using UPLC/QTOF-MS by the introduction of dansyl chloride derivatisation, *Food Addit. Contam. Part A.* 30 (2013) 166–180. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.720036>
- [322] M.R. Anari, R. Bakhtiar, B. Zhu, S. Huskey, R.B. Franklin, D.C. Evans, Derivatization of ethinylestradiol with dansyl chloride to enhance electrospray ionization: Application in trace analysis of ethinylestradiol in rhesus monkey plasma, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4136–4144. doi:10.1021/ac025712h.
- [323] S. El Fellah, G. Duporté, H. Sirén, Steroid hormones, inorganic ions and botrydial in drinking water. Determination with capillary electrophoresis and liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry, *Microchem. J.* 133 (2017) 126–136. doi:10.1016/j.microc.2017.03.016.
- [324] H. Sirén, T. Seppänen-Laakso, M. Orešič, Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism, *J. Chromatogr. B.* 871 (2008) 375–382. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.016>.

- [325] Y. Yamini, M. Asghari-Khiavi, N. Bahramifar, Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets, *Talanta*. 58 (2002) 1003–1010. doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00455-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00455-1).
- [326] A. Rouessac, F. Rouessac, *Analyse chimique*, 2004.
- [327] T. Fauzan, T. Omar, A. Ahmad, A. Zaharin, Endocrine disrupting compounds ( EDCs ) in environmental matrices : Review of analytical strategies for pharmaceuticals , estrogenic hormones , and alkylphenol compounds, *Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 241–259. doi:[10.1016/j.trac.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.004).
- [328] J.H. Gross, *Mass Spectrometry: a textbook*, Springer, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>
- [329] M.L. Vestal, Methods of Ion Generation, *Chem. Rev.* 101 (2001) 361–375. doi:[10.1021/cr990104w](https://doi.org/10.1021/cr990104w).
- [330] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 210–230. doi:[10.1080/05704920902717872](https://doi.org/10.1080/05704920902717872).
- [331] D. Li, L. Gan, A. Bronja, O.J. Schmitz, *Analytica Chimica Acta Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry ( GC-API-MS )*: Review, *Anal. Chim. Acta.* 891 (2015) 43–61. doi:[10.1016/j.aca.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.002).
- [332] E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third edit, 2007.
- [333] C. Dass, *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, 2007. doi:[10.1002/0470118490](https://doi.org/10.1002/0470118490)
- [334] A.M.M. Faqehi, D.F. Cobice, G. Naredo, T.C.S. Mak, R. Upreti, F.W. Gibb, G.J. Beckett, B.R. Walker, N.Z.M. Homer, R. Andrew, Derivatization of estrogens enhances specificity and sensitivity of analysis of human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta*. 151 (2016) 148–156. doi:[10.1016/j.talanta.2015.12.062](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.062).

- [335] S. Yue, B.A. Ramsay, R.S. Brown, J. Wang, J.A. Ramsay, Identification of Estrogenic Compounds in Oil Sands Process Waters by Effect Directed Analysis, *Environ. Sci. Technol.* (2015). doi:10.1021/es5039134.
- [336] A.D. Lafleur, K.A. Schug, A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems, *Anal. Chim. Acta.* 696 (2011) 6–26. doi:10.1016/j.aca.2011.03.054.
- [337] B. Socas-rodríguez, J. Hernández-borges, P. Salazar, M. Martín, M.Á. Rodríguez-delgado, Core – shell polydopamine magnetic nanoparticles as sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of estrogenic compounds in water samples prior to high-performance liquid chromatography – mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A.* 1397 (2015) 1–10. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.010.
- [338] H. Wang, Y. Zhou, Q. Jiang, Simultaneous screening of estrogens , progestogens , and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of- flight mass spectrometry, *Microchem. J.* 100 (2012) 83–94. doi:10.1016/j.microc.2011.09.010.
- [339] M. Holčápek, R. Jirásko, M. Lísa, Recent developments in liquid chromatography – mass spectrometry and related techniques, *J. Chromatogr. A.* 1259 (2012) 3–15. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072.
- [340] K.M. Wooding, R.M. Barkley, J.A. Hankin, C.A. Johnson, A.P. Bradford, N. Santoro, R.C. Murphy, Mechanism of Formation of the Major Estradiol Product Ions Following Collisional Activation of the Molecular Anion in a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2013) 1451–1455. doi:10.1021/jasms.8b04400.
- [341] D. Dolar, M. Gros, S. Rodriguez-mozaz, J. Moreno, J. Comas, Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system , MBR – RO, *J. Hazard. Mater.* 239–240 (2012) 64–69. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.029.
- [342] S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environ. Int.* 35 (2009) 803–814. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008.

- [343] S. Esplugas, D. Grandjean, L.F. De Alencastro, Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge, 6 (2012). doi:10.1016/j.watres.2012.01.014.
- [344] C.J. Houtman, R. ten Broek, A. Brouwer, Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tQ-MS, *Sci. Total Environ.* 630 (2018) 1492–1501. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.273.
- [345] T. Yien Fang, S.M. Praveena, A.Z. Aris, S.N. Syed Ismail, I. Rasdi, Quantification of selected steroid hormones ( $17\beta$ -Estradiol and  $17\alpha$ -Ethinylestradiol) in wastewater treatment plants in Klang Valley (Malaysia), *Chemosphere.* 215 (2019) 153–162. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.032.
- [346] J.C.G. Sousa, A.R. Ribeiro, M.O. Barbosa, M.F.R. Pereira, A.M.T. Silva, A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines, *J. Hazard. Mater.* 344 (2018) 146–162. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.09.058.
- [347] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 561–568. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020.
- [348] C. Casals-Casas, B. Desvergne, Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption, *Annu. Rev. Physiol.* 73 (2011) 135–162. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142200.
- [349] A. Verliefde, E. Cornelissen, G. Amy, B. Van der Bruggen, H. van Dijk, Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration, *Environ. Pollut.* 146 (2007) 281–289. doi:10.1016/J.ENVPOL.2006.01.051.
- [350] H.A. Kaboré, S. Vo Duy, G. Munoz, L. Méité, M. Desrosiers, J. Liu, T.K. Sory, S. Sauvé, Worldwide drinking water occurrence and levels of newly-identified perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances, *Sci. Total Environ.* 616–617 (2018) 1089–1100. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.210.

- [351] L. Le Coadou, K. Le Ménach, P. Labadie, M.H. Dévier, P. Pardon, S. Augagneur, H. Budzinski, Quality survey of natural mineral water and spring water sold in France: Monitoring of hormones, pharmaceuticals, pesticides, perfluoroalkyl substances, phthalates, and alkylphenols at the ultra-trace level, *Sci. Total Environ.* 603–604 (2017) 651–662. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.174.
- [352] J.S. Boone, C. Vigo, T. Boone, C. Byrne, J. Ferrario, R. Benson, J. Donohue, J.E. Simmons, D.W. Kolpin, E.T. Furlong, S.T. Glassmeyer, Per- and polyfluoroalkyl substances in source and treated drinking waters of the United States, *Sci. Total Environ.* 653 (2018) 359–369. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.245.
- [353] Y.Y. Yang, J.L. Zhao, Y.S. Liu, W.R. Liu, Q.Q. Zhang, L. Yao, L.X. Hu, J.N. Zhang, Y.X. Jiang, G.G. Ying, Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) in surface and ground waters and their application as indication of wastewater contamination, *Sci. Total Environ.* 616–617 (2018) 816–823. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.241.
- [354] D. Koubovec, K. Ronacher, E. Stubrud, A. Louw, J.P. Hapgood, Synthetic progestins used in HRT have different glucocorticoid agonist properties, *Mol. Cell. Endocrinol.* 242 (2005) 23–32. doi:10.1016/j.mce.2005.07.001.
- [355] G.M. Solomon, T. Schettler, Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications, 163 (2000) 1471–1476.
- [356] R. Guedes-Alonso, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodriguez, An on-line solid phase extraction method coupled with UHPLC-MS/MS for the determination of steroid hormone compounds in treated water samples from waste water treatment plants, *Anal. Methods.* 7 (2015) 5996–6005. doi:10.1039/c5ay00807g.
- [357] R. Lopez-Roldan, M.L. de Alda, M. Gros, M. Petrovic, J. Martin-Alonso, D. Barcelo, Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry, *Chemosphere.* 80 (2010) 1337–1344. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.042.

- [358] K. Cai, C.T. Elliott, D.H. Phillips, M.L. Scippo, M. Muller, L. Connolly, Treatment of estrogens and androgens in dairy wastewater by a constructed wetland system, *Water Res.* 46 (2012) 2333–2343. doi:10.1016/j.watres.2012.01.056.
- [359] Y. Xu, N. Xu, N.R. Llewellyn, H. Tao, Occurrence and removal of free and conjugated estrogens in wastewater and sludge in five sewage treatment plants, *Environ. Sci. Process. Impacts.* 16 (2014) 262–270. doi:10.1039/C3EM00199G.
- [360] H. Tomšíková, J. Aufartová, P. Solich, L. Nováková, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 35–57. doi:10.1016/j.trac.2011.11.008.
- [361] A. Tabata, S. Kashiwada, Y. Ohnishi, H. Ishikawa, N. Miyamoto, M. Itoh, Y. Magara, Estrogenic influences of estradiol-17 $\beta$ , p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations, in: *Water Sci. Technol.*, 2001: pp. 109–116. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0079>
- [362] T.A. Hanselman, D.A. Graetz, A.C. Wilkie, Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5471–5478. doi:10.1021/es034410+.
- [363] S.K. Khanal, B. Xie, M.L. Thompson, S. Sung, S.K. Ong, J. Van Leeuwen, Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6537–6546. doi:10.1021/es0607739.
- [364] X. Peng, Z. Wang, C. Yang, F. Chen, B. Mai, Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 51–56. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.017.
- [365] K.L. Thorpe, R.I. Cummings, T.H. Hutchinson, M. Scholze, G. Brighty, J.P. Sumpter, C.R. Tyler, Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1142–1149. doi:10.1021/es0201348.
- [366] K.L. Thorpe, T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, M. Scholze, J.P. Sumpter, C.R. Tyler,



Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2476–2481. doi:10.1021/es001767u.

- [367] S. Rodríguez-Mozaz, M. Lopez de Alda, D. Barceló, Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase tandem mass spectrometry method, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6998–7006. <https://doi.org/10.1021/ac049051v>
- [368] K. Van Den Belt, R. Verheyen, H. Witters, Effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): Effects on growth, gonads and female reproductive success, *Sci. Total Environ.* 309 (2003) 127–137. doi:10.1016/S0048-9697(03)00046-9.
- [369] F. Stuer-Lauridsen, M. Birkved, L.P. Hansen, H.-C. Holten Lützhøft, B. Halling-Sørensen, Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use, *Chemosphere.* 40 (2000) 783–793. doi:10.1016/S0045-6535(99)00453-1.
- [370] R. Van Aerle, N. Pounds, T.H. Hutchinson, S. Maddix, C. Tyler, Window of sensitivity for the estrogenic effect of ethinylestradiol in early life stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Ecotoxicology.* 11 (2002) 423–434. <https://doi.org/10.1023/A:1021053217513>
- [371] J.R. Colman, D. Baldwin, L.L. Johnson, N.L. Scholz, Effects of the synthetic estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat. Toxicol.* 91 (2009) 346–354. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.001.
- [372] E. Commission, DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, 2012.
- [373] N. Nagpal, C. Meays, Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) Technical Appendix, (2009) 1–86.
- [374] P.B. Fayad, M. Prévost, S. Sauvé, On-line solid-phase extraction coupled to liquid

chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters, *Talanta*. 115 (2013) 349–360. doi:10.1016/j.talanta.2013.05.038.

- [375] D. Zacs, I. Perkons, V. Bartkevics, Determination of steroidal oestrogens in tap water samples using solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer sorbent and quantification with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016). doi:10.1007/s10661-016-5435-8.
- [376] M. Petrovic, M. Solé, M.J. López de Alda, D. Barceló, Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp., *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 2146–2156. doi:PDF 132.
- [377] M. Star-Weinstock, B.L. Williamson, S. Dey, S. Pillai, S. Purkayastha, LC-ESI-MS/MS analysis of testosterone at sub-picogram levels using a novel derivatization reagent, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9310–9317. doi:10.1021/ac302036r.
- [378] R.B. Sghaier, S. Net, I. Ghorbel-Abid, S. Bessadok, M. Le Coz, D.B. Hassan-Chehimi, M. Trabelsi-Ayadi, M. Tackx, B. Ouddane, Simultaneous Detection of 13 Endocrine Disrupting Chemicals in Water by a Combination of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in Transboundary Rivers (France-Belgium), *Water. Air. Soil Pollut.* 228 (2017). doi:10.1007/s11270-016-3195-2.
- [379] M. Locatelli, F. Sciascia, R. Cifelli, L. Malatesta, P. Bruni, F. Croce, Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples, *J. Chromatogr. A.* 1434 (2016) 1–18. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.034.
- [380] J.F. Bienvenu, G. Provencher, P. Bélanger, R. Bérubé, P. Dumas, S. Gagné, É. Gaudreau, N. Fleury, Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association, *Anal. Chem.* 89 (2017) 7560–7568. doi:10.1021/acs.analchem.7b01383.
- [381] S.X.L. Goh, A. Duarah, L. Zhang, S.A. Snyder, H.K. Lee, Online solid phase extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of estrogens and glucocorticoids in water, *J. Chromatogr. A.* 1465 (2016) 9–19.

doi:10.1016/j.chroma.2016.08.040.

- [382] A.C. Naldi, P.B. Fayad, M. Prévost, S. Sauvé, 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, *Chem. Cent. J.* 10 (2016) 30. doi:10.1186/s13065-016-0174-z.
- [383] L. Mandaric, E. Diamantini, E. Stella, K. Cano-Paoli, J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, A. Bellin, G. Chiogna, B. Majone, M.S. Diaz-Cruz, S. Sabater, D. Barcelo, M. Petrovic, Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism, *Sci. Total Environ.* 590–591 (2017) 484–494. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.185.
- [384] K. Takkis, R. Aro, L.T. Kõrgvee, H. Varendi, J. Lass, K. Herodes, K. Kipper, Signal Enhancement in the HPLC-ESI-MS/MS analysis of spironolactone and its metabolites using HFIP and NH<sub>4</sub>F as eluent additives, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3145–3151. doi:10.1007/s00216-017-0255-4.
- [385] J.C. Bowman, J.L. Zhou, J.W. Readman, Sediment-water interactions of natural oestrogens under estuarine conditions, *Mar. Chem.* 77 (2002) 263–276. doi:10.1016/S0304-4203(02)00006-3.
- [386] J.M. Montiel-León, S.V. Duy, G. Munoz, M. Amyot, S. Sauvé, Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2765–2779. doi:10.1007/s00216-018-0957-2.
- [387] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES \* HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS ( IUPAC Technical Report ) Harmonized guidelines for single-laboratory ( IUPAC Technical Report ), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855.
- [388] K.K. Murray, R.K. Boyd, M.N. Eberlin, G.J. Langley, L. Li, Y. Naito, Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013), *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 1515–1609. doi:10.1351/PAC-REC-06-04-06.

- [389] T. Yien, S. Mangala, A. Zaharin, S. Norkhadijah, S. Ismail, I. Rasdi, Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review, *Chemosphere*. 165 (2016) 358–368. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.051.
- [390] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, 41 (2006) 1303–1311. doi:10.1016/j.jpba.2006.02.037.
- [391] G. Ying, R.S. Kookana, Y. Ru, Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, 28 (2002) 545–551. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2)
- [392] P.B. Fayad, M. Prévost, S. Sauvé, Talanta On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters, *Talanta*. 115 (2013) 349–360. doi:10.1016/j.talanta.2013.05.038.
- [393] P.J. Taylor, Matrix effects : The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry, 38 (2005) 328–334. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.
- [394] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2198–2207. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.003.
- [395] B.K. Matuszewski, Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 830 (2006) 293–300. doi:10.1016/j.jchromb.2005.11.009.
- [396] C.N. Duong, J.S. Ra, J. Cho, S.D. Kim, H.K. Choi, J.H. Park, K.W. Kim, E. Inam, S.D. Kim, Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries, *Chemosphere*. 78 (2010) 286–293. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.048.
- [397] M. Čelić, S. Insa, B. Škrbić, M. Petrović, Development of a sensitive and robust online dual column liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the

analysis of natural and synthetic estrogens and their conjugates in river water and wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5427–5440. doi:10.1007/s00216-017-0408-5.

- [398] O. González, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 10–27. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.077.
- [399] Q. Sun, Y. Wang, Y. Li, M. Ashfaq, L. Dai, X. Xie, C.P. Yu, Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China, *Environ. Pollut.* 225 (2017) 542–549. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.018.
- [400] T. Fotsis, H. Adlercreutz, The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-I. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates, *J. Steroid Biochem.* 28 (1987) 203–213. doi:10.1016/0022-4731(87)90379-7.
- [401] R.L. Gomes, W. Meredith, C.E. Snape, M.A. Sephton, Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1133–1140. doi:10.1128/IAI.00133-11.
- [402] A.M.M. L. Dehennin, Long- term of testosterone administration to normal men: alternation of the urinary profile and androgen metabolites potentially useful for detection testosterone misuse in sport, *J. Steroid Biochem.* 44 (1993) 179–189. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90026-S](https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90026-S)
- [403] H. Jin, L. Zhu, Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China, *Water Res.* 103 (2016) 343–351. doi:10.1016/J.WATRES.2016.07.059.
- [404] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 701–711. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.083.

- [405] C. Schoeman, E. Cukrowska, L. Chimuka, Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South , South Africa, 44 (2018) 111–117. <https://doi.org/10.4314/wsa.v44i1.13>
- [406] J.W. Dolan, Why Do Peaks Tail?, LCGC North Am. 21 (2003) 612.
- [407] Z. Pápai, T.L. Pap, Analysis of peak asymmetry in chromatography, J. Chromatogr. A. 953 (2002) 31–38. doi:10.1016/S0021-9673(02)00121-8.
- [408] B. E., SEVENTH COMMISSION DIRECTIVE 96/45/EC of 2 July 1996 relating to methods of analysis necessary for checking the composition of cosmetic products (Text with EEA relevance), Off. J. Eur. Communities. (1996) 8–15.
- [409] B. Cartwright, J. Robinson, P.T. Seed, I. Fogelman, J. Rymer, Hormone Replacement Therapy Versus the Combined Oral Contraceptive Pill in Premature Ovarian Failure : A Randomized Controlled Trial of the Effects on Bone Mineral Density, J. Clin. Endocrinol. Metabolomics. 101 (2016) 3497–3505. doi:10.1210/jc.2015-4063.
- [410] F. Brion, C.R. Tyler, X. Palazzi, B. Laillet, J.-M. Porcher, J. Garric, P. Flammarion, Impacts of 17 $\beta$ -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile-and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*), Aquat. Toxicol. 68 (2004) 193–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.022>
- [411] S.C. Tilton, C.M. Foran, W.H. Benson, Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), Environ. Toxicol. Chem. An Int. J. 24 (2005) 352–359. <https://doi.org/10.1897/04-016R.1>
- [412] B.J. Park, K. Kidd, Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of mink frogs and green frogs in the wild and in situ, Environ. Toxicol. Chem. An Int. J. 24 (2005) 2027–2036. <https://doi.org/10.1897/04-227R.1>
- [413] J.A. Sparano, R.J. Gray, W.C. Wood, D.F. Makower, T.G. Lively, T.J. Saphner, M.M. Keane, H.L. Gomez, P.S. Reddy, T.F. Goggins, I.A. Mayer, D. Toppmeyer, A.

Brufsky, M.P. Goetz, D.F. Hayes, E.C. Dees, K.I. Pritchard, C.E. Geyer, J.A. Olson, G.W. Sledge, TAILORx: Phase III trial of chemoendocrine therapy versus endocrine therapy alone in hormone receptor-positive, HER2-negative, node-negative breast cancer and an intermediate prognosis 21-gene recurrence score., *J. Clin. Oncol.* (2018). doi:10.1200/jco.2018.36.18\_suppl.lba1.

- [414] T.W. Storer, S. Basaria, T. Traustadottir, S.M. Harman, K. Pencina, Z. Li, T.G. Travison, R. Miciek, P. Tsitouras, K. Hally, G. Huang, S. Bhasin, Effects of Testosterone Supplementation for 3 Years on Muscle Performance and Physical Function in Older Men, *J. Endocrinol. Metabolomics.* 102 (2017) 583–593. doi:10.1210/jc.2016-2771.
- [415] T.J. Runnalls, N. Beresford, E. Losty, A.P. Scott, J.P. Sumpter, Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 2077–2084. <https://doi.org/10.1021/es3048834>
- [416] T.J. Runnalls, N. Beresford, S. Kugathas, L. Margiotta-Casaluci, M. Scholze, A.P. Scott, J.P. Sumpter, From single chemicals to mixtures-Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow, *Aquat. Toxicol.* 169 (2015) 152–167. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.009.
- [417] T.J. Thrupp, T.J. Runnalls, M. Scholze, S. Kugathas, A. Kortenkamp, J.P. Sumpter, The consequences of exposure to mixtures of chemicals: Something from ‘nothing’ and ‘a lot from a little’ when fish are exposed to steroid hormones, *Sci. Total Environ.* 619 (2018) 1482–1492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.081>
- [418] J.R. Rochester, Bisphenol A and human health: a review of the literature, *Reprod. Toxicol.* 42 (2013) 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- [419] L.N. Vandenberg, M. V Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto, Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 75–95. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- [420] K. Goeury, S. Vo Duy, G. Munoz, M. Prévost, S. Sauvé, Analysis of Environmental Protection Agency priority endocrine disruptor hormones and bisphenol A in tap, surface and wastewater by online concentration liquid chromatography tandem mass

- spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (2019) 1–12. doi:10.1016/j.chroma.2019.01.016.
- [421] R.L. Gomes, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sludge batch studies, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3612–3618. <https://doi.org/10.1021/es801952h>
- [422] M. Čelić, B.D. Škrbić, S. Insa, J. Živančev, M. Gros, M. Petrović, Occurrence and assessment of environmental risks of endocrine disrupting compounds in drinking, surface and wastewaters in Serbia, *Environ. Pollut.* (2020) 114344. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114344>
- [423] P. Labadie, H. Budzinski, Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France), *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5113–5120. <https://doi.org/10.1021/es048443g>
- [424] L.M. Bexfield, P.L. Toccalino, K. Belitz, W.T. Foreman, E.T. Furlong, Hormones and pharmaceuticals in groundwater used as a source of drinking water across the United States, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 2950–2960. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05592>
- [425] S. Kleywegt, V. Pileggi, P. Yang, C. Hao, X. Zhao, C. Rocks, S. Thach, P. Cheung, B. Whitehead, Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada—occurrence and treatment efficiency, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 1481–1488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.010>
- [426] O. Golovko, Š. Pavel, G. Fedorova, H.K. Kroupová, R. Grabic, Science of the Total Environment Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI / APPI-HRPS, *Sci. Total Environ.* 621 (2018) 1066–1073. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.120.
- [427] S.C. Tan, H.K. Lee, A metal-organic framework of type MIL-101 ( Cr ) for emulsification-assisted micro-solid-phase extraction prior to UHPLC-MS / MS analysis of polar estrogens, *Microchem. Acta* 101 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3289-9>



- [428] W. Zhao, C. Liu, H. Yin, K. Qi, M. Xu, J. Yang, Y. Pan, Direct and rapid analysis of trace levels steroids in water by thermal desorption atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Methods*. 11 (2019) 1291–1418. doi:10.1039/c8ay02611d.
- [429] O.S. Olatunji, O.S. Fatoki, B.O. Opeolu, R. Ximba, Bhekumusa J. Chitongo, Determination of selected steroid hormones in some surface water around animal farms in Cape Town using HPLC-DAD, *Environ. Monit. Assess.* 363 (2017) 189. doi:10.1007/s10661-017-6070-8.
- [430] P. Braun, M. Möder, F. Lange, S. Schrader, W. Lorenz, Determination of Endocrine Disrupting Compounds and Acidic Drugs in Water by Coupling of Derivatization , Gas Chromatography and Negative- Chemical Ionization Mass Spectrometry, *CLEAN*. 35 (2007) 444–451. doi:10.1002/clen.200720001.
- [431] Z.D. Jaukovi, S.D. Gruji, I. V Mati, M.D. Lau, Determination of sterols and steroid hormones in surface water and wastewater using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *Microchem. J.* 135 (2017) 39–47. doi:10.1016/j.microc.2017.07.011.
- [432] O. Svahn, E. Björklund, Simple, fast and inexpensive large “whole water” volume sample SPE-loading using compressed air and finely ground sand, *Anal. Methods*. 11 (2019) 894–896. doi:10.1039/c8ay02786b.
- [433] S.M. Havens, C.J. Hedman, J.D.C. Hemming, M.G. Mieritz, M.M. Shafer, J.J. Schauer, Stability, preservation, and quantification of hormones and estrogenic and androgenic activities in surface water runoff, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 2481–2490. <https://doi.org/10.1002/etc.307>
- [434] G. Andaluri, R.P.S. Suri, K. Graham, Steroid hormones in environmental matrices: extraction method comparison, *Environ. Monit. Assess.* 189 (2017) 626. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6345-0>
- [435] Y. Sapozhnikova, M. Hedgespeth, E. Wirth, M. Fulton, Analysis of selected natural and synthetic hormones by LC-MS-MS using the US EPA method 1694, *Anal. Methods*. 3 (2011) 1079–1086. <https://doi.org/10.1039/C0AY00748J>

- [436] K. Aboulfadl, C. De Potter, M. Prévost, S. Sauvé, Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products , feminizing hormones and pesticides, *Chem. Cent. J.* (2010) 4–11. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-4-1>
- [437] B. Englert, *Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS*, U.S. Environ. Prot. Agency. (2007).
- [438] J.E. Renew, C. Huang, Simultaneous determination of fluoroquinolone , sulfonamide , and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1042 (2004) 113–121. doi:10.1016/j.chroma.2004.05.056.
- [439] M. Henriques, V.V. Cardoso, A.M. Rodrigues, E. Ferreira, M.J. Benoliel, C.M.M. Almeida, Simultaneous Determination of Ten Endocrine Hormone Disrupters in Water Using SPE / LC- ( ESI ) MS-MS, 2010 (2010) 818–829. doi:10.4236/jwarp.2010.29097.
- [440] M.J. Shreve, R.A. Brennan, Trace organic contaminant removal in six full-scale integrated fixed-film activated sludge (IFAS) systems treating municipal wastewater, *Water Res.* 151 (2019) 318–331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.042>.
- [441] B. Vanderford, J.E. Drewes, C. Hoppe-Jones, A. Eaton, A. Haghani, Y. Guo, S. Snyder, T. Ternes, M. Schluesener, C.J. Wood, Evaluation of analytical methods for EDCs and PPCPs via interlaboratory comparison, *Water Res. Found.* 4167 (2012).
- [442] M. Alidina, C. Hoppe-Jones, M. Yoon, A.F. Hamadeh, D. Li, J.E. Drewes, The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia, *Sci. Total Environ.* 478 (2014) 152–162. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.093>.
- [443] S.D. Winslow, B. V Pepich, M. V Bassett, S.C. Wendelken, D.J. Munch, J.L. Sinclair, Microbial Inhibitors for U.S. EPA Drinking Water Methods for the Determination of Organic Compounds, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4103–4110. doi:10.1021/es010661b.

- [444] G.A. Smith, B. V Pepich, D.J. Munch, Preservation and analytical procedures for the analysis of chloro-s-triazines and their chlorodegradate products in drinking waters using direct injection liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1202 (2008) 138–144. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.033>.
- [445] N. Migowska, M. Caban, P. Stepnowski, J. Kumirska, Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection, *Sci. Total Environ.* 441 (2012) 77–88. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.043>.
- [446] S. Wang, W. Huang, G. Fang, J. He, Y. Zhang, On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment, *Sci. Direct.* 6 (2007) 194–201. doi:[10.1016/j.aca.2007.11.030](https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.030).
- [447] K. Liao, M. Mei, H. Li, X. Huang, Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 566–575. doi:[10.1002/jssc.201501156](https://doi.org/10.1002/jssc.201501156).
- [448] J.-Y. Pailler, A. Krein, L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard, Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 4736–4743. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042>.
- [449] J.W. Dolan, How much can I inject? Part II: Injecting in solvents other than mobile phase, *LC GC NORTH Am.* 32 (2014) 854–859.
- [450] S. Keunchkarian, M. Reta, L. Romero, C. Castells, Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions, *J. Chromatogr. A.* 1119 (2006) 20–28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.006>.
- [451] Q.T. Dinh, G. Munoz, S. Vo Duy, D. Tien Do, S. Bayen, S. Sauvé, Analysis of

sulfonamides, fluoroquinolones, tetracyclines, triphenylmethane dyes and other veterinary drug residues in cultured and wild seafood sold in Montreal, Canada, *J. Food Compos. Anal.* 94 (2020) 103630. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103630>.

- [452] J.M. Montiel-león, S. Vo, G. Munoz, M. Verner, M.Y. Hendawi, H. Moya, M. Amyot, S. Sauvé, Occurrence of pesticides in fruits and vegetables from organic and conventional agriculture by QuEChERS extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Control.* 104 (2019) 74–82. doi:10.1016/j.foodcont.2019.04.027.
- [453] E. Mirmont, A. Bœuf, M. Charmel, S. Vaslin-Reimann, B. Lalère, O. Laprévotte, S. Lardy-Fontan, Development and implementation of an analytical procedure for the quantification of natural and synthetic steroid hormones in whole surface waters, *J. Chromatogr. B.* 1175 (2021) 122732. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122732>
- [454] F.N. Ferreira, A.P. Benevides, D.V. Cesar, A.S. Luna, J.S. de Gois, Magnetic solid-phase extraction and pre-concentration of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in tap water using maghemite-graphene oxide nanoparticles and determination via HPLC with a fluorescence detector, *Microchem. J.* 157 (2020) 104947. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104947>
- [455] A. Minopoli, N. Sakač, B. Lenyk, R. Campanile, D. Mayer, A. Offenhäusser, R. Velotta, B. Della Ventura, LSPR-based colorimetric immunosensor for rapid and sensitive 17 $\beta$ -estradiol detection in tap water, *Sensors Actuators B Chem.* 308 (2020) 127699. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127699>
- [456] M.A.-E. Abdallah, K.-H. Nguyen, A.J. Ebele, N.N. Atia, H.R.H. Ali, S. Harrad, A single run, rapid polarity switching method for determination of 30 pharmaceuticals and personal care products in waste water using Q-Exactive Orbitrap high resolution accurate mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1588 (2019) 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.033>
- [457] R. Vallejo-Rodríguez, P.B. Sánchez-Torres, A. López-López, E. León-Becerril, M. Murillo-Tovar, Detection of steroids in tap and drinking water using an optimized

analytical method by gas chromatography–mass spectrometry, *Expo. Heal.* 10 (2018) 189–199. <https://doi.org/10.1007/s12403-017-0254-x>

- [458] G.A. Smith, A.D. Zaffiro, M.L. Zimmerman, D.J. Munch, 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), US EPA. (2010).
- [459] B. Ng, N. Quinete, S. Maldonado, K. Lugo, J. Purrinos, H. Briceño, P. Gardinali, Understanding the occurrence and distribution of emerging pollutants and endocrine disruptors in sensitive coastal South Florida Ecosystems, *Sci. Total Environ.* 757 (2021) 143720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143720>
- [460] J.-C. Picard, G. Munoz, S.V. Duy, S. Sauvé, Longitudinal and vertical variations of waterborne emerging contaminants in the St. Lawrence Estuary and Gulf during winter conditions, *Sci. Total Environ.* 777 (2021) 146073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146073>
- [461] K.M.S. Ana, M.P. Espino, Occurrence and distribution of hormones and bisphenol A in Laguna Lake, Philippines, *Chemosphere.* 256 (2020) 127122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127122>
- [462] S.Y. Wee, A.Z. Aris, F.M. Yusoff, S.M. Praveena, Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework, *Sci. Total Environ.* 671 (2019) 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.243>
- [463] E. Pignotti, E. Dinelli, Distribution and partition of endocrine disrupting compounds in water and sediment: Case study of the Romagna area (North Italy), *J. Geochemical Explor.* 195 (2018) 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.02.008>
- [464] M.B. Campanha, A.T. Awan, D.N.R. de Sousa, G.M. Grosseli, A.A. Mozeto, P.S. Fadini, A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 7936–7947. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3929-x>

- [465] M. Nie, C. Yan, W. Dong, M. Liu, J. Zhou, Y. Yang, Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary, *Chemosphere*. 127 (2015) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.021>
- [466] C.P. Silva, D.L.D. Lima, R.J. Schneider, M. Otero, V.I. Esteves, Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in complex aqueous matrices, *J. Environ. Manage.* 124 (2013) 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.041>
- [467] U.S. Environmental Protection Agency, Method 1698 : Steroids and Hormones in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HRGC / HRMS, (2007).
- [468] T. european Commission, Commission implementing decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018, *Off. J. Eur. Union*. (2018) 5–8.
- [469] A. González, K.J. Kroll, C. Silva-Sanchez, P. Carriquiriborde, J.I. Fernandino, N.D. Denslow, G.M. Somoza, Steroid hormones and estrogenic activity in the wastewater outfall and receiving waters of the Chascomús chained shallow lakes system (Argentina), *Sci. Total Environ.* 743 (2020) 140401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140401>
- [470] K. Zhang, K. Fent, Determination of two progestin metabolites ( 17  $\alpha$  - hydroxypregnanolone and pregnanediol ) and different classes of steroids ( androgens , estrogens , corticosteroids , progestins ) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem, *Sci. Total Environ.* 610–611 (2018) 1164–1172. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.114.
- [471] S. Comtois-Marotte, T. Chappuis, S. Vo Duy, N. Gilbert, A. Lajeunesse, S. Taktek, M. Desrosiers, É. Veilleux, S. Sauvé, Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high resolution mass spectrometry with a Q Exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay, *Chemosphere*. 166 (2017) 400–411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.077>.
- [472] T. Manickum, W. John, The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in

wastewater in South Africa, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4949–4970.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8546-0>

- [473] V. Bellet, G. Hernandez-Raquet, S. Dagnino, L. Seree, P. Pardon, C. Bancon-Montiny, H. Fenet, N. Creusot, S. A??t-A??ssa, V. Cavailles, H. Budzinski, J.P. Antignac, P. Balaguer, Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors, *Water Res.* 46 (2012) 1912–1922. doi:10.1016/j.watres.2012.01.013.
- [474] R. Appa, V.A. Mhaisalkar, A. Bafana, S.S. Devi, K. Krishnamurthi, Simultaneous quantitative monitoring of four indicator contaminants of emerging concern ( CEC ) in different water sources of Central India using SPE / LC- ( ESI ) MS-MS, *Environ. Monit. Assess.* 489 (2018) 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6867-0>
- [475] R. Guedes-alonso, L. Ciofi, Z. Sosa-ferrera, J.J. Santana-rodríguez, A. Kabir, K.G. Furton, Determination of androgens and progestogens in environmental and biological samples using fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1437 (2016) 116–126. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.077.
- [476] S. Xue, L. Goh, A. Duarah, L. Zhang, S.A. Snyder, H. Kee, Online solid phase extraction with liquid chromatography – tandem mass spectrometry for determination of estrogens and glucocorticoids in water, *J. Chromatogr. A.* 1465 (2016) 9–19. doi:10.1016/j.chroma.2016.08.040.
- [477] Q. Yu, J. Geng, X. Zong, Y. Zhang, K. Xu, H. Hu, Y. Deng, F. Zhao, H. Ren, Occurrence and removal of progestagens in municipal wastewater treatment plants from different regions in China, *Sci. Total Environ.* 668 (2019) 1191–1199. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.327.
- [478] T. Anumol, S.A. Snyder, Rapid analysis of trace organic compounds in water by automated online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Talanta.* 132 (2015) 77–86. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.011.
- [479] V. Kumar, N. Nakada, M. Yasojima, N. Yamashita, A.C. Johnson, H. Tanaka, *Chemosphere* Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water

matrices by liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Chemosphere*. 77 (2009) 1440–1446. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.052.

- [480] X. Yuan, T. Li, L. Zhou, X. Zhao, Characteristics and risk assessment of estrogenic compounds in rivers of southern Jiangsu province, China, *Ieri Procedia*. 9 (2014) 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.ieri.2014.09.059>
- [481] P. Avar, G. Maasz, P. Takács, S. Lovas, Z. Zrinyi, R. Svigruha, A. Takátsy, L.G. Tóth, Z. Pirger, HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 123–127. doi:10.1002/dta.1829.
- [482] Y. Mei, M. Youning, G. Wenjun, R. Yiping, Z. Guonian, L. Yihua, Analytical Methods Determination of 26 endocrine disrupting chemicals in fish and water using modified QuEChERS combined with solid-phase extraction, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8418–8431. doi:10.1039/c5ay01082a.
- [483] A. De Oliveira, L.J.P. Izeppi, R.F. Loose, D.K. Muenchen, O.D. Prestes, R. Zanella, Analytical Methods A multiclass method for the determination of extraction and ultra-high performance liquid, *Anal. Methods*. 11 (2019) 2333–2340. doi:10.1039/c9ay00289h.
- [484] C. Robert, A. Bolduc, C. DeBlois, Résultats du suivi des produits pharmaceutiques et de soins personnels ainsi que des hormones dans des eaux usées, de l'eau de surface et de l'eau potable au Québec, 2009.
- [485] S. Barreca, M. Busetto, L. Colzani, L. Clerici, D. Daverio, P. Dellavedova, S. Balzamo, E. Calabretta, V. Ubaldi, A. Regionale, L. Arpa, U.O.C.L. Milano, S. Laboristica, Determination of estrogenic endocrine disruptors in water at sub-ng L – 1 levels in compliance with Decision 2015 / 495 / EU using offline-online solid phase extraction concentration coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrom, *Microchem. J.* 147 (2019) 1186–1191. doi:10.1016/j.microc.2019.04.030.
- [486] S. Tavazzi, B. Paracchini, G. Suurkuusk, G. Mariani, R. Loos, M. Ricci, B. Gawlik, Water Framework Directive Watch List Method, *Comm. Eur.* (2014).



- [487] S. Tavazzi, M. Ricci, B. Paracchini, H. Skejo, B.M. Gawlik, Water Framework Directive Watch list method Analytical method for the determination of compounds selected for the first Surface water watch list, *Comm. Eur.* (2016). doi:10.2788/85401.
- [488] A.C. Johnson, E. Dumont, R.J. Williams, R. Oldenkamp, I. Cisowska, J.P. Sumpter, Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards?, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 12297–12304. <https://doi.org/10.1021/es4030035>
- [489] K. Goeur, S. Vo Duy, G. Munoz, M. Prévost, S. Sauvé, Data supporting the optimization of liquid chromatography tandem mass spectrometry conditions to analyze EPA-priority hormones and bisphenol A in water samples, *Data Br.* 24 (2019) 1–9. doi:10.1016/j.dib.2019.103958.
- [490] Y. Lin, C. Chen, G. Wang, Analysis of steroid estrogens in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, *Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1973–1983. <https://doi.org/10.1002/rcm.3050>
- [491] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). *Contraceptive Use by Method 2019: Data Booklet (ST/ESA/SER.A/435)*., 2019.
- [492] R. Bonfiglio, M.L. Di Pietro, The impact of oral contraceptive use on breast cancer risk: State of the art and future perspectives in the era of 4P medicine, *Semin. Cancer Biol.* 72 (2021) 11–18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.10.008>.
- [493] T. Deli, M. Orosz, A. Jakab, Hormone replacement therapy in cancer survivors—review of the literature, *Pathol. Oncol. Res.* (2019) 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-00569-x>
- [494] S. Rogers, J. Haines, Detecting and mitigating the environmental impact of fecal pathogens originating from confined animal feeding operations, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and ..., 2005.
- [495] S. Liu, G.-G. Ying, R.-Q. Zhang, L.-J. Zhou, H.-J. Lai, Z.-F. Chen, Fate and

- occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems, *Environ. Pollut.* 170 (2012) 190–201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.016>.
- [496] J.-N. Zhang, J. Chen, L. Yang, M. Zhang, L. Yao, Y.-S. Liu, J.-L. Zhao, B. Zhang, G.-G. Ying, Occurrence and fate of androgens, progestogens and glucocorticoids in two swine farms with integrated wastewater treatment systems, *Water Res.* 192 (2021) 116836. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116836>.
- [497] X. Yang, X. He, H. Lin, X. Lin, J. Mo, C. Chen, X. Dai, D. Liao, C. Gao, Y. Li, Occurrence and distribution of natural and synthetic progestins, androgens, and estrogens in soils from agricultural production areas in China, *Sci. Total Environ.* 751 (2021) 141766. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141766>
- [498] S. Biswas, W.L. Kranz, C.A. Shapiro, D.D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, M. Mamo, D.D. Tarkalson, T.C. Zhang, D.P. Shelton, S.J. van Donk, T.L. Mader, Effect of rainfall timing and tillage on the transport of steroid hormones in runoff from manure amended row crop fields, *J. Hazard. Mater.* 324 (2017) 436–447. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.009>.
- [499] B. Yao, R. Li, S. Yan, S.-A. Chan, W. Song, Occurrence and estrogenic activity of steroid hormones in Chinese streams: A nationwide study based on a combination of chemical and biological tools, *Environ. Int.* 118 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.026>
- [500] A. Nasri, A. Mezni, P.-A. Lafon, A. Wahbi, N. Cubedo, P. Clair, A.H. Harrath, H. Beyrem, M. Rossel, V. Perrier, Ethinylestradiol (EE2) residues from birth control pills impair nervous system development and swimming behavior of zebrafish larvae, *Sci. Total Environ.* 770 (2021) 145272. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145272>.
- [501] I.A. Lang, T.S. Galloway, A. Scarlett, W.E. Henley, M. Depledge, R.B. Wallace, D. Melzer, Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults, *JAMA.* 300 (2008) 1303–1310. doi:[10.1001/jama.300.11.1303](https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303).

- [502] M. del Olmo, A. González-Casado, N.A. Navas, J.L. Vilchez, Determination of bisphenol A (BPA) in water by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 346 (1997) 87–92. doi:[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00182-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00182-7).
- [503] A. Ullah, M. Pirzada, T. Afsar, S. Razak, A. Almajwal, S. Jahan, Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats, *Environ. Health Prev. Med.* 24 (2019) 41. doi:10.1186/s12199-019-0797-5.
- [504] J. Vymazal, T. Březinová, M. Koželuh, Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic, *Sci. Total Environ.* 536 (2015) 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.077>
- [505] M.-F. Morissette, S.V. Duy, H.P.H. Arp, S. Sauvé, Sorption and desorption of diverse contaminants of varying polarity in wastewater sludge with and without alum, *Environ. Sci. Process. Impacts.* 17 (2015) 674–682. <https://doi.org/10.1039/C4EM00620H>
- [506] D.J. Marcogliese, C. Blaise, D. Cyr, Y. de Lafontaine, M. Fournier, F. Gagné, C. Gagnon, C. Hudon, Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study, *Ambio.* 44 (2015) 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9.
- [507] C. Blaise, F. Gagné, M. Salazar, S. Salazar, S. Trottier, P.D. Hansen, LONG TERM EXPOSURE OF FRESHWATER MUSSELS TO A MUNICIPAL EFFLUENT PLUME LEADS TO FEMINISATION., *Fresenius Environ. Bull.* (2003).
- [508] F. Gagné, B. Bouchard, C. André, E. Farcy, M. Fournier, Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 153 (2011) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.002>
- [509] B. Bouchard, F. Gagné, M. Fortier, M. Fournier, An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 150 (2009) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.002>

- [510] D.J. Caldwell, F. Mastrocco, T.H. Hutchinson, R. Länge, D. Heijerick, C. Janssen, P.D. Anderson, J.P. Sumpter, Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7046–7054. <https://doi.org/10.1021/es800633q>
- [511] D.J. Caldwell, F. Mastrocco, P.D. Anderson, R. Länge, J.P. Sumpter, Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 1396–1406. <https://doi.org/10.1002/etc.1825>
- [512] M. Patoine, Suivi exploratoire des stéroïdes et des phénols dans les petits tributaires agricoles au Québec – 2003 à 2011, 2018.
- [513] K. Goeury, S.V. Duy, G. Munoz, M. Prévost, S. Sauvé, Assessment of automated off-line solid-phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater, *Talanta.* (2022) 123216. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>
- [514] J.M. Montiel-leon, G. Munoz, S. Vo, D. Tien, M. Vaudreuil, K. Goeury, F. Guillemette, M. Amyot, S. Sauvé, Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and, *Environ. Monit. Assess.* 250 (2019) 29–39. doi:10.1016/j.envpol.2019.03.125.
- [515] Z. Huang, J.-L. Zhao, Y.-Y. Yang, Y.-W. Jia, Q.-Q. Zhang, C.-E. Chen, Y.-S. Liu, B. Yang, L. Xie, G.-G. Ying, Occurrence, mass loads and risks of bisphenol analogues in the Pearl River Delta region, South China: Urban rainfall runoff as a potential source for receiving rivers, *Environ. Pollut.* 263 (2020) 114361. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114361>.
- [516] D.R. Helsel, *Statistics for censored environmental data using Minitab and R*, John Wiley & Sons, 2011.
- [517] C. Huston, E. Juarez-Colunga, *Guidelines for computing summary statistics for datasets containing non-detects*, *Bulkley Val. Res. Cent.* (2009).
- [518] L. Lee, *NADA: Nondetects and data analysis for environmental data*, R Packag.

Version. 1 (2017).

- [519] C.J. Banta-Green, A.J. Brewer, C. Ort, D.R. Helsel, J.R. Williams, J.A. Field, Using wastewater-based epidemiology to estimate drug consumption—Statistical analyses and data presentation, *Sci. Total Environ.* 568 (2016) 856–863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.052>
- [520] C. Hudon, R. Carignan, Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65 (2008) 1165–1180. <https://doi.org/10.1139/F08-069>
- [521] X. Liu, J. Shi, T. Bo, Y. Meng, X. Zhan, M. Zhang, Y. Zhang, Distributions and ecological risk assessment of estrogens and bisphenol A in an arid and semiarid area in northwest China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 7216–7225. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8434-6>
- [522] K. He, E. Hain, A. Timm, M. Tarnowski, L. Blaney, Occurrence of antibiotics, estrogenic hormones, and UV-filters in water, sediment, and oyster tissue from the Chesapeake Bay, *Sci. Total Environ.* 650 (2019) 3101–3109. [doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.021](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.021).
- [523] G. Reichert, S. Hilgert, S. Fuchs, J.C.R. Azevedo, Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America, *Environ. Pollut.* 255 (2019) 113140. [doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140).
- [524] C. Deich, H.C. Frazão, J.-S. Appelt, W. Li, T. Pohlmann, J.J. Waniek, Occurrence and distribution of estrogenic substances in the northern South China Sea, *Sci. Total Environ.* 770 (2021) 145239. [doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145239](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145239).
- [525] Z. Tang, Z. Liu, H. Wang, Z. Dang, Y. Liu, A review of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in surface water across 32 countries: Sources, concentrations, and potential estrogenic effects, *J. Environ. Manage.* 292 (2021) 112804. [doi:https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112804](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112804).
- [526] Z. Tang, Z. Liu, Y. Wan, H. Wang, Z. Dang, Y. Liu, Far-Less Studied Natural

Estrogens as Ignored Emerging Contaminants in Surface Water: Insights from Their Occurrence in the Pearl River, South China, *ACS ES&T Water*. (2021). doi:10.1021/acsestwater.1c00109.

- [527] K. Fent, Progesterins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment, *Environ. Int.* 84 (2015) 115–130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.012>.
- [528] H. Yang, G. Lu, Z. Yan, J. Liu, H. Dong, R. Jiang, R. Zhou, P. Zhang, Y. Sun, M. Nkoom, Occurrence, spatial-temporal distribution and ecological risks of pharmaceuticals and personal care products response to water diversion across the rivers in Nanjing, China, *Environ. Pollut.* 255 (2019) 113132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113132>.
- [529] E. and C.C. Canada, Canadian Environmental Protection Act , 1999 Federal Environmental Quality Guidelines Bisphenol A, (2017).
- [530] C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter, Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works, *Chem. Ecol.* 8 (1994) 275–285. doi:10.1080/02757549408038554.
- [531] P.D. Hansen, H. Dizer, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. McMaster, C. Blaise, Vitellogenin - A biomarker for endocrine disruptors, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 448–451. doi:10.1016/S0165-9936(98)00020-X.
- [532] G.C. de Souza, C.S. Fahning, V. Hatje, G.O. da Rocha, A Reliable and Cost-Effective Method for Determination of Endocrine-Disrupting Compounds in Coastal Waters, Suspended Particulate Matter, and Sediments by Ultrafast Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array and Fluorescence Detectors, (2021). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210108>
- [533] M. Nie, Y. Yang, M. Liu, C. Yan, H. Shi, W. Dong, J.L. Zhou, Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 785–791. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.010>.

- [534] K.M. Sta. Ana, M.P. Espino, Occurrence and distribution of hormones and bisphenol A in Laguna Lake, Philippines, *Chemosphere*. 256 (2020) 127122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127122>.
- [535] T.-S. Chen, T.-C. Chen, K.-J.C. Yeh, H.-R. Chao, E.-T. Liaw, C.-Y. Hsieh, K.-C. Chen, L.-T. Hsieh, Y.-L. Yeh, High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3223–3230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.054>.
- [536] S. Wang, Z. Zhu, J. He, X. Yue, J. Pan, Z. Wang, Steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in surface water of Bahe River, China: Distribution, bioaccumulation, risk assessment and estrogenic effect on *Hemiculter leucisculus*, *Environ. Pollut.* 243 (2018) 103–114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.063>.
- [537] K.S. Machado, F.D. Cardoso, J.C.R. Azevedo, C.B. Braga, < b> Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba, Paraná State, Brazil, *Acta Sci. Technol.* 36 (2014) 421–427. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i3.18477>
- [538] T. Hintemann, C. Schneider, H.F. Schöler, R.J. Schneider, Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment, *Water Res.* 40 (2006) 2287–2294. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.028>
- [539] M.J. Rocha, C. Cruzeiro, M. Reis, M.Â. Pardal, E. Rocha, Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area, *Environ. Monit. Assess.* 186 (2014) 3337–3350. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3621-0>
- [540] G. Wang, P. Ma, Q. Zhang, J. Lewis, M. Lacey, Y. Furukawa, S.E. O'Reilly, S. Meaux, J. McLachlan, S. Zhang, Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 1353–1364. <https://doi.org/10.1039/C2EM30095H>
- [541] W.J. Backe, An ultrasensitive (parts-per-quadrillion) and SPE-free method for the quantitative analysis of estrogens in surface water, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015)

14311–14318. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04949>

- [542] P. Chakraborty, N.W. Shappell, M. Mukhopadhyay, S. Onanong, K.R. Rex, D. Snow, Surveillance of plasticizers, bisphenol A, steroids and caffeine in surface water of River Ganga and Sundarban wetland along the Bay of Bengal: occurrence, sources, estrogenicity screening and ecotoxicological risk assessment, *Water Res.* 190 (2020) 116668. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116668>
- [543] O. Golovko, Š. Pavel, G. Fedorova, H.K. Kroupová, R. Grabic, Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI / APPI-HRPS, 621 (2018) 1066–1073. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.120.
- [544] J. Margot, C. Kienle, A. Magnet, M. Weil, L. Rossi, L.F. De Alencastro, C. Abegglen, D. Thonney, N. Chèvre, M. Schärer, Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon?, *Sci. Total Environ.* 461 (2013) 480–498. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.034>
- [545] M.M. Huber, A. Göbel, A. Joss, N. Hermann, D. Löffler, C.S. McArdell, A. Ried, H. Siegrist, T.A. Ternes, U. von Gunten, Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4290–4299. doi:10.1021/es048396s.
- [546] E.C. Wert, F.L. Rosario-Ortiz, S.A. Snyder, Effect of ozone exposure on the oxidation of trace organic contaminants in wastewater, *Water Res.* 43 (2009) 1005–1014. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.050>.
- [547] J. Völker, M. Stapf, U. Miehe, M. Wagner, Systematic Review of Toxicity Removal by Advanced Wastewater Treatment Technologies via Ozonation and Activated Carbon, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 7215–7233. doi:10.1021/acs.est.9b00570.
- [548] D. Stalter, A. Magdeburg, M. Weil, T. Knacker, J. Oehlmann, Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout, *Water Res.* 44 (2010) 439–448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.025>.
- [549] A. Magdeburg, D. Stalter, J. Oehlmann, Whole effluent toxicity assessment at a



wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species, *Chemosphere*. 88 (2012) 1008–1014. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.017>.

- [550] S.G. Zimmermann, M. Wittenwiler, J. Hollender, M. Krauss, C. Ort, H. Siegrist, U. von Gunten, Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection, *Water Res.* 45 (2011) 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.080>