

Université de Montréal

**Analyse par spectrométrie de masse d'hormones  
stéroïdiennes dans les eaux usées et abattement par  
oxydation chimique**

**par Paul B. Fayad**

**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

décembre 2013

© Paul B. Fayad, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Analyse par spectrométrie de masse d'hormones stéroïdiennes dans les eaux usées et  
abattement par oxydation chimique

présentée par :  
Paul B. Fayad

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Thibault, président-rapporteur  
Sébastien Sauvé, directeur de recherche  
Michèle Prévost, co-directrice de recherche  
Karen Waldron, membre du jury  
Hubert Cabana, examinateur externe  
Jean-François Pflieger, représentant du doyen de la FAS

## Résumé

---

Les preuves quant aux effets des hormones stéroïdiennes sur l'écosystème aquatique et terrestre sont clairement démontrées dans la littérature et ce à des concentrations très faibles. Les sources responsables du déversement de ces composés dans l'environnement aquatique sont multiples et découlent majoritairement de leur consommation autant humaine qu'animale. Diverses maladies chez l'humain sont soupçonnées d'être le résultat de l'exposition aux hormones stéroïdiennes et autres perturbateurs endocriniens. Le risque associé à des années d'exposition, avec les éventuels effets cumulatifs ou synergiques de ces substances, ne doit pas être ignoré et une approche préventive plutôt que réactive doit être adoptée.

Dans cette optique, de nouvelles méthodes analytiques ont été développées pour permettre la détection et la quantification des hormones stéroïdiennes dans les eaux de surface et les eaux usées. La première méthode proposée se base sur la diode laser à désorption thermique munie d'une source à ionisation à pression atmosphérique, LDTD-APCI, couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'avantage de la LDTD-APCI est le temps d'analyse très court, soit 15 secondes par échantillon, comparativement à plusieurs minutes par les méthodes séparatives conventionnelles par chromatographie gazeuse ou liquide. Les paramètres impliqués dans l'optimisation de la source LDTD-APCI sont discutés afin de mieux comprendre leur impact sur l'efficacité de l'ionisation et le développement de la méthode. La pré-concentration d'échantillons d'eau de surface a été effectuée par une extraction sur phase solide (SPE) manuelle afin de valider la méthode d'analyse et de montrer son applicabilité pour des échantillons réels. La LDTD-APCI-MS/MS permet d'atteindre des limites de détection entre 13 et 43 ng L<sup>-1</sup>. La seconde approche proposée est le développement d'une méthode par SPE automatisée couplée à la chromatographie liquide (LC) avec la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les volumes d'injections peuvent se faire entre 1 et 10 mL, en fonction de la concentration attendue des hormones stéroïdiennes et du type de matrice. L'analyse des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées a été effectuée pour deux usines avec différents modes de traitement. L'impact de l'étape de pré-traitement de l'échantillon, c'est-à-dire l'étape de filtration et la préservation de l'échantillon ont également été étudiés. La SPE-LC-APCI-

MS/MS a permis d'obtenir des résultats reproductibles avec un important gain de temps (15 min par échantillon), comparativement à la SPE manuelle suivi d'une analyse par LC-MS/MS. Les limites de détections obtenues dans les eaux usées étaient entre 8 et 60 ng L<sup>-1</sup>.

Dans l'objectif de trouver des solutions pour éliminer les hormones stéroïdiennes dans les usines de traitements d'eau potable, leur oxydation par le chlore et le potassium de permanganate a été considérée. L'impact du pH, de la nature de l'eau (eau ultrapure versus eau usée) et de la température sur les constantes de vitesse d'oxydation du deuxième ordre a été évalué et discuté. Les rendements d'oxydation des oestrogènes par le chlore était entre 53% et 97% avec des temps de demi-vies entre 0.6 et 53 min alors que pour les progestagènes avec le potassium permanganate l'abattement variait de 78 à 97% avec des demi-vies de 10 à 60 min.

**Mot-clés :** hormones stéroïdiennes, diode laser à désorption thermique, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, oxydation, chlore, permanganate.

## **Abstract**

---

The effect of steroid hormones on the aquatic and terrestrial environment is well documented and can occur at very low concentrations. The primary sources responsible for their introduction in the environment are numerous, but they originate mainly from human and animal releases. Several human health issues are thought to be the result of exposure to steroid hormones as well as other endocrine disruptive compounds. The risks associated with years of exposure, in conjunction with the cumulative or synergic effect of these substances, must not be ignored. Therefore, a pro-active, rather than reactive, approach should be considered.

With this in mind, new analytical methods were developed for the detection and quantification of steroid hormones in surface and waste waters. The first was based on a novel sample introduction method, the laser diode thermal desorption with an atmospheric chemical ionization source, the LDTD-APCI, coupled with tandem mass spectrometry

(MS/MS). The main advantages of the LDTD-APCI is the short analysis time, i.e. 15 seconds per sample, because no chromatographic separation is used prior to ionization. The optimization of several parameters (laser power, laser pattern, transfer gas flow rate as well as deposition volume and solvent) involved in the LDTD-APCI source are discussed in order to better understand their impact on the efficiency of ionization and method development. The sample pre-concentration of analytes in surface water was performed by manual solid phase extraction (SPE) to demonstrate method applicability to real environmental samples. The LDTD-APCI-MS/MS method detection limits range from 13 to 43 ng L<sup>-1</sup> for the selected steroid hormones. The second approach consisted of an on-line SPE method followed by liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry LC-MS/MS with injection volumes ranging from 1 to 10 mL, depending upon the expected steroid hormone concentrations and matrix type. The method was applied to wastewater samples from two treatment plants with different processes. The role of sample pre-treatment, i.e. the filtration step and conservation conditions, on the analyses was evaluated. The on-line SPE-LC-MS/MS gave reproducible values while reducing sample preparation time (15 min per sample), compared to manual SPE followed by an LC-MS/MS analysis. The limits of detection of the method for the selected steroid hormones ranged from 8 to 60 ng L<sup>-1</sup>.

In order to better eliminate the selected steroid hormones in drinking water treatment plants, their oxidation by chlorine and potassium permanganate was determined. The effect of pH, temperature and type of water matrix (ultrapure versus wastewater) on the second order rate constants was assessed and discussed. The oxidation yields by chlorine for estrogens were between 53 and 97% with half-lives from 0.6 min to 53 min, whereas for progestogens with potassium permanganate the corresponding yields ranged from 78 to 94% with half-lives ranging from 10 min and 60 min.

**Keywords :** steroid hormones, laser diode thermal desorption, liquid chromatography, mass spectrometry, oxidation, chlorine, permanganate.

# Table des matières

---

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux supplémentaires</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Liste des figures supplémentaires</b> .....	<b>xx</b>
<b>Liste d'abréviations, sigles et acronymes</b> .....	<b>xxiv</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxxii</b>
<b>Chapitre 1 Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
1.1 Les contaminants «émergents» .....	2
1.1.1 Que sont-ils et d'où viennent-ils ? .....	2
1.1.2 Occurrences, concentrations et risques environnementaux .....	5
1.2 Les perturbateurs endocriniens (EDCs) .....	7
1.2.1 Concept et définitions .....	7
1.2.1.1 Modes d'action, sources et activités.....	8
1.2.1.2 Effets toxicologiques complexes.....	10
1.3 Les hormones stéroïdiennes .....	15
1.3.1 Bref historique.....	15
1.3.2 Structure et fonction physiologique .....	17
1.3.3 Les hormones stéroïdiennes oestrogéniques et progestagéniques .....	21
1.3.3.1 Propriétés physico-chimiques, sources et devenir environnemental	23
1.3.3.2 Occurrence.....	29
1.4 Les traitements des hormones dans les stations d'épuration .....	35
1.4.1 Procédés physiques/biologiques.....	36
1.4.2 Oxydation.....	39
1.5 Méthode de préparation de l'échantillon pour l'analyse des hormones dans l'eau	47
1.5.1 L'extraction sur phase solide automatisée en ligne (on-line SPE).....	47

1.5.2	Méthodes instrumentales d'analyse des hormones .....	50
1.5.2.1	La chromatographie liquide pour l'analyse des hormones .....	52
1.5.2.2	La spectrométrie de masse (MS).....	56
1.5.2.3	L'analyseur : le quadripôle simple et triple.....	61
1.5.2.4	La désorption thermique à diode laser (LDTD).....	66
1.6	Structure de la thèse .....	74
<b>Chapitre 2 Optimisation et validation d'une méthode d'analyse des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées par désorption thermique à laser diode couplée à la spectrométrie de masse en tandem .....</b>		<b>76</b>
	Abstract .....	77
2.1	Introduction.....	78
2.2	Methods.....	79
2.2.1	Chemicals, Reagents and Stock Solutions .....	79
2.2.2	Solid-Phase Extraction .....	80
2.2.3	LDTD-APCI-MS/MS.....	80
2.2.4	Data Analysis and Method Validation .....	81
2.3	Results and discussion .....	83
2.3.1	LDTD/APCI Physical Parameters Optimization .....	83
2.3.2	Method Application and Validation.....	87
2.4	Conclusion .....	92
2.5	Acknowledgments.....	92
2.6	Supplementary material .....	93
2.6.1	Principles of the LDTD/APCI Source .....	94
<b>Chapitre 3 Méthode automatisé de pré-concentration couplée à la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse d'hormones stéroïdiennes dans les eaux usées urbaines.....</b>		<b>101</b>
	Abstract .....	102
3.1	Introduction.....	103
3.2	Experimental.....	105
3.2.1	Chemicals, reagents and stock solutions.....	105
3.2.2	Instrumental conditions.....	106
3.2.2.1	On-line solid phase extraction and chromatographic conditions .....	106
3.2.2.2	Mass spectrometry .....	107

3.2.3	Data analysis and method validation.....	108
3.2.4	Sample collection, preparation and quantification.....	111
3.3	Results and discussion .....	112
3.3.1	Sample storage and filtration conditions.....	112
3.3.2	Optimization of the on-line SPE procedure .....	117
3.3.2.1	SPE loading speed and breakthrough volume.....	117
3.3.2.2	SPE matrix effect and recovery.....	120
3.3.3	Chromatographic and MS/MS conditions.....	122
3.3.4	On-line SPE-LC-APCI-MS/MS method validation.....	125
3.3.5	Method application to environmental samples .....	128
3.4	Conclusion .....	131
3.5	Novelty statement .....	131
3.6	Acknowledgments.....	132
3.7	Supplementary material .....	133
<b>Chapitre 4 Dégradation oxydative des hormones progestagéniques par le permanganate de potassium dans les eaux potables .....</b>		<b>146</b>
	Abstract .....	147
4.1	Introduction.....	149
4.2	Experimental.....	152
4.2.1	Chemicals.....	152
4.2.2	Water quality characterization .....	153
4.2.3	Analytical methods.....	153
4.2.4	Laboratory bench-scale experiments.....	154
4.2.5	Determination of rate constants for the reaction potassium permanganate.....	155
4.3	Results and Discussion .....	156
4.3.1	Permanganate decay in ultrapure and drinking water .....	156
4.3.2	Oxidation of steroid hormones.....	157
4.3.3	Effect of temperature on kinetic rate constants.....	163
4.3.4	Removal efficiencies and half-life .....	165
4.4	Conclusion .....	166
4.5	Competing interests .....	167
4.6	Authors' contributions .....	167



4.7	Acknowledgements.....	167
4.8	Supplementary material .....	169
4.8.1	LDTD-APCI Source Principles.....	170
<b>Chapitre 5 Dégradation des hormones stéroïdiennes oestrogénique par le chlore et l'impact du bromure sur leurs cinétiques d'oxydation.....</b>		<b>175</b>
5.1	Introduction.....	177
5.2	Materials and Methods.....	179
5.2.1	Chemicals, Reagents and Stock Solutions .....	179
5.2.2	Water quality characterization .....	180
5.2.3	Analytical methods.....	181
5.2.3.1	LDTD-APCI-MS/MS.....	181
5.2.3.2	LC-APCI-MS/MS .....	181
5.2.3.3	Chlorine residual analysis .....	182
5.2.4	Bench-scale experiments.....	182
5.2.5	Determination of rate constants for the reaction with chlorine.....	183
5.3	Results and discussion .....	184
5.3.1	Chlorine decay in Milli-Q water and natural waters.....	184
5.3.2	Rate constant of chlorination without bromide: influence of pH and NOM	185
5.3.3	Rate constant of chlorination with bromide: influence of pH and NOM...	189
5.3.4	Removal efficiencies and half-lives .....	190
5.3.5	Implications for water treatment plants.....	191
5.4	Conclusion .....	194
5.5	Acknowledgements.....	194
5.6	Supporting information.....	194
5.7	Supplementary material .....	195
5.7.1	LDTD-APCI Source Principles.....	196
5.7.2	Brief review of other oxidation processes used for estrogens and other phenolic compounds .....	197
5.7.3	Oxidation of estrogenic steroid hormones .....	198
<b>Chapitre 6 Conclusion.....</b>		<b>207</b>
6.1	Conclusion .....	208
6.2	Perspectives.....	210

Bibliographie .....	213
Annexe 1 .....	xxv
Annexe 2 .....	xxv
Annexe 3 .....	xxv
Annexe 4 .....	xxviii

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1-1</b> Effets observés sur plusieurs espèces exposés à des EDCs environnementaux.....	12
<b>Tableau 1-2</b> Les cinq classes de HS avec leurs structures générales, leurs noms triviaux ainsi que les acronymes pour leurs molécules les plus connues et leurs rôles physiologiques chez les animaux (R correspond au groupement fonctionnel et L correspond au type de liaison). .....	19
<b>Tableau 1-3</b> Concentration (ng L <sup>-1</sup> ) des hormones stéroïdiennes oestrogéniques et progestagéniques dans les eaux de surfaces de Laval (Québec, Canada, Mille Îles) et de Montréal (Québec, Canada, St-Laurent) ainsi que les affluents (collecteurs Nord et Sud) et les effluents de la station des eaux usées de la ville de Montréal (tiré de Viglino <i>et al.</i> [98]). .....	23
<b>Tableau 1-4</b> Propriétés physico-chimiques des oestrogènes et progestatifs ciblés.....	25
<b>Tableau 1-5</b> Description des propriétés pour les procédés membranaires.....	39
<b>Tableau 1-6</b> Potentiels rédox (E <sup>0</sup> ) d'agents oxydants utilisés pour traiter les eaux usées .....	40
<b>Tableau 1-7</b> Compilation de l'efficacité moyenne (%) des différents traitements pour l'élimination des hormones dans les matrices d'eau.....	46
<b>Tableau 1-8</b> Paramètres chromatographiques calculés pour les deux colonnes Hypersil GOLD <sup>TM</sup> évaluées pour l'analyse des hormones, soit celle à 1.9 µm (2.1 × 100 mm) et à 3.0 µm (2.1 × 100 mm). .....	55
<b>Tableau 1-9</b> Détails des réactions impliquées dans l'ionisation par APCI en mode positif (+) et négatif (-) (adapté de Kostianen [265]). .....	58
<b>Tableau 1-10</b> Paramètres MS/MS des hormones oestrogénique et progestagéniques par APCI en mode négatif et positif.....	66
<b>Tableau 2-1</b> Linearity (Coefficient of Determination), Sensitivity, Instrumental Limits of Detection (IDL) and Method Detection Limits (MDL) of the LDTD/APCI-MS/MS Method for the Selected Steroid Hormones in Negative (NI) and Positive (PI) Ionization Modes. ....	90
<b>Tableau 2-2</b> LDTD/APCI-MS/MS Analysis of Known Amounts of Selected Steroid Hormones Spiked Diluted Wastewater Effluent Samples with Associated Bias	

Values along with Method Intraday and Interday Precision in Negative (NI) and Positive Ionization Modesa.....	91
<b>Tableau 3-1</b> Valve program, on-line SPE (loading pump) and LC (analytical pump) gradient elution conditions used for the pre-concentration and separation of selected steroid hormones.....	107
<b>Tableau 3-2</b> MS/MS optimized parameters for the analysis of selected steroid hormone analytes in positive (PI) ionization mode.....	108
<b>Tableau 3-3</b> Calculated process efficiency (PE) for the selected steroid hormones for the on-line SPE-LC-APCI-MS/MS method.....	121
<b>Tableau 3-4</b> Method validation results for linearity (R <sup>2</sup> ), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for HPLC grade water, effluent (Effl) wastewater and affluent (Affl) wasterwater.....	125
<b>Tableau 3-5</b> Retention times and method validation for precision (inter-day) and accuracy (bias) for two concentration levels (QC 1 and QC 2) for the selected steroid hormonesa.....	126
<b>Tableau 3-6</b> Analytical performance of the described herein method compared to previously reported on-line SPE-LC-MS/MS methods for the detection of steroid hormones.....	128
<b>Tableau 3-7</b> Concentration of detected selected steroid hormones in WWTP-A and WWTP-B according to sampling timesa,b.....	130
<b>Tableau 4-1</b> First-order apparent rate constants ( $k$ , sec <sup>-1</sup> ) for permanganate decay with and without progestagens in drinking waters at 22 ± 2°C for pH 6.3 (DWTP B, DOC 1.89 mg C L <sup>-1</sup> ) and 8.2 (DWTP A, COD 2.3 mg C L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> .....	157
<b>Tableau 4-2</b> Steroid hormone (SH) oxidation rate constants ( $k$ , M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ), removal efficiency (%) between 10 and 60 min and half-lives ( $t_{1/2}$ , min) derived from oxidation experiments using permanganate in Milli-Q and drinking waters (DWTP A, pH 8.2, DOC 2.3 mg C L <sup>-1</sup> and DWTP B, pH 6.3, COD 1.89 mg C L <sup>-1</sup> ) at 22 ± 2°C for pH 6.0 and 8.0 <sup>a</sup> .....	160
<b>Tableau 4-3</b> Temperature effect on first-order apparent rate constants ( $k$ , sec <sup>-1</sup> ), oxidation rate constants ( $k$ , M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ) and activation energy ( $E_a$ , KJ mol <sup>-1</sup> ) for permanganate decay with and without progestagens (SH) in drinking water at pH 8.2 (DWTP A) <sup>a</sup> .....	164

## Liste des tableaux supplémentaires

---

<b>Tableau 4S - 1</b> Physico-chemical Properties of Selected Steroid Hormones. ....	144
<b>Tableau 4S - 2</b> Method validation results for linearity ( $R^2$ ), %-error and homo/heteroscedasticity test (Breush-Pagan) for the calibration curve in HPLC grade water and affluent (Affl) wasterwater. ....	145
<b>Tableau 5S - 1</b> Physico-chemical properties of selected steroid hormones. ....	174
<b>Tableau 5S - 2</b> MS/MS Parameters for the Analysis of Selected Steroid Hormones Analytes in Both Negative (NI) and Positive (PI) Ionization Mode by LDTD-APCI-MSMS. ....	174
<b>Tableau 6S - 1</b> Physicochemical properties of selected estrogenic steroid hormones. ....	203
<b>Tableau 6S - 2</b> MS/MS parameters for the analysis of selected estrogenic steroid hormone analytes in negative (NI) and in positive (PI) ionization mode by LDTD-APCI-MS/MS. ....	203
<b>Tableau 6S - 3</b> MS/MS parameters for the analysis of selected estrogenic steroid hormone analytes in positive (PI) ionization mode by LC-APCI-MS/MS. ....	204
<b>Tableau 6S - 4</b> Oxidation rate constants ( $k$ , $M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) of other endocrine disrupting compounds found in the literature with similar reactivity than the selected estrogenic steroid hormones in this study (without and with bromine at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). All rate constants were determined in ultrapure water (Milli-Q water) for temperatures between 20 and $25^\circ\text{C}$ . Rate constants at the specified pH values were available experimentally or calculated from species-specific second-order rate constants given in the literature. <sup>a</sup> ....	205
<b>Tableau 6S - 5</b> Measured concentrations of TTHM as chlorination (CT of $52 \text{ mg.min L}^{-1}$ ) byproducts with drinking waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) with and without estrogenic steroid hormones (SHs) <sup>a</sup> . ....	206

## Liste des figures

---

<b>Figure 1-1</b> Sources, devenir et transport des contaminants «émergents» dans l'environnement [19].....	5
<b>Figure 1-2</b> Illustration de l'effet agoniste ( <i>Toxicant A</i> ), l'effet antagoniste ( <i>Toxicant B</i> ) et les réponses variables des récepteurs hormonaux suite à une exposition aux EDCs [39]. .....	9
<b>Figure 1-3</b> Fréquence de la taille des poissons par mesure de la longueur de fourche pour le lac non-contaminé (A) et celui contaminé (B) avec 5-6 ng L <sup>-1</sup> d'éthinylestradiol sur une période de 7 ans [47]. .....	11
<b>Figure 1-4</b> Réduction de la densité de sperme <i>i)</i> chez l'homme entre 1934 à 1990 à partir de 101 publications (haut) selon les travaux de Carlsen <i>et al.</i> [70] et <i>ii)</i> en fonction de l'année et de la région géographique (bas) avec régressions linéaires repris par Swan <i>et al.</i> [71]. .....	14
<b>Figure 1-5</b> Les mêmes glandes endocriniennes sont responsables de l'excrétion des hormones, dont voici un exemple comparatif entre l'humain et le poisson, deux espèces très différentes [90]. .....	17
<b>Figure 1-6</b> Numérotation du squelette et identification des cycles pour le cyclopentanoperhydrophénanthrène (à gauche) et structure du cholestérol (à droite). .....	17
<b>Figure 1-7</b> Structure de deux HS, dont les noms triviaux sont l'éthinylestradiol (A) et la testostérone (B) et les noms systématiques sont le (17β)-17-éthynylestra-1,3,5(10)-triène-3,17-diol (A) et le (17β)-17-hydroxyandrost-4-en-3-one (B). .....	18
<b>Figure 1-8</b> Exemples de configuration <i>trans</i> - et <i>cis</i> - pour un système à deux cycles carbonés avec un point de contact (A/B) et configurations les plus communes pour les HS. ....	21
<b>Figure 1-9</b> Doses (microgrammes) journalières de contraceptifs hormonaux et de composés de thérapie hormonale de remplacement consommées par un millier de personnes au Québec, Canada [99]. .....	22
<b>Figure 1-10</b> Sources et devenir environnemental des hormones oestrogéniques et progestagéniques [138]. .....	29

<b>Figure 1-11</b> Concentrations moyennes des oestrogènes dans les affluents (n=34), les effluents (n=44) et les eaux de surface (n=36) pour différents pays entre 1998 et 2013.....	33
<b>Figure 1-12</b> Concentrations moyennes des progestagènes dans les affluents (n=12), les effluents (n=12) et les eaux de surface (n=8) pour différents pays entre 1998 et 2013.....	34
<b>Figure 1-13</b> Schématisation du principe de préparation des MIPs [195].....	38
<b>Figure 1-14</b> Représentation du principe de la photocatalyse hétérogène dans le cas d'un semi-conducteur, le TiO <sub>2</sub> [214, 215].....	42
<b>Figure 1-15</b> Énumération des étapes impliquées pour le pré-traitement d'échantillons par SPE avec les temps associées. Exemple choisi lors de l'optimisation de la méthode SPE avec la cartouche STRATA™-X pour l'analyse des hormones dans l'eau usée.....	48
<b>Figure 1-16</b> Différentes étapes de la SPE automatisée en ligne; étape 1 : conditionnement de la colonne SPE; étape 2 : enrichissement et lavage de la colonne SPE et étape 3 : élution des analytes retenus vers la colonne chromatographique pour l'analyse par MS/MS [98]......	49
<b>Figure 1-17</b> Illustration des limites de détections obtenues par la SPE automatisée en ligne qui sont comparables à celle par la SPE manuelle avec un exemple théorique pour la EE2 avec une concentration de 1 µg L <sup>-1</sup> selon un volume initial d'échantillon de 1 mL et 250 mL, respectivement.....	50
<b>Figure 1-18</b> Départage et identification des méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des hormones dans les eaux environnementales selon une revue de la littérature faite entre 1999 et 2013 (n = 83) ( <b>Annexe 2</b> ).....	51
<b>Figure 1-19</b> Comparaison du temps d'analyse pour les différentes méthodes analytiques, ELISA (n = 2), GC-MS-MS/MS (n = 27), LC-DAD-UV-FLD (n = 16) et LC-MS-MS/MS (n = 43), pour l'analyse des hormones dans les matrices d'eaux avec leurs écarts-types (valeurs prises du <b>Tableau A2-2</b> ).....	52
<b>Figure 1-20</b> Pourcentages des types de colonnes utilisées pour la séparation des hormones dans les matrices d'eau selon une revue de la littérature (n= 58, entre 1999 et 2013, <b>Tableau A2-2</b> ).....	54
<b>Figure 1-21</b> Énergies d'ionisation (IE, eV) et affinité protonique (PA, kJ mol <sup>-1</sup> ) de différents solvants [265].....	59

<b>Figure 1-22</b> Effet de différents solvants (MeOH, IPA et ACN) sur l'intensité du signal des hormones par APCI selon les paramètres optimaux pour chacun. Les solvants sont ajoutés à l'eau (50:50, v/v).....	61
<b>Figure 1-23</b> Schématisation d'un quadripôle (gauche) et des paires d'électrodes auxquelles sont appliquées les tensions directe (DC) et alternative (RF) [273]. .....	62
<b>Figure 1-24</b> Diagramme d'un spectromètre de masse triple-quadripolaire (haut) [259] et exemple de spectre MS/MS pour l'E2 en mode négatif par APCI avec les deux ions fragments (SRM 1 et SRM 2) les plus intenses (bas).....	64
<b>Figure 1-25</b> Chromatogrammes de deux MRM pour l'analyse de l'éthinylestradiol (EE2) dans un échantillon standard et dans un échantillon réel d'affluent d'une usine de traitement des eaux usées. Cet exemple montre l'importance de considérer au minimum deux ions produits pour l'analyse par LC-MS/MS pour éviter les faux positifs [275].....	65
<b>Figure 1-26</b> Les sources d'ionisation ambiante (en vert) connectées aux sources «traditionnelles» desquelles elles découlent (en brun) ainsi que les sous sources développées à partir des sources d'ionisation ambiantes (en rouge). Les définitions des acronymes sont présentées en <b>Annexe 4</b> [281]. .....	67
<b>Figure 1-27</b> Schématisation de la source LDTD avec ses composantes [283]. .....	68
<b>Figure 1-28</b> Image du montage de la LDTD sur le spectromètre de masse avec la description de l'appareillage. ....	68
<b>Figure 1-29</b> Abondance des ions hydroniums solvatés ( $n < 4$ ) formés dans la source LDTD avec de l'air sec (3 ppm d'eau) et saturé en eau (à gauche) et l'abondance relative de différents ions en fonction du débit de l'air (3 ppm d'eau) (à droite) [284].....	69
<b>Figure 1-30</b> Démonstration graphique de la relation entre la température (en K) de vaporisation et la décomposition moléculaire théorique d'un composé non-volatile et thermiquement labile. Ceci explique pourquoi la désorption par la LDTD n'induit pas une fragmentation des substances lors de l'étape de volatilisation et que l'ion moléculaire chargé est détecté [288].....	71
<b>Figure 1-31</b> Comparaison des chromatogrammes entre la LC-MS/MS et des pics dans le temps de la LDTD-MS/MS pour l'analyse de deux hormones (E3 et l'E1) qui ont les mêmes $m/z$ pour leurs précurseurs et ions produits. L'analyse par LDTD ne permet pas de distinguer entre les deux. ....	72



- Figure 2-1** LD TD/APCI optimization of three different solvent solutions with their corresponding respective optimum laser power, ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) and MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) both at 20% laser power and pure EtOAc at 30% laser power, used for analyte deposition in plate well. The concentration used was 2 mg/L. ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) was determined to be the solvent of choice with four out of the eight hormone steroids having a significantly higher ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) peak area intensity represented by a star symbol (\*) than with MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1 v/v) or pure EtOAc in both PI and NI mode. .... 85
- Figure 2-2** Positive ionization mode (PI) maximum peak intensity for a concentration of 2 mg/L was observed at a maximum 20% laser power for all selected steroid hormones and was significantly different from other laser power ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ). .... 85
- Figure 2-3** Carrier gas flow was optimal between 2 and 3 L/min and gave significantly higher peak area response ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) in PI mode. A gas flow of 3 L/min provided the best signal-to-noise ratio combined with small signal variability (RSD < 10%;  $n = 3$ ). .... 86
- Figure 2-4** Effect of deposition volume change on method sensitivity and matrix-induced peak area intensity in spiked effluent wastewater matrix compared to intensities in matrix free solvent (ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v)) for PROG in PI mode. In matrix-free solvent, the signal for PROG increases with an increase in deposition volume, while in spiked effluent wastewater matrix, the peak area intensity diminishes significantly for deposition volumes greater than 5  $\mu$ L at an identical concentration of 2 mg/L. .... 87
- Figure 2-5** MS/MS spectra of the product ions (SRM) of one desorption event for the lowest concentration calibration point (wastewater, diluted 1:10 v/v in dd-H<sub>2</sub>O and spiked at 30 ng/L) used in the standard addition calibration curves for E2, EE2, LEVO, NOR, MPROG and PROG in PI mode. The method blank mass spectra (inset), representing non-spiked diluted wastewater (1:10 v/v) samples, are also shown to confirm the absence of any peak contribution from non-spiked wastewater and to evaluate the average background noise. .... 89
- Figure 3-1** Influence of temperature (40C and 25oC), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water and affluent wastewater) and

time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions (mean±SD, n=2, 2 µg L<sup>-1</sup>) during storage. As examples, EE2 and MEDRO were chosen to represent estrogens and progestagens, respectively. The symbols (\*) represent statistically significant (P<0.01) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample. .... 114

**Figure 3-2** Comparison of recovery values (mean±SD, n=4) on different filter materials, cellulose acetate (CA), glass fiber (GF), mixed cellulose ester (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC) and polyethersulfone (PES), for selected steroid hormones. Tests were done in spiked (5 µg L<sup>-1</sup>) analyte-free filtered affluent wastewater. The GF filters gave significantly higher recovery values for three out of the eight steroid hormones (\*, P<0.05)..... 116

**Figure 3-3** Effect of loading speed (1000 to 5000 µL min<sup>-1</sup>) for spiked steroid hormones (mean±SD, n=3, 500 ng L<sup>-1</sup>) peak areas from sample loop (10-mL) to on-line SPE column in analyte-free affluent wastewater. The symbols (\*) represent significantly (P<0.05, n=3 with RSD≤15 in all cases) smaller peak areas than observed at the lowest loading speed (1000 µL min<sup>-1</sup>). .... 118

**Figure 3-4** Determination of breakthrough volumes (1 to 20-mL) of a mix steroid hormone solution (n=3, 150 ng L<sup>-1</sup>) in analyte-free affluent wastewater, using a 20-mL injection loop. The maximum injectable volume is represented by the last point of the linear regression line of analyte peak area. A sample loading volume between 1 and 10 mL, without loss of analyte, is possible in affluent wastewater (R<sup>2</sup>≥0.997). .... 119

**Figure 3-5** Representative superimposed chromatograms of a blank and spiked (75 ng L<sup>-1</sup>) wastewater affluent sample. The blank is represented by the non-integrated chromatograms, whereas the spiked sample is represented by the integrated peaks with corresponding retention times (RT) for each steroid hormone. The ordinates are given in intensities for the spiked sample only, therefore absolute peak height (AH) for both spiked samples and maximum peak blank values (black arrows) are also reported. .... 124

**Figure 4-1** Second-order rate kinetic plots for the oxidation of progestagenic steroid hormones (SH) by permanganate and the resulting effect of dissolved natural organic matter (NOM) from drinking waters (DWTP A and DWTP B) for

progestagens at a) and c) pH 6.0, b) and d) pH 8.0 when compared to Milli-Q water according to progestagens having similar reaction rate constants. Experimental conditions were,  $[KMnO_4]_0$  from 17 to 39  $\mu M$  and  $[progestagens]_0$  from 1.9 to 3.9  $\mu M$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2 \geq 0.96$ )..... 159

**Figure 4-2** Effect of temperature on the second-order decay of progestagens: a) levonorgestrel and b) its impact on measured rate constants for oxidation of progestagenic steroid hormones (SH) by permanganate. The experimental conditions were,  $[KMnO_4]_0$  from 38 to 53  $\mu M$ ,  $[progestagens]_0$  from 2.1 to 4.1  $\mu M$  in drinking water (DWTP A) at pH 8.2 and temperature ranging from 6 to 30°C. Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) also given. .... 164

**Figure 4-3** Steroid hormone (SH) decay curves following oxidation with permanganate in drinking waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) for progestagens.  $[KMnO_4]_0$  ranged from 17 to 39  $\mu M$ . Solid (DWTP A) and dotted (DWTP B) lines represent the trend of the measured data (symbols)..... 166

**Figure 5-1** Second-order rate kinetic plots for the oxidation of estrogenic steroid hormones (SH) by chlorine with and without bromide and the resulting effect of dissolved natural organic matter (NOM) with a) E2, b) E1, c) EE2 at pH 6.0 for Milli-Q water and pH 6.3 for DWTP B and d) E2, e) E1 and f) EE2 at pH 8.0 for Milli-Q water and pH 8.2 for DWTP A. Experimental conditions were,  $[HOCl]_0$  from 26 to 99  $\mu M$  and  $[estrogens]_0$  from 0.883 to 9.76  $\mu M$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ). .... 188

**Figure 5-2** Estrogenic steroid hormone (SH) decay curves following oxidation by chlorine with and without bromide in natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3).  $[HOCl]_0$  ranged from 26 to 99  $\mu M$  and  $[estrogens]_0$  from 0.883 to 9.76  $\mu M$ . Dotted lines represent the trend of the measured data (symbols). .... 193

## Liste des figures supplémentaires

---

<b>Figure 2S- 1</b> Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms. ....	95
<b>Figure 2S- 2</b> Negative ionization mode (NI) maximum peak intensity for a concentration of 2 mg/L was observed at a maximum 20% laser power for steroid hormones EE2 and E2 and was significantly different from other laser power ( $n = 3$ ; $P < 0.5$ ). The optimum laser power for E1 was 20% and 25%, whereas for E3 it was 15% and 20%, which were not statistically different from each other in both cases ( $n = 3$ ; $P > 0.5$ ). A laser power of 20% was chosen in NI mode, in order to have a single method applicable to all selected compounds and because it was common to all four selected steroid hormones. ....	96
<b>Figure 2S- 3</b> Carrier gas flow was optimal between 2 to 3 L/min and gave significantly higher peak area response ( $n = 3$ ; $P < 0.5$ ) in NI mode. A gas flow of 3 L/min provided the best signal-to-noise ratio combined with small signal variability (RSD < 10%; $n = 3$ ). Estriol (E3) was the only exception with an optimal gas flow of 2 L/min. ....	97
<b>Figure 2S- 4</b> Four different laser patterns ( $n = 3$ ) were used and compared for PROG in PI mode. The optimal conditions giving the maximum peak area intensity and good variability (RSD < 10%) for desorption laser power and patter consisted of a 1 s initial ramp from 0 to 20% and held for 3 s at 20% before shutting off. ....	98
<b>Figure 2S- 5</b> Recovery values ( $n = 3$ ) for matrix-free (pure water) and in matrix (spiked effluent wastewater) samples at 50 ng/L in both NI and PI modes using Strata-X SPE cartridges for all selected steroid hormones including IS and surrogate. ....	99
<b>Figure 4S - 1</b> Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms .....	134
<b>Figure 4S - 2</b> Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ , 2 µg L <sup>-1</sup> ) during storage. As examples, EE2 and MEDRO were chosen to represent estrogens and progestagens, respectively. The symbols (*) represent statistically significant ( $P<0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample. ....	135

- Figure 4S - 3** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water, affluent and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ ,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) during storage for estrogens. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P<0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample. .... 136
- Figure 4S - 4** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water, affluent and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ ,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) during storage for progestagens. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P<0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample. .... 137
- Figure 4S - 5** Comparison of recovery values (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ) on different filter materials, cellulose acetate (CA), glass fiber (GF), mixed cellulose ester (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC) and polyethersulfone (PES), for selected steroid hormones. Tests were done in spiked ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) HPLC grade water (A). GF, for three out of the eight steroid hormones, gave significantly higher (\*,  $P<0.05$ ) recovery values. Recovery values for PROG in HPLC grade water (A) were significantly higher ( $\dagger$ ,  $P<0.05$ ) than in affluent wastewater. .... 138
- Figure 4S - 6** Signal to noise (S/N) ratios as a function of injection volumes (1 and 10-mL) for a mix steroid hormone solution ( $200 \text{ ng L}^{-1}$ ) in analyte free affluent wastewater. The maximum injectable volume is represented by the last point of the linear regression lines. A sample loading volume between 1 and 10 mL, without loss of analyte and linearly higher S/N values, is possible in affluent wastewater. .... 139
- Figure 4S - 7** Matrix effect (mean $\pm$ SD,  $n=7$ ), expressed as percentages, determined by comparing peak areas of spiked steroid hormone free affluent wastewater to the ones found in HPLC water according to a 10-mL injection volume at  $100 \text{ ng L}^{-1}$  and  $500 \text{ ng L}^{-1}$ . .... 140
- Figure 4S - 8** Recovery values (mean  $\pm$  SD) were evaluated for the on-line SPE method. The mean peak areas ( $n=5$ ,  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ) of the selected steroid hormones of, *i*) a direct chromatographic injection ( $25 \mu\text{L}$ , off-line injection) and *ii*) an on-

line small injection (100 $\mu$ L, with a 100 $\mu$ L loop) were compared with those of the on-line high volume injection (10 mL) used for sample analysis. The symbols (*) represent statistically significant ( $P < 0.05$ , with $SD \leq 15\%$ in all cases) different recovery values between methods.....	141
<b>Figure 4S - 9</b> Examples of the standard addition curves for WWTP-A at time one (Time 1, <b>Tableau 4-7</b> in main text) in affluent and effluent wastewater samples for estriol (E3). Solid lines represent the linear regressions of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) and linear regression equations given. ....	142
<b>Figure 4S - 10</b> Flow chart summarizing the analytical step used during method development. ....	143
<b>Figure 5S - 1</b> Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms, with atom numbering for the base structure of steroid hormones.....	171
<b>Figure 5S - 2</b> Impact of solvents (methanol, MeOH and acetonitrile, ACN) on permanganate decay in batch reactor conditions without the addition of steroid hormones. Experimental conditions were, $[KMnO_4]_0 = 10$ mg/L at pH 8.0 in Milli-Q water with a 0.2% v/v addition of solvent into 500 mL batch reactor. Error bars represent the standard deviation of replicate measurements/batch ( $n = 3$ ). ....	172
<b>Figure 5S - 3</b> Pseudo-first-order kinetic plots corresponding to decay curves of permanganate with progestagens (LEVO, MEDRO, NORE and PROG) in ultrapure and drinking waters according to pH values (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3). Experimental conditions were, $[KMnO_4]_0$ from 17 to 39 $\mu$ M and $[progestagens]_0$ from 1.9 to 3.9 $\mu$ M. Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) also given.....	173
<b>Figure 5S - 4</b> Permanganate decay curves of a) permanganate with estrogens and b) permanganate with progestagens in Milli-Q and natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) waters according to pH values. Experimental conditions were, $[KMnO_4]_0$ from 17 to 39 $\mu$ M and $[progestagens]_0$ from 1.9 to 3.9 $\mu$ M. Solid and dotted lines represent the trend for the measured data (symbols). ....	173

- Figure 6S - 1** Molecular structures of selected estrogenic steroid hormones and their acronyms, with atom numbering for the base structure of steroid hormones. .... 199
- Figure 6S - 2** Impact of solvents (methanol; MeOH, acetonitrile; ACN, acetone and ethyl acetate) on chlorine decay in batch reactor conditions without the addition of steroid hormones at concentrations of chlorine of a) 2 mg L<sup>-1</sup> and b) 10 mg L<sup>-1</sup>. Experimental conditions were, [HOCl]<sub>0</sub> = 2 or 10 mg L<sup>-1</sup> at pH 8.0 in Milli-Q water with a 0.2% v/v addition of solvent into 500 mL batch reactor. Error bars represent the standard deviation of replicate measurements/batch (n=3). .... 200
- Figure 6S - 3** Pseudo-first-order kinetic plots corresponding to decay curves of chlorine in the presence of estrogenic steroid hormones (E2, E1 and EE2) with and without the addition of bromide (10, 100 and 1000 µg L<sup>-1</sup>) in Milli-Q water and drinking waters according to pH values for a) DWTP B, pH 6.3 and Milli-Q, pH 6.0 and b) DWTP A, pH 8.2 and Milli-Q, pH 8.0. Experimental conditions were, [HOCl]<sub>0</sub> from 26 to 99 µM and [estrogens]<sub>0</sub> from 0.883 to 9.76 µM. Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination (R<sup>2</sup>) also given. .... 201
- Figure 6S - 4** Decay curves of chlorine with estrogenic steroid hormone (SH) in Milli-Q water and drinking waters according to pH values and the addition of bromide with a) DWTP B, pH 6.3 and Milli-Q, pH 6.0 and b) DWTP A, pH 8.2 and Milli-Q, pH 8.0. Experimental conditions were, [HOCl]<sub>0</sub> from 26 to 99 µM and [estrogens]<sub>0</sub> from 0.883 to 9.76 µM. Solid and dotted lines represent the trend of the measured data (symbols). .... 202

## Liste d'abréviations, sigles et acronymes

---

Les mots dans la langue anglaise sont indiqués en italique. Certains termes n'apparaissent que dans une langue parce qu'ils n'ont pas été utilisés dans l'autre langue.

%	pourcentage
$\alpha$	alpha
AC	charbon actif ( <i>activated carbon</i> )
ACN	acétonitrile
ALDO	aldostérone ( <i>aldosterone</i> )
AOP	procédés d'oxydation avancée ( <i>advanced oxidation processes</i> )
AP	pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure</i> )
APCI	ionisation à pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> )
APPI	photoionisation à pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure photoionisation</i> )
ASS	système de boues activées ( <i>activated sludge system</i> )
atm	atmosphère
$\beta$	bêta
BF	filtration biologique ( <i>biological filter</i> )
BO	bassin d'oxydation
BPA	<i>bisphenol-A</i>
Br <sup>-</sup>	ion bromure
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
°C	degré Celcius
CA	acétate de cellulose ( <i>cellulose acetate</i> )
CaCO <sub>3</sub>	carbonate de calcium ( <i>calcium carbonate</i> )
CAS	<i>chemical abstract service</i>
Cl <sub>2</sub>	chlore
Cl <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ion trichloride
ClO <sup>-</sup>	anion hypochlorite
ClO <sub>2</sub>	dioxyde de chlore



COR	cortisol
CORT	cortisone
CT	concentration × temps
DAD	détecteur à barette de diodes ( <i>diode array detector</i> )
DART	<i>direct analysis in real time</i>
DC	tension continue ( <i>direct current</i> )
DCM	dichlorométhane ( <i>dichloromethane</i> )
DCMD	distillation membranaire à contact direct ( <i>direct contact membrane distillation</i> )
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
dénit + nit	dénitrification et nitrification
DES	diéthylstilbestrole ( <i>diethylstilbestrol</i> )
DESI	<i>desorption electrospray ionization</i>
DG <sub>acide</sub>	acidité en phase gazeuse
DHEA	déhydroépiandrostérone ( <i>dehydroepiandrosterone</i> )
DOCORT	déoxycorticostérone ( <i>deoxycorticosterone</i> )
DOC	<i>dissolved organic carbon</i>
DWTP	<i>drinking water treatment plant</i>
e <sup>-</sup>	électron
E1	estrone
E2	17β-estradiol
E3	estriol
EA	affinité électronique ( <i>electronique affinity</i> )
E <sub>a</sub>	énergie d'activation
EA	épiandrostérone ( <i>epiandrosterone</i> )
EDC	perturbateur endocrinien ( <i>endocrine disrupting compound</i> )
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EE2	17α-éthynylestradiol
EI	ionisation électronique ( <i>electronic ionization</i> )
ESI	ionisation par nébulisation électrostatique (electrospray ionisation)
EtOAc	acétate d'éthyle ( <i>ethyl acetate</i> )
eV	électron volt

FA	acide formique ( <i>formic acid</i> )
FC	facteur de concentration
Fe(VI)	ion ferrate
FLUDRO	fludrocortisone
FO	osmose directe ( <i>foward osmosis</i> )
GAC	charbon actif en grain ( <i>granulated activated carbon</i> )
GC	chromatographie gazeuse ( <i>gas chromatography</i> )
GF	fibres de verre ( <i>glass fiber</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HAA	<i>haloacetic acids</i>
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
HDPE	polyéthylène haute densité ( <i>high-density polyethylene</i> )
HESI	ionisation par nébulisation électrostatique chauffée ( <i>heated electrospray ionisation</i> )
HFR	retardateur de flamme halogénée ( <i>halogenated flame retardant</i> )
HOCl	acide hypochloreux
HVLP	haut volume et faible pression ( <i>high volume low pressure</i> )
ICH	<i>International Conferences of Harmonization</i>
IDL	limite de détection instrumentale ( <i>instrumental detection limit</i> )
IE	énergie d'ionisation ( <i>ionisation energy</i> )
IPA	isopropanol
IS	standard interne ( <i>internal standard</i> )
K	Kelvin
<i>k'</i>	constante de vitesse
<i>k'</i>	facteur de capacité
K <sup>+</sup>	ion potassium
KMnO <sub>4</sub> , Mn(VII)	permanganate
K <sub>ow</sub>	coefficient de partage octanol/eau
<i>k<sub>p</sub></i>	constante de réaction de deuxième ordre
kPa	kilopascal
kV	kilovolt
IR	infrarouge ( <i>infrared</i> )

L	litre
LC	chromatographie liquide ( <i>liquid chromatography</i> )
LDTD	désorption thermique à diode laser ( <i>laser diode thermal desorption</i> )
LEVO	lévonorgestrel
LLE	extraction liquide-liquide ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
LOD	limite de détection ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	limite de quantification ( <i>limit of quantification</i> )
m <sup>2</sup>	mètre carré
m <sup>3</sup>	mètre cube
m/z	rapport masse sur charge
μA	microampère
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MBR	bioréacteur membranaire ( <i>membrane bioreactor</i> )
MCE	ester de cellulose mixte ( <i>mix cellulose ester</i> )
MDL	limite de détection de la méthode ( <i>method detection limit</i> )
MeOH	méthanol
MF	microfiltration
MFHF	microfiltration à fibre creuse ( <i>microfiltration hollow fiber</i> )
mg	milligramme
min	minute
MIP	polymère moléculaire imprimé ( <i>molecularly imprinted polymer</i> )
mJ	milijoules
mL	millilitre
mM	micromole
mm	millimètre
MM	masse moléculaire
Mn(INT) <sub>aq</sub>	<i>aqueous manganese intermediates</i>
MnO <sub>2</sub>	dioxyde de manganèse
MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	ion permanganate
mol ou M	mole
MPROG	médroxyprogestérone ( <i>medroxyprogesterone</i> )
MRM	suivi 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> )
MSTFA	<i>N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
m/v	mass par volume ( <i>mass per volume</i> )
<i>n</i>	nombre d'extractions utiles
n	taille de l'échantillon
N	taille de la population
N <sub>az</sub>	élimination de l'azote
NaCl	chlorure de sodium ( <i>sodium chloride</i> )
NaOCl	hypochlorite de sodium
NC	nitrocellulose
NF	nanofiltration
ng	nanogramme
NI	ionisation négative ( <i>negative ionization</i> )
NIP	polymère moléculaire non imprimé ( <i>non imprinted polymer</i> )
NM	nanomatériaux ( <i>nanomaterials</i> )
nm	nanomètre
NOM	matirère organique naturelle ( <i>natural organic matter</i> )
NORE	norethindrone
NP	<i>nonylphenol</i>
NRC	Conseil National de la Recherche ( <i>National Research Council</i> )
NSERC	<i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>
N <sub>th</sub>	nombre de plateaux théoriques
NYL	nylon
O <sub>3</sub>	ozone
OA	agent d'oxydation ( <i>oxidation agent</i> )
OCDE	Organisation pour la coopération et le développement économique
OMS	Organisation mondiale de la Santé
<i>P</i>	<i>probability</i>
P	phosphore
PA	affinité protonique ( <i>proton affinity</i> )
PAC	charbon actif particulaire ( <i>powdered activated carbon</i> )

PC	polycarbonate
PCB	polychlorobiphényle ( <i>polychlorinated biphenyl</i> )
PCDD	dibenzo- <i>p</i> -dioxine polychloré ( <i>polychlorinated dibenzo-<i>p</i>-dioxins</i> )
PCDF	dibenzofurane polychloré ( <i>polychlorinated dibenzofuran</i> )
PES	polyestersulfone
PFBBr	<i>pentafluorobenzyl bromide</i>
PI	ionisation positive ( <i>positive ionization</i> )
pK <sub>a</sub>	constante de dissociation d'un acide
PPCP	produit pharmaceutique et de soins personnels ( <i>pharmaceuticals and personal care products</i> )
PRE	prednisolone
PRED	prednisone
PROG	progestérone ( <i>progesterone</i> )
Q	quadripôle
QqQ	triple quadripôle
R	constante des gaz
R <sup>2</sup>	<i>coefficient of determination</i>
RDS	<i>relative standard deviation</i>
RF	tension alternative ( <i>radio frequency</i> )
RO	osmose inverse ( <i>reverse osmosis</i> )
<i>r<sub>o</sub></i>	rayon d'un cercle
<i>R<sub>s</sub></i>	resolution chromatographique
S/N	rapport signal sur bruit
SBSE	extraction sur barreau de sorption ( <i>stir bar sortive extraction</i> )
SD	<i>standard deviation</i>
sec	seconde
SIM	<i>single ion monitoring</i>
SPE	extraction sur phase solide ( <i>solid phase extraction</i> )
SPME	micro-extraction sur phase solide ( <i>solid phase micro-extraction</i> )
SRM	suivi de réaction ciblée ( <i>selective reaction monitoring</i> )
SPSS	<i>statistical package for social science</i>

T10	temps de contact pour récupérer 10% d'un traceur injecté à l'entrée d'un bassin
T	température
<i>t</i>	temps
Testo	testostérone ( <i>testosterone</i> )
$t_{1/2}$	temps de demi-vie
TFA	acide trifluoroacétique ( <i>heptafluorobutanoic acid</i> )
THM	<i>trihalomethanes</i>
TTHM	<i>total trihalomethanes</i>
TiO <sub>2</sub>	dioxyde de titane
TL	<i>tube lens</i>
TMSI	<i>N-trimethylsilylimidazole</i>
U	amplitude de la tension continu
UCMR-3	<i>Unregulated Contaminants Monitoring Rule</i>
UF	ultrafiltration
μL	microlitre
μM	micromolaire
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	ultraviolet
$\upsilon$	vitesse de réaction
V	amplitude de la tension alternative
V	volt
V <sub>m</sub>	volume mort
VOC	composé organique volatil ( <i>volatile organic compound</i> )
v/v	volume par volume ( <i>volume per volume</i> )
$\omega$	fréquence angulaire
Φ	tension appliquée

## Remerciements

---

Je souhaite, tout d'abord, exprimer ma reconnaissance au Professeur Sébastien Sauvé, mon directeur de thèse, et à la Professeure Michèle Prévost, ma co-directrice de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler à leurs côtés pendant toutes ses années. La confiance qu'ils m'ont accordée, leurs conseils, leurs implications et leurs appuis tout au long de mon parcours sont très appréciés. Je leur témoigne ma profonde gratitude.

Je remercie également tous les membres (passés et présents) du groupe du Laboratoire de Chimie Analytique Environnementale du Professeur Sébastien Sauvé, pour les nombreux moments de fou-rires, pour leur amitié et leur conseil. En particulier je souhaite remercier Pedro Segura, Sherri Lynn MacLeod, André Lajeunesse et Sung Vo Duy. Ils ont été des personnes clefs dans mon cheminement.

Merci aussi aux sociétés Phytronix Technologies Inc. et Thermo Scientific pour leur support technique et aux personnes avec qui j'ai eu l'opportunité de créer des liens à travers les années (Maroun El Khoury, Pascal Belisle et Sylvain Letarte).

Je tiens à souligner l'aide, les conseils et le temps que m'ont accordé l'équipe du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal, soit Alexandra Furtos, Karine Venne, Marie-Christine Tang et Christophe Camy. Ils font partie intégrante et indispensable du Département de Chimie.

Un grand merci à mes parents, mes frères, la belle-famille ainsi que mon ami d'enfance pour leur soutien moral, leur patience et pour la question qui n'a jamais cessé d'être posée depuis le tout début (tu finis quand ?). Voici donc la réponse tant attendue !

Enfin, à ma tendre moitié, Rima, avec qui je partage ma vie, je retiens le plus grand merci pour sa patience, son indulgence et son aide.





## **Chapitre 1 Introduction générale**

---

## 1.1 Les contaminants «émergents»

### 1.1.1 Que sont-ils et d'où viennent-ils ?

La publication en septembre 1962 du livre par la zoologiste et biologiste américaine Rachel Carson [1], *Printemps silencieux (Silent spring)*, contribue à l'apparition de l'écologisme qui s'est tranquillement transformé en la base du mouvement environnementaliste tel que nous le connaissons aujourd'hui. L'auteur s'attarde sur les dangers des pesticides dans l'environnement, soit le dieldrine, le toxaphene, l'heptachlore et le dichlordiphényltrichloro-éthane (DDT), utilisés alors librement dans les cultures agricoles depuis les années 1940 et 1950. Ces composés nuisent à la reproduction et sont également à l'origine des problèmes de croissance chez les espèces animales. Ils sont lipophiles donc bioconcentrés et bioaccumulés dans les tissus adipeux [2]. Cet ouvrage marque le début d'un conflit entre deux groupes dans la société, le premier cherche à améliorer la qualité de la vie d'une population par la science et l'innovation technologique alors que l'autre se préoccupe des conséquences involontaires et inconnues de ces mêmes technologies. Depuis, plusieurs réglementations sur l'usage et la sécurité de substances chimiques ont été adoptées, de nouvelles disciplines scientifiques sont apparues et des techniques pour leur détection, leur quantification ainsi que l'évaluation de leurs risques dans l'environnement ont été développées. D'une certaine façon, la problématique associée aux contaminants «émergents» a lieu depuis maintenant plus de cinquante ans.

Dans les décennies suivantes, et jusqu'au début des années 1990, les travaux en contamination environnementale se sont concentrés sur les polluants organiques persistants (POPs) et les métaux lourds. Ils font partie de la liste de «polluants prioritaires conventionnels» [3] établie par le *United States Environmental Protection Agency* (US EPA). Il existe plusieurs milliers de POPs classés selon diverses catégories en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, soit les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les biphényles polychlorés (PCBs), les dibenzo-*p*-dioxines polychlorées (PCDD), les dibenzofuranes polychlorés (PCDF) et les pesticides [4]. Les POPs sont des composés chimiques d'origine anthropique qui sont toxiques et qui demeurent persistants dans

l'environnement; ils peuvent aussi parcourir de longues distances et sont bioaccumulables [5, 6]. Ils peuvent entraîner une augmentation du taux de mortalité et une diminution du taux de natalité et, par conséquent, la réduction ou l'élimination des populations qui y sont exposées, comme les poissons, les invertébrés, les oiseaux, les reptiles et les mammifères [7, 8]. Aujourd'hui, la formation des POPs demeure un enjeu important, surtout dans les pays en voie de développement. Cependant, la mise en place de réglementations quant à l'enregistrement et le catalogue des émissions des composés chimiques en usage en Europe et aux États-Unis [9] a permis de réduire l'exposition aux POPs dans les pays industriels. Toutefois, les POPs demeurent un sujet d'intérêt surtout pour ceux ayant des propriétés hormono-mimétiques [10].

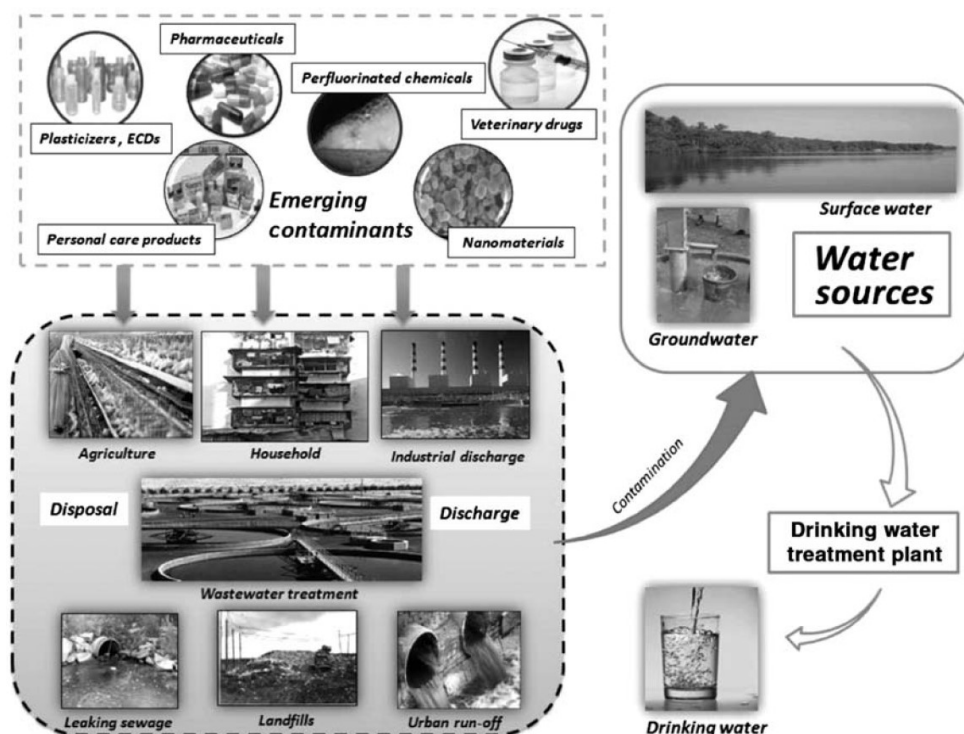
Au cours des trente dernières années, un intérêt grandissant apparaît pour différents types de contaminants chimiques environnementaux. Les premiers travaux suscitant ce changement se sont déroulés dans les années 1970 où l'acide clofibrrique et le chlorophénoxyisobutyrate, des métabolites actifs issus des hypolipémiants (clofibrate, clofibrate d'étofylline et l'étofibrate) ainsi que l'acide salicylique, le métabolite de l'aspirine, ont été détectés par chromatographie gazeuse (GC) dans les effluents d'usines de traitement des eaux usées aux États-Unis [11, 12]. L'expression «contaminants émergents» pour décrire ce type de composés fut utilisée pour la première fois par le *National Research Council* (NRC) en 1998 [13]. Les «contaminants émergents» représentent un ensemble complexe, hétérogène, et substantiellement plus important en terme de nombre par rapport aux POPs, de composés chimiques qui se trouvent dans l'environnement, mais qui n'avaient pas été détectés auparavant. Depuis le début de leur utilisation, ils sont rejetés dans l'environnement que ce soit dans le domaine pharmaceutique, industriel ou agricole [14]. Le qualificatif «émergents» ne fait pas donc pas l'unanimité dans la communauté scientifique [15], puisque certains composés pouvaient être présents dans l'environnement pendant plusieurs années, voir des décennies, avant que l'on ait les outils nécessaires pour les détecter [14]. Toutefois, les méthodes d'analyse n'étaient pas suffisamment sensibles pour les identifier et les quantifier aux niveaux auxquels ils sont présents dans l'environnement [16]. L'amélioration des méthodes analytiques, surtout les techniques impliquant la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS), permet d'envisager d'analyser des composés polaires dans l'eau.

Les composés «émergents» identifiés jusqu'à ce jour dans les matrices environnementales, dont les sources d'eaux urbaines et industrielles (affluents, effluents, rivières, eaux potables, eaux souterraines) et les solides (boues, sédiments, fumiers) font partie de plusieurs classes de composés. Ils sont souvent groupés en fonction de leurs usages, de leurs mécanismes d'action, de leurs structures ou de leurs propriétés physico-chimiques, incluant ceux-ci [17] :

- produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs)
- perturbateurs endocriniens (EDCs)
- drogues illicites et d'abus
- composés perfluorés (PFCs)
- retardateurs de flammes halogénées (HFRs)
- pesticides
- nanomatériaux (NMs)
- liquides ioniques (ILs)

Cette liste comprend les molécules parentes intactes ainsi que les métabolites et les sous-produits de dégradation ou de transformation qui ne sont pas régis par une loi ou un règlement et dont l'impact sur l'écosystème environnemental ou chez l'humain est très peu connu [18]. Il existe cependant une liste créée récemment, la *Unregulated Contaminants Monitoring Rule* (UCMR-3), qui comprend 30 contaminants dont plusieurs «émergents», c'est-à-dire des hormones (EDCs), des composés organiques volatils (VOCs), des métaux et des PFCs. Cette liste impose aux usines d'eau potable des villes américaines de surveiller ces composés entre 2013 et 2015 [17].

Les contaminants «émergents» se retrouvent dans l'environnement selon différentes sources responsables pour leur transport et leur distribution (**Figure 1-1**). Leurs propriétés physico-chimiques (volatilité, polarité, solubilité dans l'eau) détermineront leur devenir dans l'environnement. Les sources les plus importantes de contaminants «émergents» sont les usines de traitement des eaux usées (inefficacité des traitements), les ruissellements secondaires terrestres (toits, pavés, routes, sols agricoles) ainsi que les dépôts atmosphériques.



**Figure 1-1** Sources, devenir et transport des contaminants «émergents» dans l'environnement [19].

### 1.1.2 Occurrences, concentrations et risques environnementaux

Il est difficile de connaître le nombre exact de contaminants «émergents», surtout si nous considérons les sous-produits de dégradation ou de transformation et leurs métabolites. On estime la quantité de substances chimiques disponibles commercialement à plus 8 400 000 [20], dont 308 000 sont répertoriées/réglémentées selon le site web du *chemical abstract service* (CAS) depuis 1980. Depuis les 30 dernières années aux États-Unis, il y aurait au-delà de 100 000 produits chimiques enregistrés qui représentent des contaminants «émergents», soit les pesticides, les additifs alimentaires, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques [20]. Ces chiffres sont représentatifs de la situation au Canada, dans les pays d'Europe ou en Asie. À titre d'exemple, dans les pays occidentaux, il existe entre 3000 et 4000 différents composés pharmaceutiques utilisés en médecine humaine ou animale, tels que les antibiotiques, les antalgiques, les analgésiques, les contraceptifs, les bêta-bloqueurs, les régulateurs lipidiques et des inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (dysfonction érectile) [21, 22]. En 2009, une revue de la littérature [22] montre que nous avons ciblé

environ 160 de ces composés pharmaceutiques dont environ 30 de leurs sous-produits. Lors de leur consommation, les humains et les animaux vont rejeter un mélange contenant une proportion de molécules intactes et métabolisées souvent solubles dans l'eau. Ils se retrouveront alors dans les rejets d'eaux usées puis dans nos réserves (rivières, fleuves) d'eaux potables ou souterraines où ils auront des effets sur l'écosystème et les espèces aquatiques. Leurs concentrations varient, selon la nature des contaminants «émergents», de quelques  $\text{ng L}^{-1}$  à plusieurs  $\mu\text{g L}^{-1}$  [22].

La grande majorité des usines de traitements des eaux usées n'ont pas été conçues pour assurer l'élimination des contaminants «émergents». Lors de la conception des usines de traitements, durant la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, elles avaient comme objectif de débarrasser l'eau de certaines matières organiques, matières solides, nutriments et organismes pathogènes, ou d'en réduire la quantité, avant d'être rejetées dans l'environnement [23]. Encore aujourd'hui, les usines de traitements des eaux usées sont trop souvent incapables d'éliminer adéquatement les rejets de contaminants «émergents», ce qui explique qu'ils sont détectables dans les cours d'eau récepteurs. Plusieurs continuent leurs travaux pour mettre en place diverses méthodes de dégradation, d'adsorption ou de technologies membranaires pour réduire ou éliminer les contaminants «émergents» ainsi que leurs sous-produits et leurs métabolites [24-26]. De plus, ces composés n'ont pas besoin d'être persistants dans l'environnement, contrairement aux POPs par exemple, pour causer des effets délétères à la vie aquatique ou pour être détectés. En effet, ils sont *i)* consommés ou utilisés en grandes quantités puis *ii)* constamment et continuellement excrétés dans les eaux d'assainissements. Aussi, ces molécules sont conçues pour être biologiquement actives à faibles doses et une fois dans l'environnement, elles peuvent affecter, non seulement les organismes aquatiques, mais également la population si elles persistent jusque dans l'eau que nous consommons.

En ce qui concerne leur toxicité, elle varie d'une famille de composés à une autre, mais les recherches effectuées quant à leur impact sur la vie aquatique démontrent clairement qu'ils sont problématiques. Une revue de la littérature de Farré *et al.* [18] met en évidence les diverses et multiples exemples d'effets écotoxicologiques causés par les contaminants «émergents», leurs métabolites et leurs sous-produits sur des espèces aquatiques, des plantes, des bactéries et des espèces d'invertébrés. L'étude de l'impact de ces composés sur la santé

humaine est difficile à réaliser, en raison des faibles concentrations retrouvées dans l'eau potable, soit entre 0.03 et 2 ng L<sup>-1</sup> [27]. Par exemple, la quantité maximale calculée pour un seul composé pharmaceutique dans l'eau ingérée par un individu au courant de sa vie (établie à 70 ans par l'Organisation mondiale de la Santé, OMS) selon une consommation journalière de 2 L est inférieure à une dose journalière prescrite pour une thérapie normale [28, 29]. Les effets de toxicité accrue démontrés et répertoriés sur les organismes dans l'environnement par les contaminants «émergents» seraient négligeables sur les humains. Toutefois, cette affirmation repose sur quelques suppositions *a priori*. Tout d'abord, que les effets désirés et secondaires causés pas la thérapie à court terme selon une forte dose demeurent les mêmes pour une exposition à long terme durant toute une vie, c'est-à-dire à de petites doses à long terme. Ensuite, que les effets ne changent pas en fonction de l'âge des individus, que ce soit pour un fœtus, un bébé, un jeune adulte ou une personne âgée. Finalement, que l'effet d'un seul composé est comparable à celui d'un mélange de composés (autre que des produits pharmaceutiques) et dont nous ne connaissons pas encore leur rôle ou leur mécanisme d'action sur l'humain et auxquels nous sommes exposés. Ceci est surtout important lorsque nous considérons les effets particuliers des EDCs parmi les composés d'intérêts «émergents», ayant des propriétés hormono-mimétiques à de très faibles doses. Dans ce contexte, et compte-tenu de l'incertitude envers l'impact des contaminants «émergents» sur l'homme, une approche proactive devrait être adoptée à leur égard, face à leur identification, leur détection, leur quantification dans l'environnement et leurs risques toxicologiques.

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

### **1.2.1 Concept et définitions**

Les EDCs font parties des composés qualifiés de contaminants «émergents». L'utilisation de l'expression perturbateur endocrinien est apparue lors d'une conférence américaine à Racine dans le Wisconsin en 1991, à laquelle ont participé 21 chercheurs dont, en particulier, l'organisatrice Theodora Colborn [30]. Cette conférence est survenue suite à la découverte du trouble de déficit de l'attention et de développement physique chez des enfants de femmes ayant consommées du poisson contaminé en PCBs dans la région des

Grands Lacs. Ce sont cependant deux ouvrages qui vont susciter un intérêt progressif aux EDCs. Le premier est un rapport rédigé en 1995 pour le gouvernement danois par Toppari *et al.* [31] qui se penche sur les substances chimiques responsables d'avoir des effets oestrogéniques sur la reproduction masculine. Le second est un livre publié par la biologiste américaine Theodora Colborn intitulé *Our stolen future* [32] qui dénonce la présence et les effets des EDCs dans l'environnement.

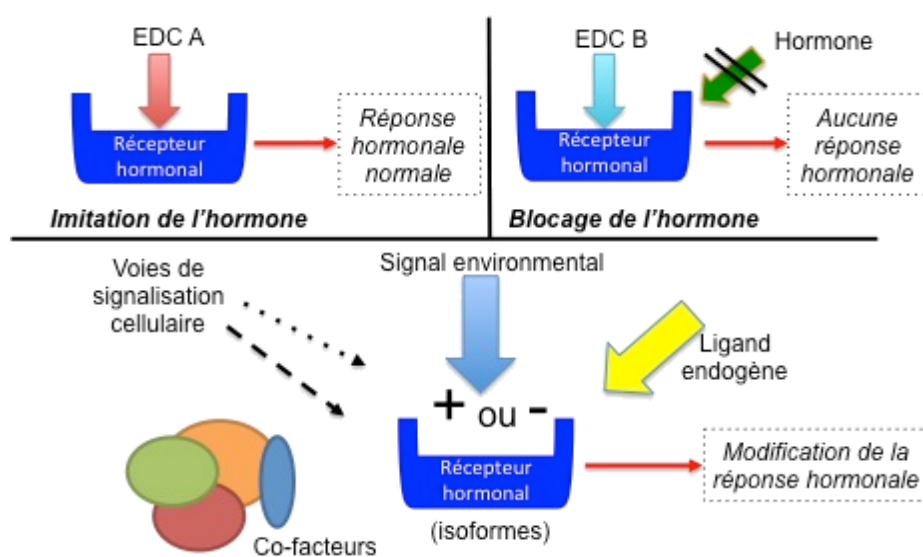
Il existe plusieurs définitions associées aux EDCs, mais il n'y a pas un consensus à savoir laquelle est préférable. En 1996, au Royaume-Uni, suite à un colloque organisé par la Commission européenne, l'Organisation pour la coopération et le développement économiques (OCDE) à Weybridge, les EDCs sont définis ainsi: «une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale» [33]. La US EPA, pour sa part, offre une définition alternative : «un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme» [34]. En 2002, l'OMS présente une version un peu différente des deux dernières, mais qui fait référence à la progéniture des individus ou espèces exposés aux EDCs comme le fait la définition de Weybridge : «les EDCs sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants» [35]. Dernièrement, la *Endocrine Society* a également proposé une définition pour les EDCs : «un agent exogène, ou un mélange de plusieurs substances chimiques, qui interfère de quelque façon que ce soit avec l'activité hormonale» [36]. Ce qu'il faut retenir de toutes ces définitions c'est que les EDCs agissent sur le système hormonal des organismes vivants. C'est une attaque qui peut être qualifiée de mécanistique à court ou à long terme sur un être vivant ou sur sa descendance, contrairement par exemple aux substances toxiques qui ont un effet direct une fois qu'on y est exposé.

### **1.2.1.1 Modes d'action, sources et activités**

Les EDCs peuvent cibler plusieurs sites hormono-sensibles, que ce soit chez l'humain ou les autres organismes vivants, selon différentes actions. Cette vulnérabilité physiologique



aux EDCs, fait en sorte qu'ils modifient la réponse des récepteurs hormonaux et homéostatiques qui permettent à un organisme vivant de communiquer et répondre adéquatement à son environnement [37]. Ces composés peuvent imiter l'action d'une hormone naturelle de différentes façons (**Figure 1-2**), selon *i*) un effet agoniste (activité xenoestrogène ou xenoandrogène) en se fixant à un récepteur cellulaire et causer une réponse dite normale, *ii*) un effet antagoniste (activité antiestrogène ou antiandrogène) en empêchant l'émission d'un signal normal en se liant au site du récepteur hormonal et *iii*) une modification des concentrations d'hormones libérées naturellement dans l'organisme en empêchant ou gênant le mécanisme de production ou de régulation des récepteurs [38, 39].



**Figure 1-2** Illustration de l'effet agoniste (*Toxicant A*), l'effet antagoniste (*Toxicant B*) et les réponses variables des récepteurs hormonaux suite à une exposition aux EDCs [39].

Les composés identifiés comme étant des EDCs peuvent avoir des propriétés physico-chimiques différentes et sont nombreux. Ils peuvent être de sources industrielles (PCBs, pesticides, hormones synthétiques) ou naturelles (hormones naturelles, phytoestrogènes). En général, ce sont des composés halogénés (contenant un atome de chlore ou de brome) ou contiennent un groupement phénolique possiblement responsable de leur effet endocrinien puisqu'il induit une réponse chez les récepteurs de la même manière que les hormones naturelles chez les mammifères [41].

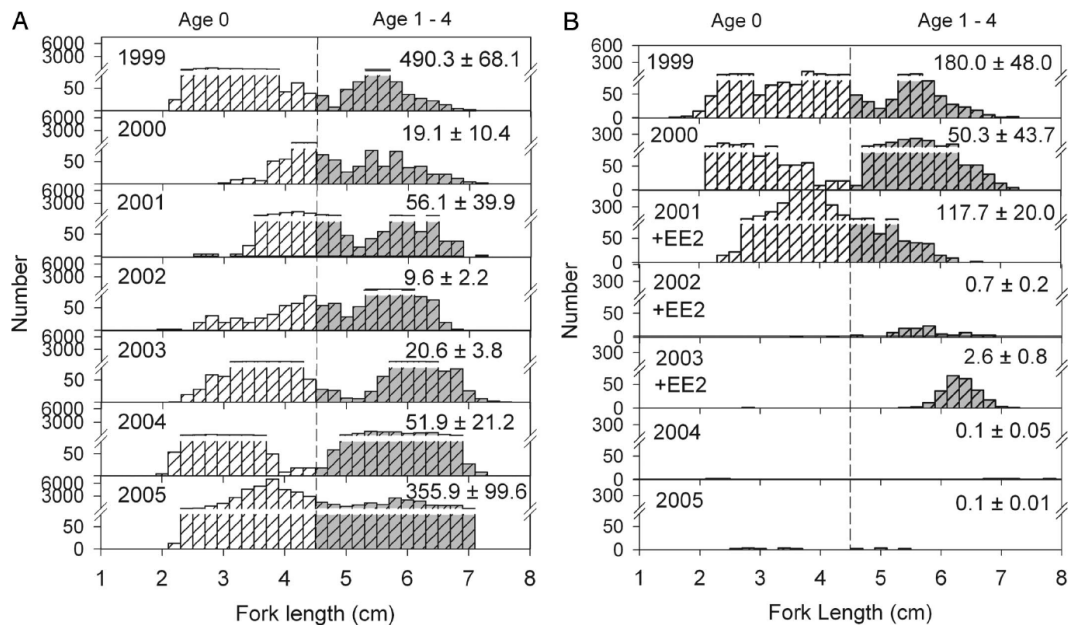
### 1.2.1.2 Effets toxicologiques complexes

L'évaluation de la toxicité des EDCs représente un défi important, pour plusieurs raisons [36, 42]. Une des difficultés pour certains EDCs est que leurs modes d'actions varient et peuvent être à la fois xenoestrogénique et antiestrogénique. Aussi, les récepteurs hormonaux s'expriment différemment dans différents tissus et donc la réponse toxicologique peut changer selon les tissus ciblés. Également, le choix de l'animal pour effectuer les tests est important, puisqu'il existe des incertitudes sur la sensibilité d'une espèce à l'autre et même dans certains cas à l'intérieur d'une même espèce. De plus, les effets des EDCs sont perceptibles à de faibles doses pouvant engendrer des réponses biologiques moins reproductibles [43]. Surtout, l'effet peut apparaître à court ou à long terme suite à une exposition aux EDCs. Ce qui affecte les conclusions possibles, comme dans le cas d'une hormone synthétique, le diéthylstilbestrole (DES), administré aux femmes enceintes pendant plus de 30 ans, de 1940 à 1970. Le DES devait servir à prévenir les fausses-couches, les hémorragies, ainsi que d'autres complications liées à la grossesse. A priori, les mères et leurs bébés n'avaient aucun signe d'effets secondaires. Des effets sérieux chez les descendants de ces femmes, y compris le développement d'un type de cancer rare de l'utérus chez les filles, n'ont été décelés qu'à la puberté [44, 45]. Enfin, il faut aussi considérer les effets additifs associés à un mélange complexe contenant plusieurs EDCs, pour déterminer la toxicité et le mécanisme d'action sur les récepteurs et l'impact sur l'environnement [46]. Donc, une démarche scientifique adéquate est requise lors de l'évaluation des risques toxicologiques pour les EDCs dans les organismes vivants.

Comme pour la majorité des contaminants «émergents», les effets des EDCs sur les espèces animales sont mieux documentés que chez l'humain. Le

**Tableau 1-1** énumère plusieurs exemples des conséquences d'une exposition aux EDCs chez différentes espèces dans l'environnement. Les effets des EDCs sur l'écosystème aquatique et terrestre sont clairement démontrés dans la littérature et acceptés par la communauté scientifique. Quoique pertinents, les résultats obtenus sont souvent ponctuels et les doses demeurent souvent plus élevées que celles trouvées naturellement dans l'environnement. En particulier, l'étude de Kidd *et al.* [47], vérifie l'impact à long terme (7 ans), selon une dose typiquement présente dans la nature (5-6 ng L<sup>-1</sup>) d'éthinylestradiol (une

hormone synthétique) sur les ménés têtes-de-boule (poisson d'eau douce). Les tests ont été effectués sur deux lacs expérimentaux naturels en Ontario (Canada), dont un pollué volontairement avec l'éthinylestradiol de manière à pouvoir mesurer son effet sur la population de poissons. Ils ont prouvé qu'une exposition à un EDC peut conduire à une production de vitellogénine, un précurseur du blanc d'oeuf, équivalente chez les mâles et les femelles et à leur féminisation par l'apparition d'ovocytes dans les testicules. Ces effets secondaires ont entraîné une disparition quasi complète (**Figure 1-3**) des ménés têtes-de-boule dans le lac contaminé, par rapport à un comportement normal dans le lac ne contenant pas d'éthinylestradiol. C'était la première fois qu'une telle étude a été faite selon des conditions typiques, sur le terrain, avec des doses et des temps d'exposition réalistes et prolongés, sur une espèce aquatique exposée à un composé hormono-mimétique. Ces résultats sont d'autant plus intéressants puisqu'ils portent sur un seul EDC et plusieurs espèces de poissons (tête-de-boule, mullet perlé, touladi et meunier noir) ont été testées. La sensibilité varie d'une espèce à l'autre, avec, par exemple, les meuniers noirs qui n'ont pas été affectés [48]. Ce qui ajoute à la complexité quant aux effets des EDCs dans l'environnement.

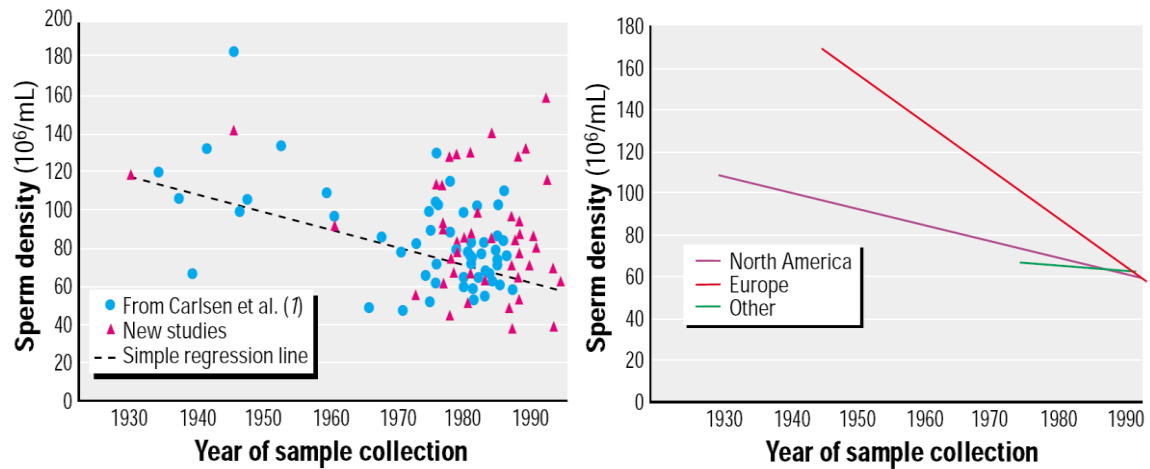


**Figure 1-3** Fréquence de la taille des poissons par mesure de la longueur de fourche pour le lac non-contaminé (A) et celui contaminé (B) avec 5-6 ng L<sup>-1</sup> d'éthinylestradiol sur une période de 7 ans [47].

**Tableau 1-1** Effets observés sur plusieurs espèces exposés à des EDCs environnementaux

Espèce	EDCs (famille)	Effet	Référence
<i>Mammifères</i>			
Bétail	Coumestrole (phytoestrogène)	Infertilité	[49]
Lapins	Coumestan (isoflavonoïde)	Infertilité, ovulation inhibée	[49]
Moutons	Coumestan (isoflavonoïde)	Infertilité, dystocie	[49]
Guépards	Aidzeine, Genistéine (phytoestrogène)	Altération des fonctions de reproduction et maladie du foie	[50]
Phoques	PCB (pesticide)	Altération des fonctions de reproduction	[39]
Souris	DES (hormone)	Tumeurs utérines, infertilité, ovulation inhibée	[51]
<i>Oiseaux</i>			
Caille japonaise	<i>o,p'</i> -DDT (pesticide)	Hématologie et plumage anormaux	[52]
Mouettes	<i>o,p'</i> -DDT (pesticide)	Tissu ovarien anormal et présence de trompes utérines chez les mâles	[53]
<i>Reptiles</i>			
Crocodiles	<i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE (pesticide)	Gonades anormales, ratio mâle/femelle altéré	[54] [55]
Tortues à oreilles rouges	<i>trans</i> -nonachlore, <i>cis</i> -nonachlore, arochlore 1242, <i>p,p'</i> -DDE, chlordane (pesticide)	Altération des fonctions de reproduction	[56]
<i>Poissons</i>			
Gambusies	Androsténédione (hormone)	Masculinisation	[57]
Poissons zèbres	5 $\alpha$ -dihydrotesto, 17 $\alpha$ -méthyltesto (Hormone)	Activation des sites récepteurs androgéniques	[58]
<i>Invertébrés</i>			
Copépodes	Bisphénole-A,	Maturation sexuelle et production d'œufs accélérée	[59]
<i>Daphnia magna</i>	PCB29, arochlore 1242, (pesticide) diéthyle phthalate (phthalate)	Temps de mue des femelles décalé	[60]
Escargots	Bisphénole-A, octylphénole	Masculinisation, formation d'organes sexuels féminins, malformation des oviductes	[61] [62]
Palourdes	Tributylétain (organostannique)	Ratio mâle/femelle altéré	[63]

Chez les humains il est beaucoup plus difficile de prouver l'existence d'un lien direct et sans équivoque entre les effets des EDCs et certaines observations et maladies apparues depuis quelques décennies. C'est un sujet dont il est souvent question dans la littérature et dont les conclusions ne sont pas unanimes quant aux liens entre les EDCs et les diverses maladies qui sont «apparues» chez l'humain [64-69]. C'est en 1992, lors de la publication dans le *British Medical Journal* qu'une méta-analyse reprenant 61 articles scientifiques de 1934 à 1990 et portant sur près de 15 000 hommes de tous les continents [70] que la question sur la qualité du sperme a été débattue. En effet, une décroissance de la production des spermatozoïdes durant ces années est constatée (**Figure 1-4**). La concentration moyenne étant passée de 113 millions à 66 millions de spermatozoïdes par millilitre. Une seconde étude [71] confirme les résultats de cette première étude controversée (**Figure 1-4**). À travers les années, ces résultats ont été confirmés par d'autres, notamment chez les hommes de Faorese (481 individus) [72] et au Danemark (4867 individus) [73]. Cependant des travaux effectués au Japon (792 individus) [74] montrent le contraire. Certains questionnent les méthodologies utilisées dans les études faites dans le passé [75] tandis que d'autres pensent que les taux de production de spermatozoïdes n'est pas en décroissance et que les études dans la littérature le confirment [76]. Parmi les conséquences attribuées à l'exposition des individus aux EDCs il y a : l'augmentation du taux de cancers testiculaires chez les jeunes hommes (20-40 ans) [77], affaiblissement du système immunitaire chez les jeunes écoliers danois [78], une puberté précoce (9-11 ans) chez les jeunes femmes [79] et l'augmentation des taux de cancer du sein chez les femmes adultes [80]. Toutefois, les tests effectués sur les animaux en laboratoires exposés aux EDCs (PCBs, DDE) soupçonnés d'être responsables du cancer du sein ne montrent aucun lien entre la maladie et ces substances [81, 82]. Une revue de la littérature détaillée avec tous les effets et les mécanismes d'action possibles des EDCs sur la santé humaine permet de voir l'ampleur et l'intérêt grandissant sur le rôle de ses composés sur notre bien-être [41].



**Figure 1-4** Réduction de la densité de sperme *i)* chez l’homme entre 1934 à 1990 à partir de 101 publications (haut) selon les travaux de Carlsen *et al.* [70] et *ii)* en fonction de l’année et de la région géographique (bas) avec régressions linéaires repris par Swan *et al.* [71].

Les espèces aquatiques et les animaux sont déjà affectés par les EDCs. Les effets sont multiples et incluent *i)* une baisse de fertilité chez les oiseaux et les poissons; *ii)* une diminution des éclosions chez les oiseaux, les poissons et les tortues; *iii)* la féminisation des mâles chez les poissons et les oiseaux et *iv)* des déficits immunitaires chez les oiseaux et les mammifères. Inversement, d’un point de vue toxicologique, il est difficile de faire une corrélation directe entre les EDCs dans l’environnement et les maladies chez l’humain. Toutefois, il y a de nombreux facteurs à considérer quant au danger chez les individus, soit *i)* les actions additives éventuelles (mélanges complexes) ne sont pas toujours considérées, *ii)* les facteurs de risque pour les groupes sensibles, tels que les femmes enceintes, les fœtus, les enfants en bas âge et les personnes âgées doivent aussi être considérés, *iii)* qu’il existe diverses sources d’expositions à part l’eau, comme l’alimentation et l’utilisation de produits de soins personnels (cosmétiques), *iv)* en terme de nombre, la quantité d’EDCs connus aujourd’hui ne représente que «la pointe de l’iceberg» enfin *v)* qu’ils ont un effet physiologique à des doses très faibles qui correspondent à des concentrations dans les milieux environnementaux que nous ne pouvons pas encore détecter dans plusieurs cas. Alors, il faut continuer à améliorer nos connaissances sur les conséquences des expositions à très faibles doses d’EDCs pour la santé humaine.

## 1.3 Les hormones stéroïdiennes

Parmi les groupes de substances confirmées comme étant des EDCs (composés organiques polychlorés, les pesticides, les phthalates, les phytoestrogènes), celui représenté par les hormones stéroïdiennes (HS) naturelles et synthétiques sont particulièrement d'intérêt en raison de leur activité oestrogénique élevée, surtout pour les HS estrogéniques. D'ailleurs les HS (i.e. l'estradiol ou l'estriol) sont utilisées comme référence (contrôle positif) pour déterminer le niveau d'oestrogénicité d'une substance soupçonnée d'être un EDC [59]. Plusieurs études ont confirmé la présence des HS dans l'environnement, surtout dans les milieux aquatiques. Leurs effets comme EDCs dans l'environnement peuvent se manifester à de très faibles concentrations, soit  $1 \text{ ng L}^{-1}$  [83-85]. Pour le moment, aucune législation n'existe pour les HS et les EDCs en général dans l'environnement. Toutefois, une décision à ce sujet par l'Union Européenne est prévue en décembre 2013 [86].

Ceci implique que le développement de méthodes analytiques sensibles, efficaces, robustes et validées, seront nécessaires pour faire le suivi des HS dans les matrices environnementales. De plus, l'évaluation de techniques alternatives dans les usines de traitement des eaux usées (principale source des HS dans l'environnement, voir la **section 1.1.1**) pour la réduction de ces composés devra répondre aux nouvelles normes qui seront établies.

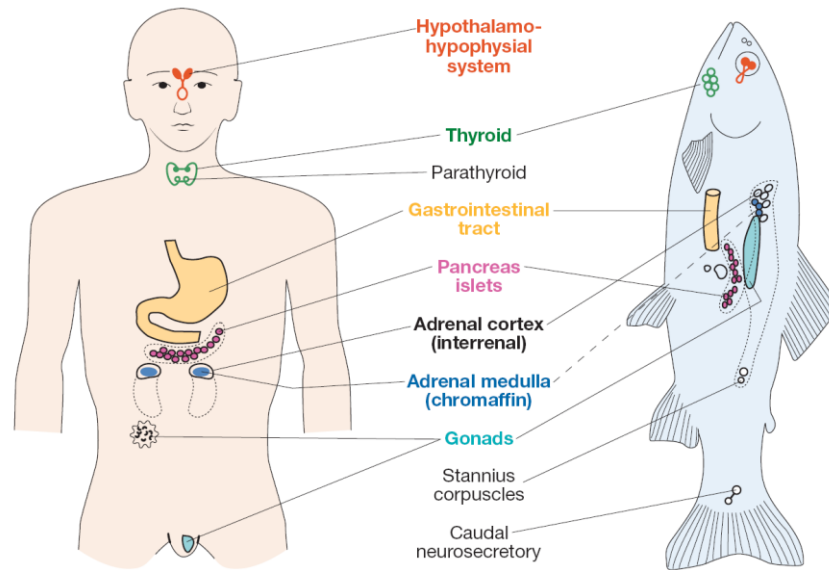
### 1.3.1 Bref historique

Le professeur de physiologie Ernest Starling de l'*University College London* en Grande-Bretagne mentionne pour la première fois le mot «hormone» dans une conférence (*Croonian Lectures*) au *Royal College of Physicians* à Londres. C'est dans une publication en 1905 dans le prestigieux journal scientifique, le *Lancet*, qu'il définit le terme : «un messenger chimique qui en se déplaçant rapidement d'une cellule à l'autre dans le flux sanguin peut coordonner les activités et la croissance pour différentes parties du corps» [87]. Pendant leurs travaux en 1902, Starling et son collègue Bayliss découvrent une substance capable de déclencher la sécrétion pancréatique, soit la «sécrétine». Le terme «hormone» (1905) remplaça le mot

«sécrétine» pour désigner toutes les substances qui agissent à distance (par voie sanguine) sur les organes du corps. L'origine étymologique du mot hormone est formée du grec ancien *ormè* («impulsion»), *hormaien* («exciter») avec le suffixe des termes de chimie –one. Depuis, les hormones ont suscité énormément d'intérêt dans plusieurs secteurs de la science, de la chimie à l'épidémiologie. Leurs études ont été bénéfiques pour la société, que ce soit au niveau de la santé humaine et socio-économique, tel que la contraception (plus connue sous le nom de «la pilule»), la fécondation *in vitro* et les hormones recombinantes.

Dans la première moitié du 20<sup>ième</sup> siècle, soit 20 ans après que Starling mentionne le mot «hormone», les scientifiques ont réussi à élucider la nature chimique d'un des composés de la famille des hormones. Kendall à la *Mayo Clinic* à Rochester (New York) a purifié et déterminé les structures de la cortisone (un stéroïde) [88], tandis qu'en 1926, Harington à Londres réalise la première synthèse d'une hormone, soit la thyroxine [89]. Aussi, entre les années 1920 et 1930, plusieurs hormones différentes sont découvertes et caractérisées, dont les œstrogènes, la testostérone et la progestérone (PROG). Butenandt, Doisy, Kendall, Banting et Reichstein ont d'ailleurs obtenu des Prix Nobel pour ces travaux. C'est dans les mêmes années, qu'il a été conclu que les hormones étaient produites par les mêmes glandes endocriniennes d'une espèce à l'autre (**Figure 1-5**), mais dont le mécanisme d'action pouvait varier selon les espèces et la nature des tissus [90]. Dans les années 1950 à 1960, suite à ses travaux sur les lapins, Pincus développe la contraception orale, selon un mécanisme qui stoppe l'ovulation chez la femme par l'intermédiaire d'hormones dérivées des œstrogènes et de la progestérone [91]. Dans les années suivantes beaucoup d'efforts ont été consacrés à mieux comprendre comment les hormones influencent l'expression des gènes en étudiant les récepteurs, un domaine encore d'importance avec 4000 articles scientifiques publiés sur les récepteurs nucléaires en 2004 [90]. En 1986, Evans et Jensen dans les laboratoires de Chambon à Strasbourg clonent plusieurs récepteurs pour les œstrogènes, les glucocorticoïdes et les hormones de la thyroïde, travaux pour lesquels ils ont obtenu le *Lasker Award* (contribution majeure en recherche médicale) [92].

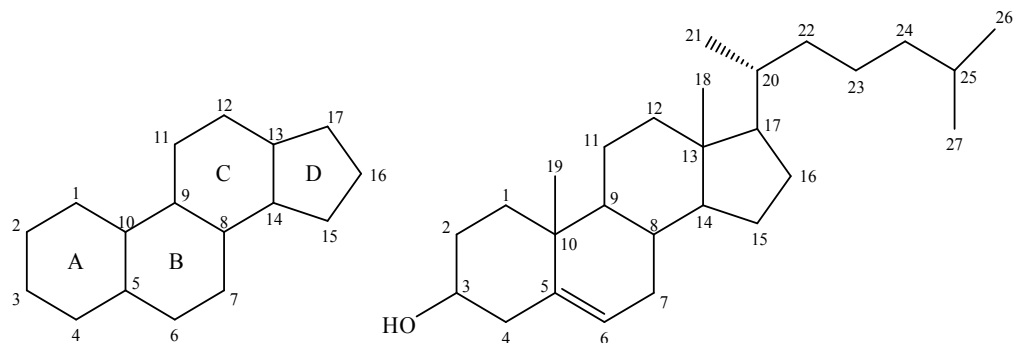




**Figure 1-5** Les mêmes glandes endocriniennes sont responsables de l'excrétion des hormones, dont voici un exemple comparatif entre l'humain et le poisson, deux espèces très différentes [90].

### 1.3.2 Structure et fonction physiologique

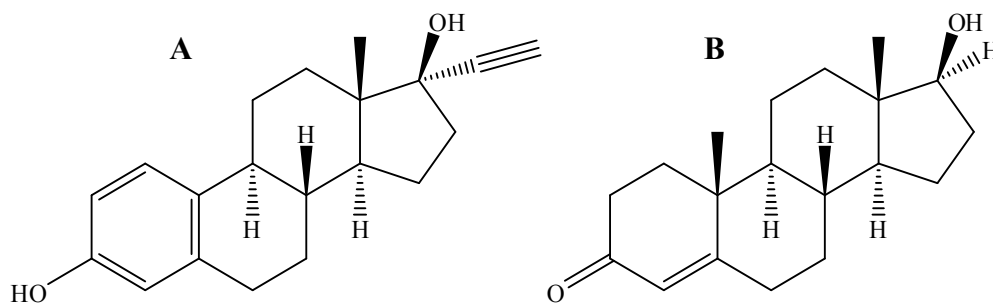
La structure chimique de base dérivée de celle du cholestérol de tous les HS est nommée cyclopentanoperhydrophénanthrène et est formée de trois cycles de six carbones et d'un cycle de cinq carbones. Les différents HS tirent leur spécificité suite à des modifications chimiques de cette structure de base. La nomenclature assigne les lettres A, B, C et D aux quatre cycles de la structure et un chiffre en identifie chaque carbone (**Figure 1-6**).



**Figure 1-6** Numérotation du squelette et identification des cycles pour le cyclopentanoperhydrophénanthrène (à gauche) et structure du cholestérol (à droite).

Les HS ne sont pas planaires, malgré le fait qu'elles soient représentées sur papier selon cette projection. En effet, les différents groupements chimiques et les atomes d'hydrogènes peuvent être situés dans le plan de la feuille (trait plein), vers l'avant du plan (triangle plein) et vers l'arrière du plan (triangle hachuré). Le triangle plein est défini comme étant une liaison béta ( $\beta$ ) tandis que le triangle hachuré représente une liaison alpha ( $\alpha$ ). Pour tous les atomes de carbone secondaire liés par une seule liaison à un groupement fonctionnel dans la structure cyclique, il faut indiquer le type de configuration ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) en utilisant les noms systématiques (

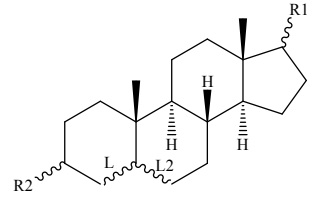
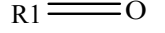



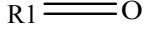


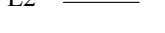
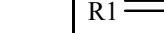
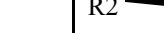
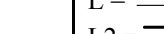
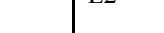




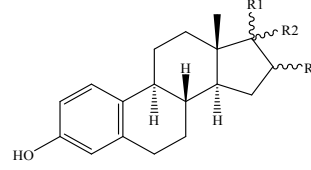
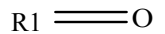





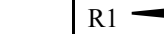
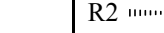




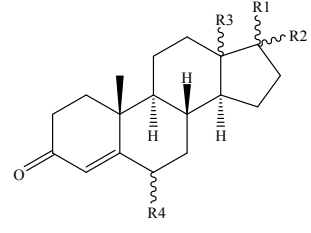

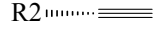



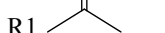


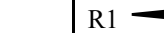
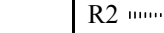




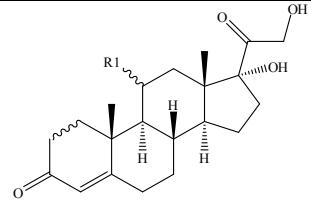

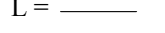
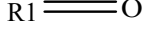
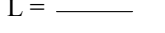
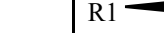



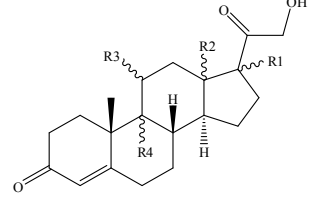



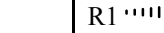
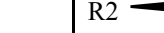
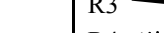

**Figure 1-7).**



**Figure 1-7** Structure de deux HS, dont les noms triviaux sont l'éthinylestradiol (A) et la testostérone (B) et les noms systématiques sont le (17 $\beta$ )-17-ethinylestra-1,3,5(10)-triène-3,17-diol (A) et le (17 $\beta$ )-17-hydroxyandrost-4-en-3-one (B).

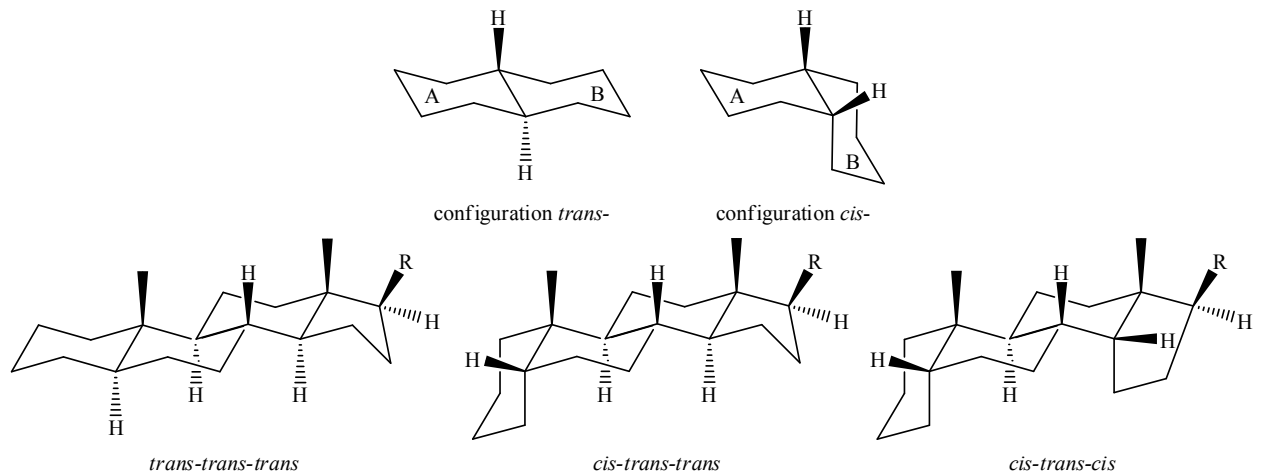
Les différentes classes de HS sont identifiées selon la nature et l'emplacement des groupements fonctionnels en plus des sites insaturés. Il existe cinq familles de HS (**Tableau 1-2**) dont les rôles chez les animaux sont multiples: les androgènes, les oestrogènes, les progestatifs, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes [93, 94].

**Tableau 1-2** Les cinq classes de HS avec leurs structures générales, leurs noms triviaux ainsi que les acronymes pour leurs molécules les plus connues et leurs rôles physiologiques chez les animaux (R correspond au groupement fonctionnel et L correspond au type de liaison).

Familles				
<i>Androgènes/rôle</i>				
Ils déterminent le développement du caractère et de la fonction sexuelle				
	R1 =  R2 =  L =  L2 = 	R1 =  R2 =  L =  L2 = 	R1 =  R2 =  L =  L2 = 	R1 =  R2 =  L =  L2 = 
	Androstérone (A)	Épiandrostérone (EA)	Déhydroépiandrostéron (DHEA)	Testostérone (Testo)
<i>Oestrogènes/rôle</i>				
Ils déterminent le développement du caractère et de la fonction sexuelle				
	R1 =  R2 =  R3 = 	R1 =  R2 =  R3 = 	R1 =  R2 =  R3 = 	R1 =  R2 =  R3 = 
	Estrone (E1)	17β-estradiol (E2)	17α-éthinyloestradiol (EE2)	Estriol (E3)
<i>Progestatifs/rôle</i>				
Ils participent à la régulation des cycles menstruels et à la gestation				
	R1 =  R2 =  R3 =  R4 = 	R1 =  R2 =  R3 =  R4 = 	R1 =  R2 =  R3 = 	R1 =  R2 =  R3 = 
	Lévonorgestrel (LEVO)	Médroxyprogestérone (MPROG)	Norethindrone (NORE)	Progestérone (PROG)
<i>Glucocorticoïdes/rôle</i>				
Ils participent à la régulation du métabolisme glucidique, des protéines et des lipides				
	R1 =  L = 	R1 =  L = 	R1 =  L = 	R1 =  L = 
	Cortisol (COR)	Cortisone (CORT)	Prednisolone (PRE)	Prednisone (PRED)
<i>Minéralocorticoïdes/rôle</i>				
Ils participent à la régulation des équilibres salins (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> ) dans les tissus				
	R2 =  R3 = 	R2 = 	R1 =  R2 =  R3 =  R4 = 	
	Aldostérone (ALDO)	Déoxycorticostérone (DOCORT)	Fludrocortisone (FLUDRO)	

La grande majorité des HS sont synthétisées dans les cellules à partir du cholestérol [95]. Les molécules de HS sécrétées sont transportées vers les tissus cibles par des protéines plasmiques dans le sang pour atteindre les récepteurs cellulaires. Selon la distance des récepteurs des tissus cibles, il existe trois types de communication hormonale [95], soit endocrine (action sur les cellules cibles à longue distance via le sang), paracrine (action à courte distance sur les cellules voisines, comme pour le pancréas) et autocrine (action sur la cellule elle-même, comme pour les tissus adipeux). Par leur caractère hydrophobique, les HS peuvent franchir facilement les bicouches lipidiques membranaires pour atteindre l'intérieur des cellules pour se fixer sur les récepteurs et jouer un rôle vital sur de multiples processus biologiques (la différenciation cellulaire, l'homéostasie, la reproduction ou la régulation des rythmes chronobiologiques).

Compte tenu de l'importance des HS dans l'organisme, et de la manière dont la structure des HS influence leur mode d'action envers un récepteur, il est intéressant d'examiner leurs structures moléculaires tridimensionnelles. Ceci est primordial pour comprendre comment un récepteur ou une enzyme reconnaît une HS et comment les chimistes peuvent synthétiser des HS ou des médicaments qui auront pour objectifs de cibler ces récepteurs pour usage thérapeutique [96]. Puisqu'il y a quatre cycles carbonés dans la structure de base des HS, il existe alors trois points de contact qui partagent deux atomes de carbone, soit les couples A/B, B/C et C/D (**Figure 1-6**), ce qui implique qu'à chaque point de contact il peut y avoir la conformation *cis*- ou *trans*- [97]. Avec trois points de contact, et deux configurations possibles, nous avons donc huit isomères possibles. La **Figure 1-8** montrent les structures tridimensionnelles les plus communes parmi les isomères de configuration des HS. L'isomérisation *cis-trans* n'est pas possible au point de contact A/B quand le cycle carboné A contient une insaturation, comme pour la testostérone, et pour les oestrogènes pour lesquelles le cycle A est aromatique (**Tableau 1-2**). En effet, pour les oestrogènes, le cycle aromatique leur concède une structure complètement planaire, ce qui joue un rôle déterminant dans leur activité biologique, par rapport aux récepteurs oestrogéniques [96] (ce qui explique aussi comment certains ECDs autres que les HS se lient à ces récepteurs oestrogéniques, tel que le DDT ou la génistéine).



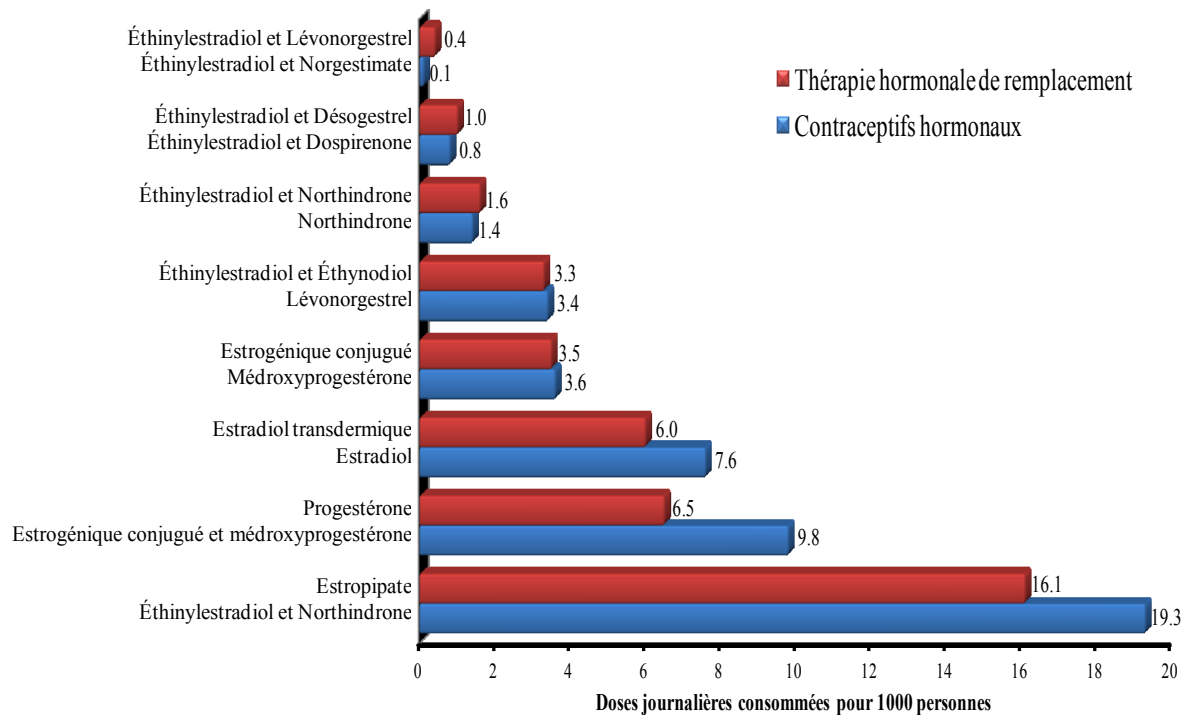
**Figure 1-8** Exemples de configuration *trans-* et *cis-* pour un système à deux cycles carbonés avec un point de contact (A/B) et configurations les plus communes pour les HS.

Donc, le rôle des HS est essentiel chez les mammifères pour leur développement, pour les fonctions physiologiques et l'homéostasie. Le système endocrinien se compose d'organes sécréteurs, les glandes endocrines (**Figure 1-5**), qui synthétisent et libèrent les HS dans l'organisme. Elles sont transportées par le sang jusqu'aux cellules où se trouvent les récepteurs sur lesquelles elles agissent. Les récepteurs possèdent un site de liaison spécifique auxquels les HS se lient selon leurs formes respectives (configurations), similaires à un système de clef et de serrure.

### 1.3.3 Les hormones stéroïdiennes oestrogéniques et progestagéniques

Notre discussion portera dorénavant sur l'identification, les sources, l'occurrence, la détection et le traitement des HS dans les milieux aquatiques, plus spécifiquement sur les oestrogènes (E2, E3, E1 et EE2) et les progestatifs (LEVO, NORE, MPROG et PROG) présentés au **Tableau 1-2**. Compte tenu du nombre important de HS, il a fallu faire un choix quant aux composés à cibler dans les milieux environnementaux. Ces deux classes de HS sont parmi celles dont il y a le plus d'information dans la littérature, surtout pour les oestrogènes. Ils sont présents naturellement chez l'humain alors que d'autres sont synthétiques et ils sont prescrits en quantités importantes au Québec (Canada) (**Figure 1-9**). La somme des oestrogènes vendue en pharmacie signifie qu'environ 17% des femmes en

consomment, tous âges confondus, au Québec, Canada. Aussi, nos travaux dans les dernières années [98] montrent des quantités détectées pour les oestrogènes et les progestatifs dans les eaux de surfaces de la ville de Montréal (Québec, Canada) et de Laval (Québec, Canada) ainsi que dans les eaux usées de l'usine de traitement de la ville de Montréal (affluents, collecteurs Nord et Sud, et effluents) (**Tableau 1-3.**) Pour ces raisons, nous avons porté une attention particulière sur ces composés puisqu'ils sont présents dans notre environnement immédiat.



**Figure 1-9** Doses (microgrammes) journalières de contraceptifs hormonaux et de composés de thérapie hormonale de remplacement consommées par un millier de personnes au Québec, Canada [99].

**Tableau 1-3** Concentration ( $\text{ng L}^{-1}$ ) des hormones stéroïdiennes oestrogéniques et progestagéniques dans les eaux de surfaces de Laval (Québec, Canada, Mille Îles) et de Montréal (Québec, Canada, St-Laurent) ainsi que les affluents (collecteurs Nord et Sud) et les effluents de la station des eaux usées de la ville de Montréal (tiré de Viglino *et al.* [98]).

Composés	Rivière	Fleuve	Usine de traitement des eaux usées de Montréal		
	Mille Îles	St-Laurent	Collecteur Nord	Collecteur Sud	Effluent
Estriol	n.d.	n.d.	$243 \pm 24$	$230 \pm 13$	Trace
Estradiol	$9 \pm 3$	$8 \pm 4$	$125 \pm 4$	$120 \pm 6$	$90 \pm 4$
17- $\alpha$ -éthynylestradiol	n.d.	n.d.	$75 \pm 3$	$90 \pm 4$	n.d.
Estrone	n.d.	n.d.	Trace	Trace	n.d.
Norethindrone	n.d.	n.d.	$205 \pm 3$	$70 \pm 4$	$53 \pm 3$
Lévonorgestrel	n.d.	n.d.	$150 \pm 7$	$170 \pm 4$	$30 \pm 6$
Médroxyprogestérone	Trace	n.d.	$5 \pm 3$	n.d.	n.d.
Progestérone	3	n.d.	Trace	n.d.	n.d.

n.d. = composé non-détecté; Trace = composé détecté mais en-dessous de la limite de détection

### 1.3.3.1 Propriétés physico-chimiques, sources et devenir environnemental

De manière à comprendre comment se comportent les oestrogènes et les progestatifs dans l'environnement, il faut considérer leurs propriétés physico-chimiques (**Tableau 1-3**). Elles permettront de mieux évaluer et prédire leur devenir environnemental. La solubilité dans l'eau et le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) seront particulièrement importants quant à leur comportement dans l'environnement. La solubilité dans l'eau dépend de plusieurs facteurs, comme la température, la pression, le pH et la force ionique. En effet, pour toutes les hormones, la solubilité dans l'eau est faible, avec des valeurs qui varient entre 2 et  $13 \text{ mg L}^{-1}$  à des températures entre  $23^\circ\text{C}$  et  $25^\circ\text{C}$ , tandis qu'à  $27^\circ\text{C}$  pour l'E3 et l'E1 elle passe à 500 et  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivement. Le  $K_{ow}$  est un paramètre utile, puisqu'il permet de prédire la solubilité d'un composé et son potentiel de bioamplification. Les composés ayant un  $K_{ow}$  faible (en-dessous de 10) sont considérés comme étant hydrophiles, auront des valeurs de solubilité dans l'eau élevées et seront moins bioamplifiés le long des chaînes trophiques. Inversement, les composés ayant un  $K_{ow}$  élevé (au-dessus de 10 000), seront très lipophiles et hydrophobes, auront donc tendance à s'adsorber sur les particules de sol, les sédiments ou

sur la matière organique et seront plus facilement bioamplifiés dans les espèces animales [100]. Pour les hormones, les  $K_{ow}$  se situent entre 281 (E3) et 10 233 (E2). La constante d'Henry (l'aptitude d'une substance active à se volatiliser) et la pression de vapeur (l'aptitude d'une substance active en solution à se volatiliser) sont les deux caractéristiques chimiques les plus importantes pour déterminer si une substance peut se déplacer à longue distance dans l'atmosphère. Ces deux constantes (la pression de vapeur et celle d'Henry) pour les hormones sont très faibles, soit entre  $10^{-6}$  (PROG) et  $10^{-12}$  (**Tableau 1-4**). Donc les hormones ne sont pas susceptibles de se déplacer dans l'atmosphère à longue distance une fois en solution ou adsorbées sur un solide et ont un caractère hydrophobe assez important puisque'elles sont peu solubles dans l'eau.

Chez la femme, le E2, l'E3 et l'E1 sont des hormones présentent naturellement dans leur organisme. Le E2 est également utilisé comme traitement hormonal (transdermique ou par voie orale) chez les femmes dont les sécrétions ovariennes en oestrogènes sont limitées ou insuffisantes ainsi que pour réduire les effets de l'ostéoporose chez les femmes en ménopause [101, 102]. Le EE2 est l'oestrogène de synthèse le plus employé, principalement dans les contraceptifs oraux en association avec un progestatif de synthèse (**Figure 1-9**). Pour les progestatifs, ils regroupent une seule hormone naturelle, soit la PROG, alors que le LEVO, la NORE et la MPROG sont des hormones de synthèse qui sont presque exclusivement utilisées dans les contraceptifs oraux (en combinaison avec le EE2) ou pour les thérapies hormonales de remplacement (**Figure 1-9**). La PROG sert à préparer l'organisme pour la grossesse et assure le bon fonctionnement des glandes mammaires pour l'allaitement et diminuerait les chances de crises cardiaques ou de cancer du sein chez les femmes [103].

Dans les milieux agricoles, les oestrogènes et les progestatifs sont utilisés principalement pour promouvoir la croissance ainsi que pour l'élevage de population de poissons en milieu aquacole afin d'assurer une meilleure survie de l'espèce (majoritairement femelle en raison de l'utilisation des hormones oestrogéniques) [104]. Aux États-Unis et au Canada, le E2 en association avec la PROG sont utilisés pour l'élevage bovin, mais pas pour la volaille, pour améliorer le gain de poids et l'indice de conversion alimentaire [105].



**Tableau 1-4** Propriétés physico-chimiques des oestrogènes et progestatifs ciblés.

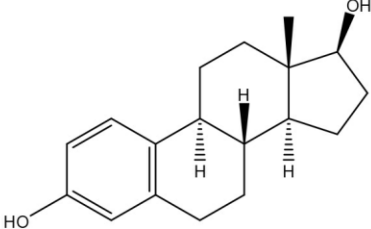
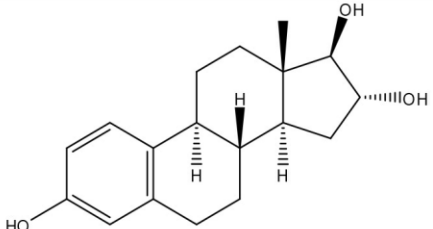
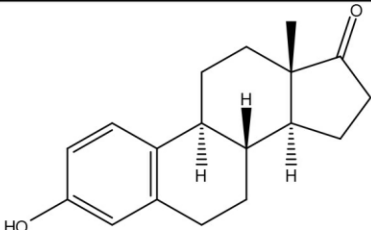
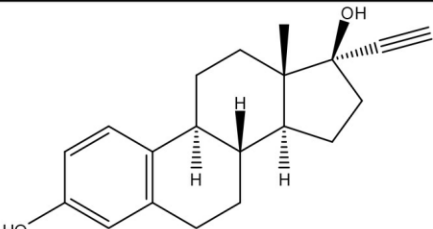
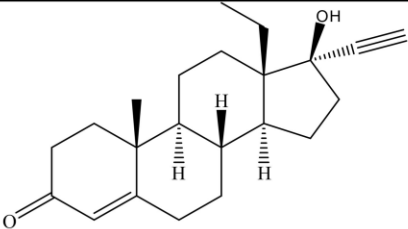
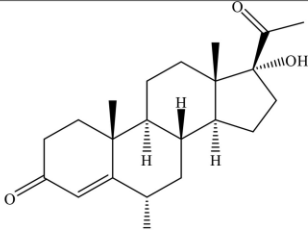
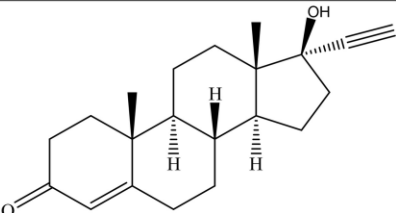
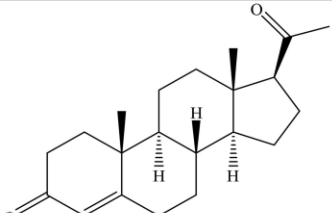
Nom (acronyme) CAS <sup>a</sup> Masse moléculaire <sup>a</sup>	Structure moléculaire	pK <sub>a</sub> <sup>a</sup>	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	Solubilité dans l'eau (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a,b,c</sup>	Pression de vapeur (mm Hg) <sup>a</sup>	Constante d'Henry (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<i>Oestrogènes</i>						
17β-estradiol (E2) CAS : 50-28-2 MM : 272.39 g mol <sup>-1</sup>		10.27	3.64	3.6 <sup>a</sup> 13 <sup>b</sup> 3.1 <sup>c</sup>	12.6 × 10 <sup>-9</sup>	36.4 × 10 <sup>-12</sup>
Estriol (E3) CAS : 50-27-1 MM : 288.39 g mol <sup>-1</sup>		10.54	2.45	500 <sup>a</sup> 13 <sup>b</sup>	9.93 × 10 <sup>-9</sup>	1.33 × 10 <sup>-12</sup>
Estrone (E1) CAS : 53-16-2 MM : 270.37 g mol <sup>-1</sup>		10.25	3.13	30 <sup>a</sup> 13 <sup>b</sup> 2.1 <sup>c</sup>	2.49 × 10 <sup>-10</sup>	3.8 × 10 <sup>-10</sup>
17α-éthynylestradiol (EE2) CAS : 57-63-6 MM : 296.41 g mol <sup>-1</sup>		10.46	4.15	11.29 <sup>a</sup> 4.8 <sup>b</sup> 3.1 <sup>c</sup>	2.67 × 10 <sup>-9</sup>	7.94 × 10 <sup>-12</sup>

Tableau 1-4. (suite)

Nom (acronyme) CAS <sup>a</sup> Masse moléculaire <sup>a</sup>	Structure moléculaire	pK <sub>a</sub> <sup>a</sup>	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	Solubilité dans l'eau (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a,b,c</sup>	Pression de vapeur (mm Hg) <sup>a</sup>	Constante d'Henry (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<i>Progestatifs</i>						
Lévonorgestrel (LEVO) CAS : 797-63-7 MM : 312.46 g mol <sup>-1</sup>		-	3.48	2.05 <sup>a</sup>	3.93 × 10 <sup>-10</sup>	7.7 × 10 <sup>-10</sup>
Médroxyprogestérone (MPROG) CAS : 520-85-4 MM : 344.5 g mol <sup>-1</sup>		-	3.50	2.95 <sup>a</sup>	1.93 × 10 <sup>-9</sup>	1.34 × 10 <sup>-8</sup>
Norethindrone (NORE) CAS : 68-22-4 MM : 298.43 g mol <sup>-1</sup>		-	2.97	7.43 <sup>a</sup>	7.31 × 10 <sup>-9</sup>	5.8 × 10 <sup>-10</sup>
Progestérone (PROG) CAS : 57-83-0 MM : 314.47 g mol <sup>-1</sup>		-	3.87	8.81 <sup>a</sup>	1.3 × 10 <sup>-6</sup>	6.49 × 10 <sup>-8</sup>

<sup>a</sup> Syracuse Research Corporation [106] avec la solubilité mesurée à 27 °C; <sup>b</sup> à 25 °C [107]; <sup>c</sup> à 23 °C [108].

Dans la Communauté Européenne, cette pratique n'est plus permise à l'intérieur des pays ou des pays importateurs depuis 1989 [109]. La majorité des hormones produites ou ingérées chez les mammifères sont éliminées sous leurs formes conjuguées dans les urines [110], en dérivées glucurono ou sulfoconjuguées. Ces modifications structurales ont lieu aux positions C3 ou C17 (**Figure 1-6**) et rendent ces nouveaux composés conjugués inactifs biologiquement, plus polaires et donc plus hydrophiles par rapport à l'hormone initiale. Même si ce sont les hormones conjuguées qui se retrouvent majoritairement dans les urines, les études [111-113] confirment que les hormones libres (intactes) ainsi qu'une partie des dérivées sulfates sont les espèces dominantes dans les rejets des stations d'eaux usées. En conséquence, il existe un phénomène de déconjugaison entre les égouts et les stations d'épuration. En effet, certaines bactéries dans les fèces (*Escherichia coli*) produisent des enzymes (glucuronidase ou sulfatase) qui peuvent être responsables de la déconjugaison observée [110].

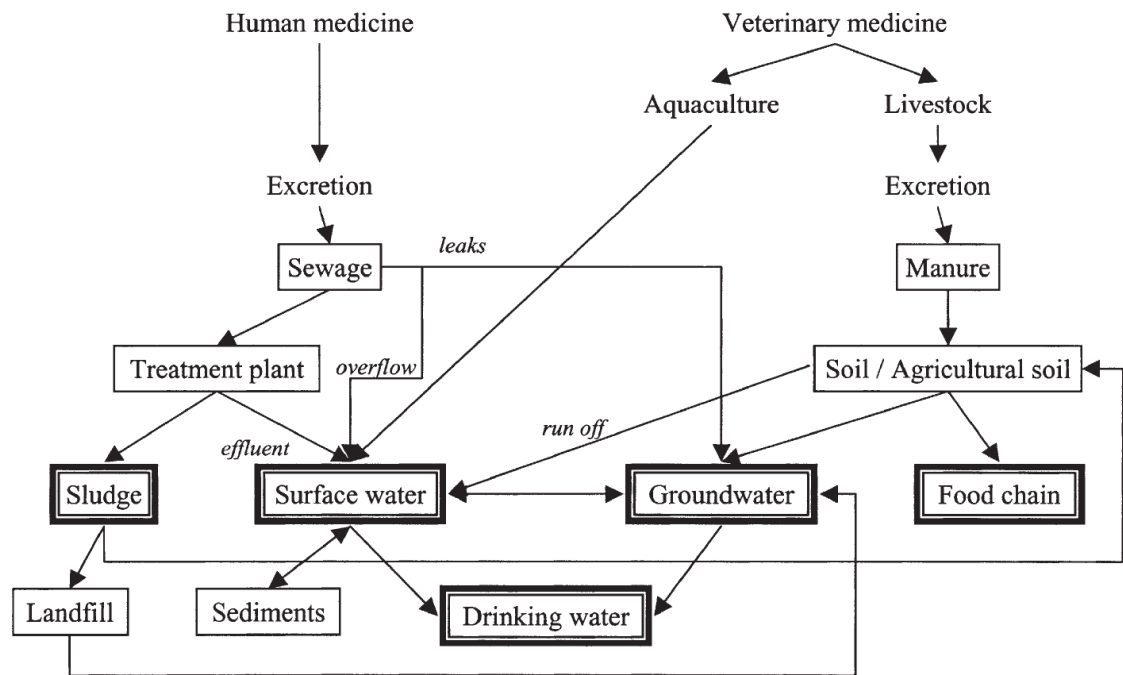
Une fois dans l'environnement, le devenir des oestrogènes et des progestatifs va dépendre d'une variété de processus physiques et de transformations, comme la sorption aux sols ou sédiments, la dégradation microbienne et les transformations photochimiques [107, 114]. Compte tenu de la faible solubilité dans l'eau et de leur caractère hydrophobe ( $K_{ow}$ ) (**Tableau 1-4**), les hormones possèdent une affinité pour les particules en suspension, les sédiments, les sols ou les boues [114-116]. La sorption peut provenir de plusieurs types d'interactions chimiques, tels que les ponts hydrogènes et les liaisons van der Waals [117]. La sorption va influencer le devenir et le transport des hormones de différentes manières. Dans la situation où l'adsorption se fait sur un solide immobile (ou des micropores), la biodisponibilité des hormones envers les microorganismes et le phénomène de percolation diminueront. En revanche, si l'adsorption a lieu sur des particules solides «mobiles», comme des argiles ou la matière organique dissoute, il peut y avoir un transport à longue distance (percolation et écoulement naturel de l'eau) avant d'avoir un effet perturbateur sur les microorganismes [118, 119]. Le phénomène d'adsorption dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule ainsi qu'à celles de l'adsorbant. La concentration en hormones, le pH, la nature des sédiments ou des sols (argiles et quantité de matière organique) et la quantité de sels dissous dans l'eau auront aussi un rôle à jouer dans l'adsorption de ces composés sur une phase solide [116, 120, 121]. En effet, l'adsorption des hormones sur la matière organique est plus importante en conditions acides [122] alors que

leur adsorption augmente sur les sédiments lorsque l'eau est plus saline et qu'elles sont présentes à de faibles concentrations [107]. Le EE2 est l'hormone avec le  $\log K_{ow}$  le plus élevé, à 4.15 (**Tableau 1-4**), et donc possède une plus grande affinité pour les solides que les autres oestrogènes [107, 114, 123], ce qui implique qu'elle sera difficilement détectée dans les fractions dissoutes des eaux environnementales. Inversement, l'E3 ( $\log K_{ow}$  de 2.45) serait l'hormone qui se retrouvera plus souvent dans la phase dissoute plutôt que particulaire dans l'eau comparativement aux autres hormones (**Tableau 1-4**).

La dégradation des hormones peut se faire par des processus abiotiques (réactions physiques ou chimiques), tels que des réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de photolyse et de réduction, ou par un processus biotique (bactéries). Les bactéries peuvent soit transformer les hormones selon des réactions d'oxydoréductions pour créer de l'énergie ou alors les métaboliser (source de carbone) pour la croissance cellulaire [124]. De plus, certaines espèces microbiennes peuvent transformer *i)* le cholestérol ou les phytostérols en hormones ou *ii)* certaines hormones en différentes hormones (tel que le E2 en E1) [125, 126]. La biodégradation des hormones a été étudiée dans de nombreux milieux sous différentes conditions, comme les boues d'usine d'épuration [127, 128], les eaux de surfaces [129] ainsi qu'en laboratoire [130, 131]. En plus des processus biotiques, ceux abiotiques jouent aussi un rôle déterminant pour la transformation des hormones dans l'environnement. Par exemple, le E2 peut être oxydé naturellement en E1, ce qui peut causer l'augmentation des concentrations de l'E1 mesurées dans certains procédés de traitement des eaux usées ainsi que la présence plus notable de l'E1 par rapport aux autres oestrogènes dans les milieux aquatiques [132-136]. Pour les progestatifs, il ne semble pas y avoir d'information sur leur dégradation dans l'environnement.

Les hormones naturellement produites par le corps ainsi que celles utilisées dans différents traitements thérapeutiques (synthétiques ou naturelles) sont évacuées principalement sous forme conjuguée via l'urine et les fèces [111], que ce soit chez l'humain ou les animaux. Ces déjections sont dirigées vers les usines de traitement des eaux usées, qui sont incapables d'éliminer complètement les hormones présentes [136, 137]. De plus, pour les petites municipalités qui ne détiennent aucune usine de traitement ou pendant les périodes de surverses causées par les jours de pluies intenses, les eaux chargées en hormones sont déversées directement dans les cours d'eau récepteurs. Il faut également considérer les

éventuelles fuites dans les réseaux d'égouts et des fosses septiques comme source de contamination dans l'environnement. Ainsi, une quantité variable d'hormones oestrogéniques et progestogéniques est rejetée dans l'écosystème aquatique à partir, notamment, des effluents municipaux. Ceci veut dire que l'humain ainsi que les animaux constituent les principales sources d'hormones dans l'environnement, dont leur devenir dépendra de leurs propriétés physico-chimiques et du chemin qu'elles vont parcourir dans les réseaux (**Figure 1-10**).



**Figure 1-10** Sources et devenir environnemental des hormones oestrogéniques et progestagéniques [138].

### 1.3.3.2 Occurrence

La majorité des travaux effectués sur les oestrogènes et les progestagènes ont été faits dans les matrices aqueuses de l'environnement. Les procédés de traitements dans les usines des eaux usées ne suffisent pas pour éliminer complètement les hormones des eaux d'affluents. En conséquence, ces hormones ont également été détectées et quantifiées dans les eaux d'effluents ainsi que dans les eaux de surface dans de nombreux pays à travers le monde. Les **Figures 1-11 et 1-12** montrent la compilation des concentrations retrouvées

d'oestrogènes et de progestagènes dans les eaux d'affluents, d'effluents et de surface, dans 47 articles entre les années 1998 et 2013 dans 16 pays dans le monde [98, 111, 135-137, 139-181]. Il faut noter que les concentrations recueillies pour cette revue de la littérature sont des concentrations moyennes pour lesquelles il existe une incertitude qui n'est pas reportée dans ce document. Ces incertitudes sont parfois importantes en raison de la nature des matrices, de leurs complexités, des méthodes d'analyses différentes, des sites de prélèvement, de l'heure de prélèvement, du pH de l'eau, des saisons et de la température, qui peuvent tous affecter la mesure de ces composés dans les échantillons d'eau. Toutefois, l'utilisation de la moyenne donne une idée d'ensemble des performances à l'intérieur d'un même pays, dont les usines ne disposent pas nécessairement toutes de la même technologie, et permet de faire des comparaisons intéressantes quant à l'interprétation des résultats. Les données sur les progestagènes (N=32) sont très limitées comparativement à celles des oestrogènes (N=114), en raison du fait que les progestagènes ont un pouvoir oestrogénique plus faible.

Les concentrations moyennes mesurées dans les eaux d'affluents sont supérieures à celles retrouvées dans les eaux d'effluents dans tous les cas où les deux concentrations sont disponibles, à l'exception de la France (E2 et LEVO), le Canada (PROG) et la Chine (LEVO) où les concentrations sont égales ou supérieures dans les effluents pour certaines hormones. Dans les situations où au moins deux types d'eaux sont disponibles, les concentrations dans les eaux de surface demeurent plus faibles que dans les eaux usées entrantes ou sortantes de l'usine, sauf pour la Chine (EE2). À partir des propriétés physico-chimiques, surtout pour les oestrogènes pour lesquelles nous avons beaucoup d'informations, il n'est pas surprenant que l'E1 et l'E3 soient systématiquement en plus grandes concentrations dans les eaux usées et de surface pour un même pays. Ce sont les deux hormones qui possèdent les plus faibles  $K_{ow}$  et les plus grandes valeurs de solubilité dans l'eau (**Tableau 1-4**) et donc se retrouveront préférentiellement dans la phase aqueuse plutôt que sur la phase particulaire. Cependant, les États-Unis et la Chine ne suivent pas cette logique, avec des valeurs plus élevées du EE2 que pour les autres hormones oestrogéniques. Ceci peut s'expliquer par le fait que le EE2 est une hormone synthétique utilisée dans les contraceptifs oraux (**Figure 1-9**) qui sont parmi les produits pharmaceutiques les plus vendus dans le monde. Selon les données d'il y a quelques années, il a été estimé que plus de 100 millions de femmes dans le monde [182], dont 10 millions aux États-Unis [183], utilisent des contraceptifs oraux.

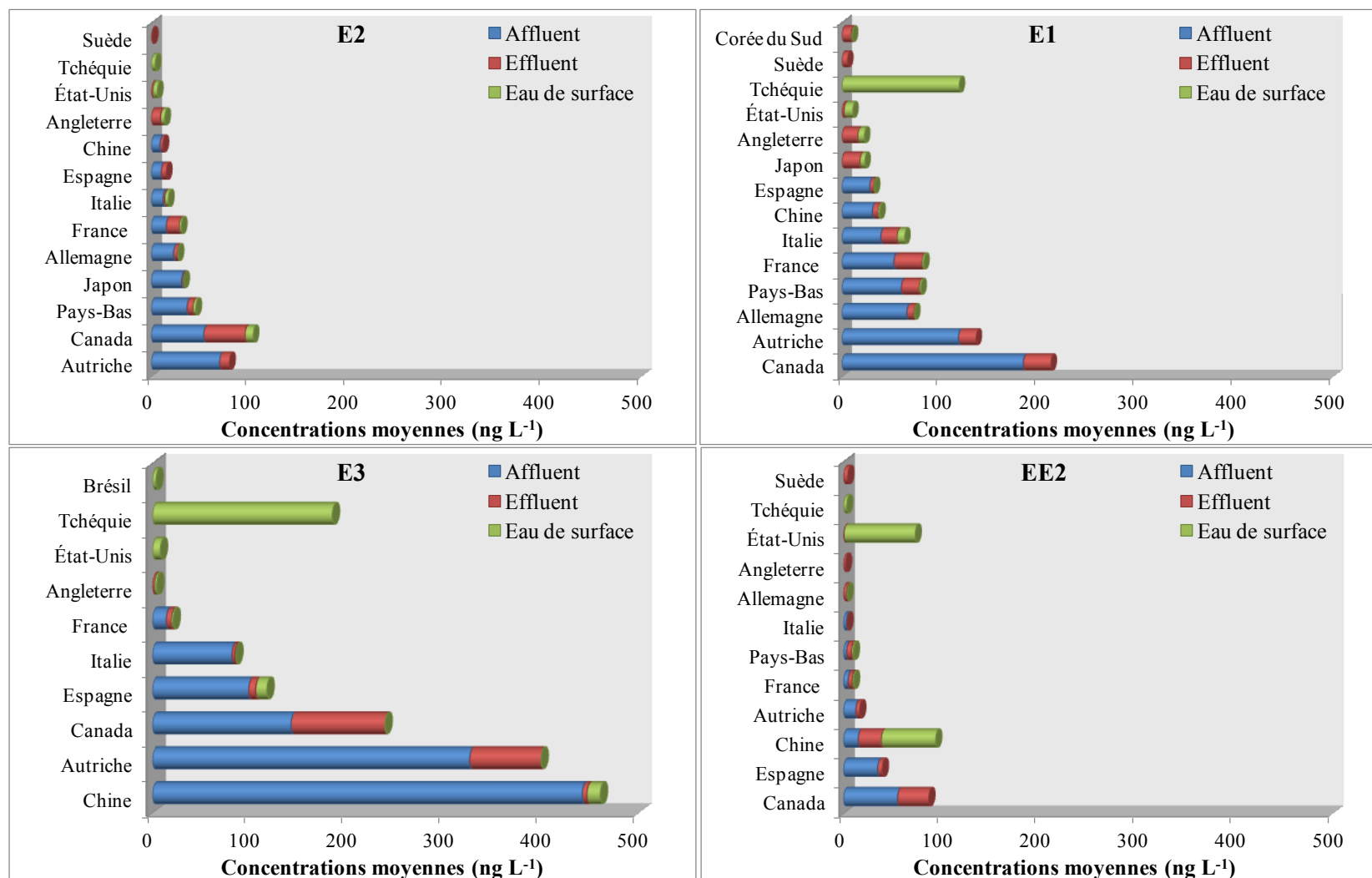
Pour évaluer les effets possibles des concentrations trouvées dans les eaux de surface, nous utiliserons les travaux de Kidd *et al.* [47] (**Figure 1-3**) au cours desquels les menés têtes-de-boule, exposés dans un lac à une dose de 5-6 ng L<sup>-1</sup> de EE2, ont démontré une production de vitellogénine et une féminisation importante de l'espèce, menant à une disparition quasi complète de la population. Lorsque les effluents sont rejetés dans les eaux réceptrices, les concentrations des hormones seront considérablement réduites par dilution, dégradation et adsorption des composés [107] comme il en a été question précédemment. Ce qui explique pourquoi leurs concentrations sont très faibles dans la majorité des pays mentionnés. Toutefois, parmi les résultats obtenus, il faut signaler les pays suivants dont les concentrations moyennes sont supérieures à 5 ng L<sup>-1</sup> dans les eaux de surface, soit :

1. Angleterre pour l'E1 ( $7 \pm 6$  ng L<sup>-1</sup>, N=6),
2. Brésil pour la PROG (9.4 ng L<sup>-1</sup>, N=1),
3. Canada pour le E2 ( $8.5 \pm 0.7$  ng L<sup>-1</sup>, N=2),
4. Chine pour l'E3 (13.9 ng L<sup>-1</sup>, N=4), le EE2 ( $56 \pm 44$  ng L<sup>-1</sup>, N=6) et la LEVO (7.5 ng L<sup>-1</sup>, N=1),
5. Espagne pour l'E3 (11.6 ng L<sup>-1</sup>, N=1),
6. États-Unis pour l'E1 ( $9 \pm 8$  ng L<sup>-1</sup>, N=6), le EE2 (73 ng L<sup>-1</sup>, N=1), la PROG ( $18 \pm 41$  ng L<sup>-1</sup>, N=7) et la NORE (48 ng L<sup>-1</sup>, N=1),
7. Japon pour l'E1 ( $5 \pm 2$  ng L<sup>-1</sup>, N=2),
8. Pays-Bas pour la LEVO (38 ng L<sup>-1</sup>, N=1)
9. République Tchèque (Tchéquie) pour l'E1 ( $120 \pm 125$  ng L<sup>-1</sup>, N=9) et l'E3 ( $185 \pm 248$  ng L<sup>-1</sup>, N=2).

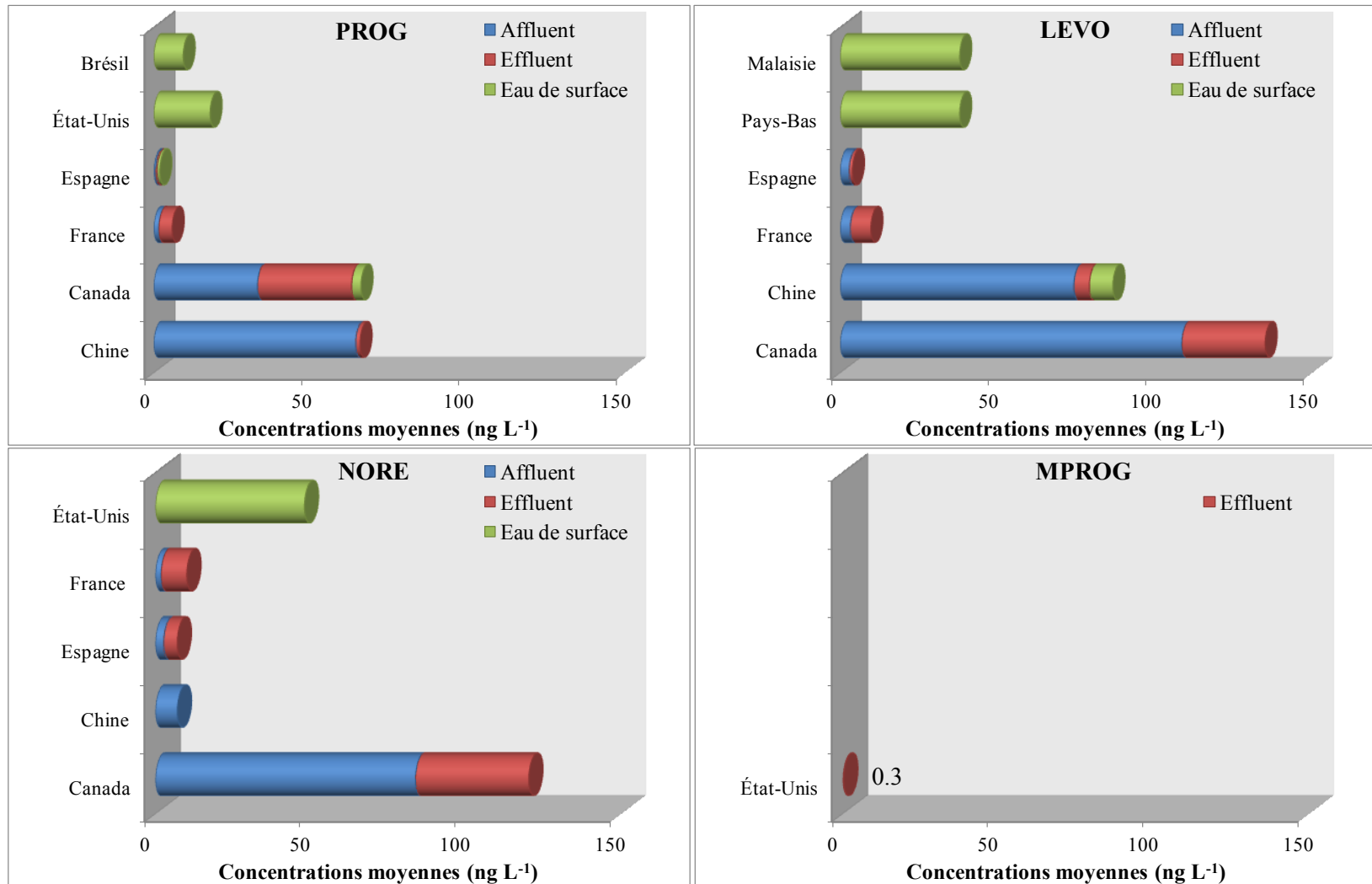
Les écarts-types ont été ajoutés à ces moyennes afin d'évaluer les variabilités inhérentes aux données rapportées. Il faut demeurer vigilant quant aux conclusions par rapport à ces données, surtout lorsqu'on considère les écarts-types associés aux moyennes qui sont parfois très importantes. Toutefois, ces variabilités découlent du fait que nous comparons des valeurs entre différentes études faites à l'intérieur d'un même pays pour différentes usines ayant plusieurs filières de traitement. Les concentrations sont tout de même élevées, surtout lorsqu'on considère que des effets sur les espèces en milieux aquatiques apparaissent à des concentrations de l'ordre du 0.1-1.0 ng L<sup>-1</sup>. Nous avons été conservateurs dans notre limite imposée de manière à considérer les variabilités; mais, de telles concentrations mesurées

peuvent remettre en question les traitements utilisés dans nos usines d'eaux usées. De plus, l'efficacité des usines de traitement des eaux usées est d'autant plus importante puisque dans plusieurs pays les eaux réceptrices de surfaces (rivières, fleuves ou lacs) seront les sources principales d'eau potable.





**Figure 1-11** Concentrations moyennes des oestrogènes dans les affluents (n=34), les effluents (n=44) et les eaux de surface (n=36) pour différents pays entre 1998 et 2013.



**Figure 1-12** Concentrations moyennes des progestagènes dans les affluents (n=12), les effluents (n=12) et les eaux de surface (n=8) pour différents pays entre 1998 et 2013.

## 1.4 Les traitements des hormones dans les stations d'épuration

La grande majorité des usines de traitement des eaux usées n'ont pas été conçues pour assurer l'élimination des hormones. Lors de leur conception, elles avaient comme objectif de débarrasser l'eau de certaines matières organiques (carbone), matières solides, nutriments (azote et phosphore) et organismes pathogènes, ou d'en réduire la quantité, avant d'être rejetées dans l'environnement [23]. Encore aujourd'hui, les usines de traitements des eaux usées sont incapables d'éliminer adéquatement les rejets d'hormones des eaux d'affluents, ce pourquoi ils sont encore détectables dans les eaux environnementales, tel qu'illustré dans les **Figures 1-11 et 1-12**. L'élimination des hormones dans les eaux d'affluents des usines d'épuration est fortement influencée par le type de procédé employé, son efficacité ainsi que la nature de l'eau [184]. À titre d'exemple, l'élimination des hormones naturelles E1 et E2 dans une usine d'épuration des eaux usées en Allemagne est supérieure à 98% [132], alors que pour une usine en Italie, selon des technologies semblables, l'élimination de E1 rapportée est plus faible, soit 61% [111, 139]. Les paramètres pouvant expliquer ses divergences sont multiples. L'élimination des hormones varie en fonction de leur adsorption sur les floes ou les boues et leur dégradation biologique ou chimique dans les différentes filières des usines d'épuration des eaux usées et ce suivant le temps de rétention des matières solides ainsi que le temps de rétention hydraulique.

Les travaux sur les méthodes d'enlèvement des hormones dans les stations d'épuration des eaux usées sont nombreux et se sont considérablement multipliés au cours de la dernière décennie. Compte tenu de l'intérêt grandissant sur les effets des hormones dans les milieux aquatiques, nous avons fait une revue de la littérature (72 articles de 1999 à 2013) sur les différents procédés et traitements employés pour les éliminer de l'eau (**Annexe 1, Tableau A1-1 à A1-5**). Cette revue s'est concentrée sur la nature du traitement, le type d'eau analysée pour évaluer son efficacité, les concentrations utilisées, les temps de contacts et le pourcentage d'élimination des hormones aux conditions optimales. Les procédés de traitement des eaux usées peuvent être *i*) physiques/biologiques (boue activée, adsorption, filtration membranaire) et *ii*) spécialisés ou avancés (oxydation).

### 1.4.1 Procédés physiques/biologiques

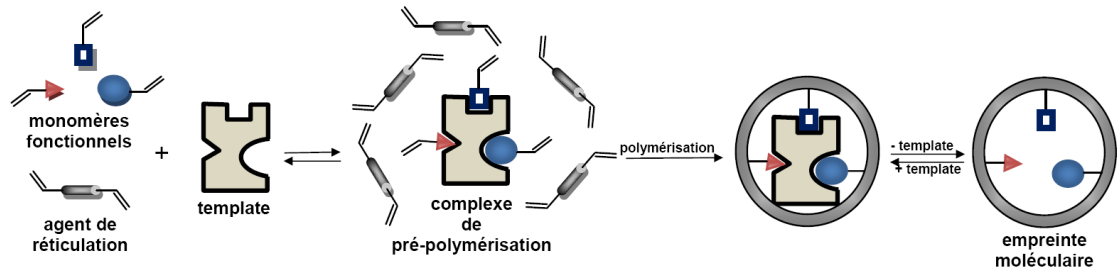
Le traitement par boues activées (*activated sludge system*, ASS) est le procédé utilisé habituellement par les usines d'épuration pour traiter les eaux usées [185]. Ce type de traitement peut éliminer les hormones grâce à leur adsorption sur les solides suivi par leur dégradation due à l'activité microbiennes dans les boues [185-187]. Il semble que l'adsorption soit la première étape qui mène à la dégradation biologique des hormones [123, 188], quoiqu'il existe certaines preuves quant au rôle plus important que joue la dégradation biologique par rapport à l'adsorption [186]. Donc l'ordre dans lequel aura lieu l'élimination par ASS demeure méconnu. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques (**Tableau 1-4**), de leur faible solubilité dans l'eau et de la constante d'Henry, l'enlèvement des hormones par ASS serait la méthode privilégiée, surtout pour des usines avec de longs temps de rétention des matières solides [185, 188]. La cinétique ainsi que l'équilibre des réactions de l'adsorption entre les hormones et la matière solide seront fortement influencées par les conditions dans l'usine. Ainsi, la taille des particules solides, la quantité de matière organique, le pH, la température, la rétention hydraulique, la salinité et la compétitivité par d'autres composés pour les sites d'adsorption sur les matières solides font en sorte que l'élimination des hormones par la ASS est incomplète. L'adsorption sur la matière solide par les hormones va dépendre de la température, plus elle sera faible moins l'adsorption sera importante. Ceci a été démontré pour les hormones oestrogéniques (E1, E2, E3 et EE2) [185]. L'adsorption et la désorption peuvent prendre place simultanément, mais l'adsorption demeure plus rapide que le phénomène de désorption. La désorption peut aussi avoir lieu dans les filières subséquentes des usines d'épuration des eaux usées selon les conditions de traitement [185]. Un désavantage de l'utilisation des ASS est la production des boues, les biosolides, qui augmentent les coûts d'opération pour leur entreposage ou engendrent une contamination des eaux souterraines ou des rivières par la désorption des hormones quand elles sont utilisées (épandage) dans les milieux agricoles [189]. Le **Tableau A1-1** présente l'efficacité de divers procédés de traitement des eaux usées incluant les ASS (en combinaison ou non avec d'autres procédés).

Les procédés physiques vont dépendre de l'adsorption des hormones de la phase aqueuse vers la phase solide (l'adsorbant). L'adsorption est considérée comme une méthode

populaire et efficace pour la purification de l'eau avec le charbon actif (AC, *activated carbon*) étant l'adsorbant le plus utilisé [190, 191]. Cet intérêt envers le AC provient de sa grande surface spécifique, de l'ordre de 1000 m<sup>2</sup>/g de charbon et de sa structure poreuse (macropores, mésopores et micropores) qui ont pour effet d'augmenter ses propriétés adsorbantes par rapport aux substances dissoutes dans l'eau, telles les hormones. Le AC peut prendre différentes formes, soit le AC en grain (ayant une taille de particules de 0.2 à 5 mm, GAC), le AC particulaire (avec une taille de particule de moins de 0.18 mm, PAC) et le AC extrudé (ayant une taille de 0.8 à 5 mm). L'adsorption sur le AC est provoquée par des liaisons de Van der Waals, soit les dipôles induits ou forces de dispersion de London. Ces interactions de faible intensité vont dépendre de la distance ou l'espace entre les composés en solutions et la surface du AC. En général, l'adsorbabilité d'un composé augmente sur le AC en fonction de son poids moléculaire, du nombre de groupements fonctionnels (double liaison ou halogène) et de la polarité des molécules [192]. Le **Tableau A1-2** illustre l'efficacité du AC pour éliminer les hormones dans différentes matrices d'eaux selon le temps de contact et la dose ajoutée. Les performances du AC envers les hormones sont acceptables avec des pourcentages d'élimination entre 80 et 100% (**Tableau A1-2**) dans la plupart des études. Toutefois, l'enlèvement sera influencée négativement par la présence de matières organiques et d'autres composés susceptibles d'être adsorbés, que ce soit par compétitivité ou saturation des sites d'adsorption, surtout dans les eaux usées [156, 193]. Les inconvénients du AC sont *i*) la production de boue élevée et des eaux de rétrolavage de couleur noire, *ii*) la difficulté à adapter la dose ajoutée en fonction de la quantité d'hormones dans l'eau et autres composés présents (matière organique et autres polluants), *iii*) les coûts d'opérations élevés associés à l'utilisation de produits chimiques pour les rétrolavages, l'impact environnemental d'un tel processus, ainsi que le stockage ou l'élimination des boues produites et *iv*) de déterminer l'endroit dans la filière de l'usine de traitement où il doit être appliqué.

D'autres types de phases adsorbantes ont été évalués pour l'élimination des hormones, comme la chitine, le chitosane et des résines échangeuse d'ions [194]. Cependant leur succès est beaucoup plus limité comparativement au AC avec une capacité d'adsorption selon l'ordre suivant : GAC > résine échangeuse d'ion > chitin > chitosane. De la même manière, une nouvelle approche a été adoptée pour éliminer les hormones dans l'eau, soit le polymère moléculaire imprimé (MIP). Les MIPs sont fabriqués par l'intermédiaire d'empreintes

moléculaires, c'est-à-dire des polymères préparés à partir de monomères fonctionnels polymérisés autour d'une molécule, également appelée *template*. Dans le cas des hormones, c'est plus souvent le E2, qui sert de gabarit pour la formation de sites de reconnaissance. L'extraction de la molécule template laisse inoccupé des sites de reconnaissance à haute affinité (taille et disposition spatiale des groupements fonctionnels) pour la molécule cible (**Figure 1-13**) ou celles de la même famille, soit les hormones estrogéniques dans le cas du E2.



**Figure 1-13** Schématisation du principe de préparation des MIPs [195].

La première application des MIPs pour l'élimination des hormones a été réalisée les E2, l'E3 et l'E1 dans l'eau déionisée [196]. La sélectivité et la spécificité des MIPs envers les oestrogènes a également été démontrée avec l'ajout du chlorhydrate de fluoxétine (antidépresseur) et de l'acenaphthène (HAP), deux composés pouvant causer une interférence, mais n'ayant pas d'impact significatif sur le pourcentage d'enlèvement (95%) du E2 en solution [197]. Inversement, pour les adsorbants C18, NIP (polymère non imprimé) et le GAC, l'ajout du fluoxétine et de l'acenaphthène a considérablement diminué le pourcentage d'élimination du E2 dans l'eau [156, 193]. Malheureusement, les coûts de fabrication des MIPs ainsi que le nombre limité de composés cibles pouvant être captés par les sites de reconnaissance font que cette technologie est difficile à intégrer dans les usines de traitement. Cependant, si la législation par l'Union Européenne sur les hormones, prévue pour décembre 2013 [86], entre en vigueur, la sélectivité exceptionnelle de cette approche ciblée pourrait en faire un atout important pour les usines d'épuration des eaux usées.

Les technologies membranaires (l'osmose directe (FO), la microfiltration (MF), la nanofiltration (NF), l'osmose inverse (RO) et l'ultrafiltration (UF)) font également partie des procédés physiques à considérer (**Tableau 1-5**). Les techniques séparatives à membranes utilisent les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse par lequel passe

un liquide contenant les composés à séparer [192]. Elles peuvent éliminer avec succès les hormones des matrices d'eaux [180, 198, 199] de plusieurs façons, soit par adsorption ou par exclusion de taille. En terme de demande énergétique, elle varie selon l'ordre suivant : RO > NF > UF > MF [198, 200]. Les performances des membranes vont changer en fonction de leurs propriétés physiques (perméabilité, taille des pores et hydrophobicité), du colmatage, du pH, de la température, de la salinité (effet électrostatiques) et de la nature de l'eau (matières organiques) [192, 198, 200-202]. Le **Tableau A1-3** présente l'efficacité de divers procédés membranaires étudiés pour l'enlèvement des hormones dans les matrices d'eaux.

**Tableau 1-5** Description des propriétés pour les procédés membranaires

Propriétés	Osmose inverse (RO)	Nanofiltration (NF)	Ultrafiltration (UF)	Microfiltration (MF)
Taille des pores (nm)	non-déTECTABLE	0.1-5	1-20	> 20
Matériau	- Acétate de cellulose - Polyamide Nylon	- Polyfluorure de vinylidène	- Polysulfone - Acétate de cellulose	- Polypropylène - Polyéthylène - Polycarbonate - Céramique
Pression (atm)	10-100	5-50	2-10	1-5
Vitesse de perméation (L m <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )	10-15	15-35	20-100	40-150
Mécanisme d'élimination	Diffusion	Tamisage	Tamisage	Tamisage

## 1.4.2 Oxydation

Depuis quelques années, plusieurs nouveaux procédés et l'application d'anciennes technologies ont été évalués pour éliminer les hormones et autres EDCs dans l'eau usée. Ces techniques, dont certaines émergentes, reposent principalement sur les procédés d'oxydation (*oxidation processes*, OP). Parmi les divers agents oxydants, on retrouve l'ozone (O<sub>3</sub>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le permanganate de potassium (Mn(VII)), le chlore (Cl<sub>2</sub> ou HOCl), le ferrate (Fe(VI)) et le dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>) [203]. Théoriquement, l'oxydation

des composés organiques, tels les hormones, devrait les transformer jusqu'à leur minéralisation (en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O). Toutefois, l'oxydation est rarement complète et les sous-produits formés peuvent être multiples selon diverses réactions avec l'agent oxydant. Donc, le choix de l'oxydant est important pour permettre une élimination adéquate des composés cibles en considérant la nature des sous-produits de dégradation qui seront formés et qui peuvent être problématiques. Le **Tableau 1-6** montre la liste des potentiels rédox (E<sup>0</sup>) des différents agents oxydants, avec l'ordre décroissant des potentiels d'oxydation suivant : Fe(VI) > O<sub>3</sub> > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > Mn(VII) > Cl<sub>2</sub> > ClO<sub>2</sub>. Les **Tableaux A1-4 et A1-5** montrent l'efficacité de l'oxydation pour l'élimination des hormones oestrogéniques et progestagéniques, respectivement.

**Tableau 1-6** Potentiels rédox (E<sup>0</sup>) d'agents oxydants utilisés pour traiter les eaux usées

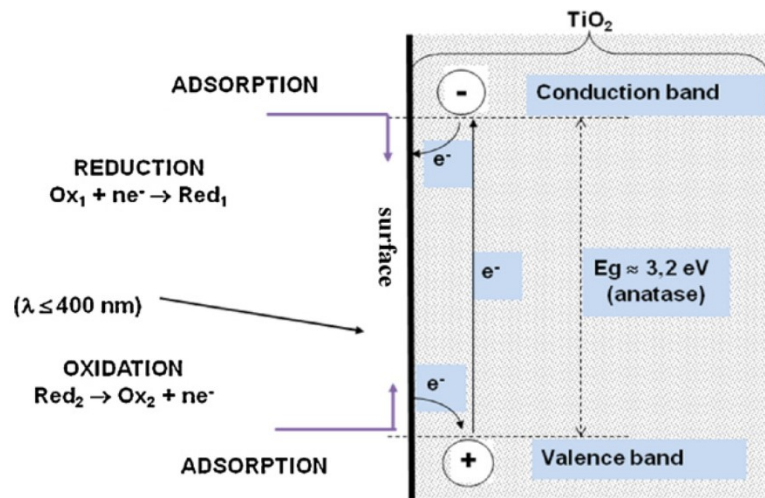
Oxydant	Réaction	E <sup>0</sup> (V)
Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub> (g) + 2é ↔ 2Cl <sup>-</sup>	1.358
	ClO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O + 2é ↔ Cl <sup>-</sup> + 2OH <sup>-</sup>	0.841
ClO <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub> (aq) + é ↔ ClO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.954
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2é ↔ 2H <sub>2</sub> O	1.776
Mn(VII)	MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + 4H <sup>+</sup> + 3é ↔ MnO <sub>2</sub> (s) + 2H <sub>2</sub> O	1.679
	MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + 8H <sup>+</sup> + 5é ↔ Mn <sup>2+</sup> + 4H <sub>2</sub> O	1.507
O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2é ↔ O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	2.076
Fe(VI)	FeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 8H <sup>+</sup> + 3é ↔ Fe <sup>3+</sup> + 4H <sub>2</sub> O	2.20

L'ozone est un puissant agent oxydant qui permet une réduction importante des hormones, entre 90 et 100%, dans les matrices d'eau (**Tableaux A1-4 et A1-5**). Une fois en solution l'ozone peut attaquer (mécanisme électrophilique) de manière sélective certains groupements fonctionnels dans les composés organiques, ou générer des radicaux hydroxyles (surtout à des pH plus élevés) avec un pouvoir d'oxydation supérieur à celui de l'ozone et permettre de dégrader les composés organiques [204-206]. Cependant, l'ajout du peroxyde d'hydrogène n'a pas toujours amélioré les performances de l'ozone pour réduire les hormones oestrogéniques [207]. La réactivité de l'ozone sera aussi affectée par la nature des composés avec les formes ionisées des oestrogènes étant plus susceptibles à l'attaque par l'ozone que les formes neutres [208]. L'effet de l'ozone devient plus lent dans certaines conditions. Entre autres lorsque les concentrations d'hormones sont faibles (< 100 ng L<sup>-1</sup>)



dans les matrices complexes ou lorsque la matière organique peut réagir préférentiellement avec l'ozone et quand le pH est inférieur à cinq (radicaux hydroxyles non formés) [203, 209, 210]. Donc, malgré les performances de l'ozone pour éliminer les hormones, de très faibles concentrations peuvent demeurer dans l'eau traitée en plus des sous-produits de dégradation qui pourraient avoir un effet plus nocif que la molécule ciblée intacte.

La photocatalyse (impliquant les oxydes semi-conducteurs, comme le  $\text{TiO}_2$ ) figure parmi les traitements les plus récents appliqués pour l'élimination des hormones et autres contaminants dans l'eau et ce type de procédé fait l'objet de nombreuses publications depuis quelques années [211, 212]. La nature de la catalyse va dépendre de l'état du catalyseur par rapport aux réactifs. Pour la catalyse homogène, les réactifs et les catalyseurs sont dans le même état physique tandis que pour la catalyse hétérogène, le catalyseur se trouve dans un état différent des réactifs. Dans le cas du traitement de l'eau, les composés sont dissous dans la matrice aqueuse liquide (réactifs) alors que le photocatalyseur est un solide (catalyseur), d'où le terme photocatalyse hétérogène [213]. Les réactions impliquées dans la photocatalyse hétérogène peuvent être décrites selon 5 étapes successives, soit *i*) le transfert des réactifs de la phase liquide vers le photocatalyseur, *ii*) l'adsorption des composés (réactifs) sur la surface du photocatalyseur, *iii*) les réactions de surface (activation photoinduite), *iv*) la désorption des réactifs et *v*) le transfert des produits du photocatalyseur vers la phase liquide [213]. C'est l'étape de l'activation photoinduite qui conduit à la formation au sein du semi-conducteur de paires électrons-trous (un électron  $e^-$  de la bande de valence est promu dans la bande de conduction créant un trou  $h^+$  dans la bande de valence), qui vont laisser place aux réactions d'oxydo-réduction en surface du catalyseur [213-215], comme l'illustre la **Figure 1-14**. Les réactions d'oxydo-réduction ont lieu grâce à la production de divers radicaux, comme le radical hydroxyle, d'anion superoxyde et d'hydroperoxyde. À noter que les mécanismes réactionnels exacts impliqués ne sont pas encore tout à fait connus [211].



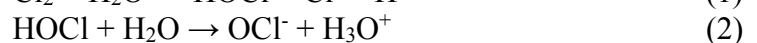
**Figure 1-14** Représentation du principe de la photocatalyse hétérogène dans le cas d'un semi-conducteur, le  $\text{TiO}_2$  [214, 215].

Les paramètres qui influencent les performances de la photocatalyse hétérogène (soit la production de radicaux) sont la masse du catalyseur, la longueur d'onde (<400 nm environ dans le cas du  $\text{TiO}_2$ ) et la température [213]. La photocatalyse hétérogène est une méthode peu dispendieuse et propre (utilisation possible des rayons solaires comme source de photons) [216], mais requiert plusieurs minutes, voire même des heures pour effectuer une élimination adéquate (> 90%) des hormones (**Tableau A1-4**). Toutefois, cette technologie peut être jumelée à un système membranaire pour enlever efficacement les hormones en moins d'une minute avec de plus faibles concentrations de  $\text{TiO}_2$  [217, 218].

La photolyse (irradiation ultraviolette, UV) devrait être une solution de traitement possible pour l'élimination des hormones oestrogénique (aucun effet sur les progestatifs) en raison de la fonctionnalité aromatique sur leur structure [219, 220]. La photolyse des oestrogènes peut se faire de deux manières, c'est-à-dire par une absorption directe de la lumière [220] ou encore indirectement par l'intermédiaire de radicaux réactifs produits suite à l'absorption de la lumière par des composés (carbone organique dissous) photosensibles présent dans les milieux aqueux [221]. Un des points faibles des données obtenues sur la photolyse est le fait qu'elles aient été générées dans des conditions contrôlées en laboratoire avec de l'eau ultrapure dans la majorité des expériences, ce qui ne représente pas la réalité quant aux conditions et matrices environnementales trouvées dans les usines de traitement. Dans les travaux qui ont été évalués, l'impact de la matière organique (eau synthétique), les

résultats montrent une réduction plus importante des hormones (de ~26 à ~50%) en présence de carbone dissous [222, 223]. Les rayons solaires naturels peuvent éliminer les oestrogènes dans l'eau de mer [224] et les rivières [223], avec des demi-vies de 1.5 jours pour l'E1, le E2 et le EE2, alors que d'autres ont trouvé des demi-vies plus rapides, soit entre 48 et 123 min pour l'E1 dans des conditions solaires simulées en laboratoire [225]. Toutefois, la variabilité associée aux conditions naturelles pour la photolyse des oestrogènes reste importante, notamment le pH, l'intensité du rayonnement solaire, les saisons et la quantité de matière organique. Dans une autre étude [226], une dégradation supérieure à 95 % pour le E2 et le EE2 a été obtenue lorsque le rayonnement UV avait une intensité supérieure à 4000 mJ cm<sup>-2</sup>, ce qui ne représente pas une solution économiquement viable. Étant donné les performances variables, des taux moyens d'enlèvement plutôt faibles (**Tableaux A1-4 et A1-5**) et l'absence d'effet sur les progestatifs, la photolyse semble être une solution peu prometteuse pour l'élimination des hormones dans les usines de traitement, à moins d'être combinée à un autre procédé.

Le chlore est le désinfectant le plus répandu dans le traitement des eaux depuis plus d'un siècle (depuis 1830, aux États-Unis pour les odeurs et le goût de l'eau potable) [192]. Le chlore est l'agent le moins dispendieux parmi tous les agents oxydants utilisés pour l'élimination des composés organiques ainsi que pour la désinfection [227]. Il peut être appliqué à l'état liquide, hypochlorite de sodium (NaOCl) ou à l'état gazeux (Cl<sub>2</sub>) [228]. Une fois en solution, le chlore est très sensible aux variations de pH. Aux pH plus acides, l'acide hypochloreux (HOCl) sera la forme majoritaire avec un pK<sub>a</sub> = 7.54, alors qu'aux pH plus élevés le HOCl va se dissocier en sa base conjuguée, l'anion hypochlorite (ClO<sup>-</sup>), selon les équations (1) et (2) :



L'acide hypochloreux est l'espèce la plus réactive qui agit comme agent de désinfection et d'oxydation dans les usines de traitement des eaux. Donc, le pouvoir d'oxydation du chlore va dépendre du pH. D'autres espèces chlorées intermédiaires peuvent être présentes en solution, comme l'ion trichloride (Cl<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les oxydes de chlore, mais selon les conditions typiques en traitement des eaux, elles sont présentes en quantités négligeables [229-231]. En ce qui concerne les hormones, le chlore va cibler le cycle aromatique selon une attaque

électrophile dans les positions *ortho* ou *para* (positions C2 ou C4, **Figure 1-5**) [231]. Le chlore n'a aucun effet sur les hormones progestagéniques puisqu'elles n'ont pas d'aromaticité dans leur structure [166, 232] en plus de la faible réactivité du chlore envers les doubles liaisons (comme pour l'acide ascorbique) et les fonctions cétones [231]. Les pourcentages d'élimination des hormones oestrogénique (**Tableaux A1-4 et A1-5**) peuvent atteindre 95 à 100% aux conditions optimales de pH. Toutefois, un des inconvénients du chlore est qu'il peut également réagir avec la matière organique (acides humiques et fulviques), présente dans les eaux naturelles. Ce faisant, il y a formation de sous-produits de désinfection chlorés, dont les trihalométhanes, les chloramines et les acides haloacétiques [233]. De nombreux paramètres influencent leur formation, tels que la quantité de matière organique dans l'eau, la qualité de l'eau (ions halogénés) et les conditions de travail (temps de contact, dose de chlore, température, pH) [234, 235]. Selon une revue récente [236], les sous-produits chlorés pourraient avoir plusieurs effets néfastes sur la santé. Ils seraient cancérigènes, auraient un effet génotoxique et mutagène ainsi qu'un pouvoir irritant (respiration et vision). Compte-tenu de la diversité et de la complexité des sous-produits formés par la chloration, il n'est pas possible de prévoir leurs concentrations et leur nature, quoique certaines études essaient de se pencher sur le sujet [234, 237, 238]. De plus, pour les eaux avec des bromures (Br<sup>-</sup>), la chloration les transforme en acides hypobromeux (HOBr) qui est beaucoup plus réactif que le chlore, surtout pour les composés phénoliques dont les oestrogènes [166, 239-242]. En raison de son faible coût, de sa stabilité en solution et de sa capacité à éliminer des micropolluants inorganiques, le chlore demeure une alternative intéressante pour les usines de traitement des eaux naturelles utilisées comme source d'eau potable. Il faut cependant évaluer à quel endroit de la filière de traitement le chlore doit être appliqué pour éviter la formation de sous-produits indésirables. Le **Chapitre 5** approfondit ce sujet et porte sur l'évaluation des constantes cinétiques d'oxydation du chlore sur les oestrogènes et comment l'effet des ions bromures en solution peut causer une surestimation de son pouvoir oxydatif. Le rôle de la nature de l'eau et du pH sera également évalué pour l'élimination des estrogènes par le chlore.

Le permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) est le second plus ancien agent, après le chlore, utilisé dans le traitement des eaux, surtout pour le contrôle des odeurs [192]. Le permanganate a un pouvoir oxydant important pour les espèces organiques et inorganiques,

impliquant le Mn(VII) une fois le sel en solution ( $K^+$ ,  $MnO_4^-$ ). Le permanganate n'est pas un oxydant aussi puissant que l'ozone ce qui augmente les temps de contact nécessaires pour l'élimination des composés, comme c'est le cas pour les hormones, il est moins efficace pour la désinfection comparativement au chlore et laisse une coloration violacée à l'eau suite à son application. Il est plus dispendieux que le chlore, mais requiert peu d'équipement pour sa mise en application en plus d'être simple d'utilisation [228]. Aussi, contrairement au chlore et à l'ozone, l'efficacité du permanganate ne dépend pas du pH (selon les conditions normales des eaux naturelles), et il est moins sensible aux variations de température que le chlore et ne participe pas à la formation de sous-produits, mais permet plutôt de restreindre leurs formations en présence du chlore [243-245]. Le dioxyde de manganèse ( $MnO_2$ ) est le sous produit solide de réduction (**Tableau 1-6**) du Mn(VII) qui à son tour va contribuer à former des floccs (aide coagulant) pour éliminer la matière organique et certaines espèces inorganiques dans les eaux naturelles [246] et peut aussi adsorber ou oxyder d'autres contaminants [247, 248] avant de précipiter. Les hormones estrogéniques sont facilement (99%) éliminées des eaux usées par le Mn(VII) (**Tableau A1-4**). Il n'existe aucune étude portant sur l'oxydation des progestatifs par le permanganate (**Tableau A1-5**), alors qu'il peut attaquer (contrairement au chlore) les doubles liaisons (entre C4 et C5, **Figure 1-5**), les groupements cétones et alcools (positions C17, **Figure 1-5**) [249]. Le **Chapitre 5** en discute plus en détail et confirme cette hypothèse. Par le fait même, les constantes d'oxydation cinétiques ont été calculées pour les comparer à l'ozone. L'impact de la matière organique, du pH et de la température a aussi été évalué.

Il existe d'autres procédés de traitement basés sur l'usage d'agent oxydant, tel que le ferrate ( $Fe(VI)$ ) et le dioxyde de chlore. L'oxydation par le ferrate représente une approche intéressante pour l'élimination des hormones, avec des pourcentages d'élimination supérieurs à 90% dans la majorité des cas (**Tableaux A1-4 et A1-5**). De plus, lorsqu'ils sont évalués dans le traitement des eaux usées, les sous-produits de dégradation du ferrate sont non toxiques [250], ce qui n'est pas le cas de l'ozone et du chlore, par exemple. Cependant, les temps de contact varient beaucoup pour le ferrate, sa stabilité en solution est de courte durée et son efficacité dépend fortement du pH, dont les valeurs élevées (autour de 9) ne sont pas présentes en milieu naturel ou atteignables en usine [251]. Le dioxyde de chlore n'a pas beaucoup été utilisé, une seule étude sur les oestrogènes est répertoriée, mais il permet

un enlèvement supérieur à 95% pour l'E1, le E2 et le EE2 (**Tableau A1-4**). Enfin, il existe d'autres procédés moins efficaces pour les usines de traitement, pour éliminer les hormones, comme les procédés Fenton, électrochimiques et les ultrasons [203].

Le **Tableau 1-7** offre une synthèse de tous les procédés d'élimination des hormones oestrogénique et progestagéniques susceptibles d'être utiles pour les usines de traitement des eaux usées. Il permet de faire une comparaison rapide d'un procédé par rapport à un autre pour une hormone cible en indiquant le pourcentage d'enlèvement moyen en fonction du traitement. Dans l'ensemble, les différents procédés ont entraîné une élimination intéressante des hormones (entre 81 et 100%, **Tableau 1-7**) excepté pour l'ultrafiltration et la photolyse. On notera toutefois une absence de procédés (en terme de nombre d'articles et des types de traitements) appliqués aux hormones progestagéniques malgré leurs concentrations retrouvées dans les eaux usées et de surface à travers le monde (**Figure 1-12**) ainsi que le nombre de prescriptions (**Figure 1-9**) et des concentrations des progestatifs (**Figure 1-9**) retrouvées dans les eaux de surfaces de Montréal (Québec, Canada) et de Laval (Québec, Canada). Les **Chapitres 5 et 6** sont d'ailleurs consacrés aux méthodes d'enlèvement des hormones oestrogéniques et progestagéniques par l'intermédiaire du chlore et du permanganate. De plus, il sera question des constantes d'oxydations associées au traitement des hormones dont il sera question dans la section qui suit.

**Tableau 1-7** Compilation de l'efficacité moyenne (%) des différents traitements pour l'élimination des hormones dans les matrices d'eau.

	E1	E2	E3	EE2	LEVO	NORE	MPROG	PROG
ASS	(+)++++	+++++	+++++	(++)++				+++++
ClO <sub>2</sub>	+++++	+++++		+++++				
Fe(VI)	+++++	+++++		+++++	+++++	+++++	+++++	++++
HOCl	+++++	+++++	+++++	+++++				
Mn(VII)	+++++	+++++	+++++					
NF		(++)++++		(+++)+	+++++	+++++		+++++
O <sub>3</sub>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	(+++)+	+++++
PAC	(++)++++	+++++	(+++)+	+++++				+++++
RO		+++++	+++++	+++++				
TiO <sub>2</sub>	+++++	(+++)+		+++++				
UF		+	+++	++				+++
UV	+	+		+				

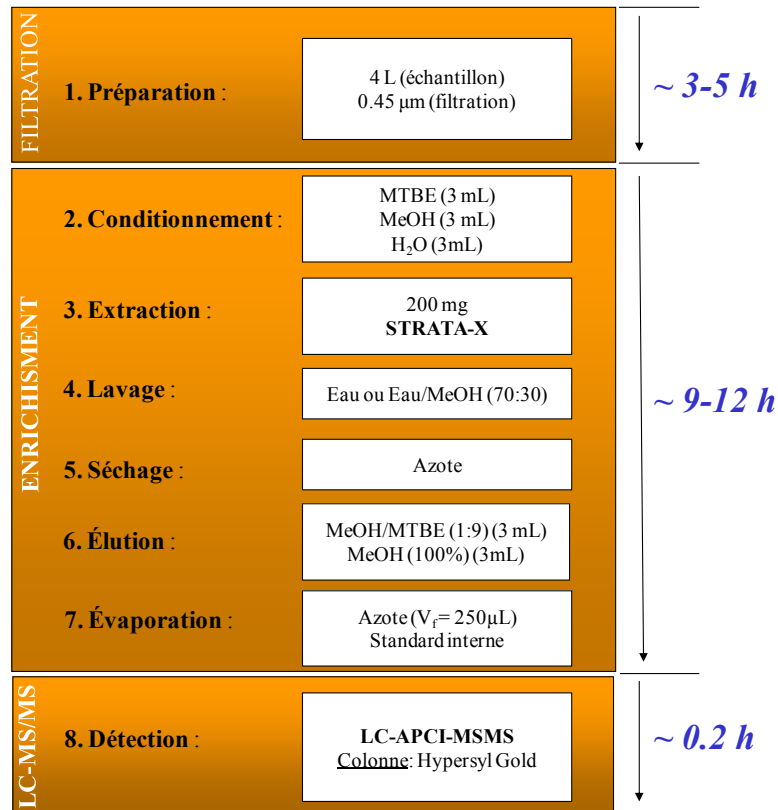
Efficacité moyenne de l'enlèvement: +++++: 81-100% ; ++++: 61-80% ; +++: 41-60% ; ++: 21-40% ; +: 0-20% avec les parenthèses, ( ), qui indiquent les valeurs plus faibles (atypiques) comparativement à la moyenne.

## **1.5 Méthode de préparation de l'échantillon pour l'analyse des hormones dans l'eau**

Les méthodes analytiques développées pour l'analyse des hormones dans différentes matrices d'eau sont nombreuses. De manière à mieux comprendre l'intérêt et la diversité des articles qui se sont penchés sur le sujet, nous avons effectué une revue de littérature. Cette revue a été faite pour 82 articles scientifiques entre 1999 et 2013, portant sur quatre oestrogènes (E1, E2, E3, EE2) et quatre progestatifs (LEVO, MPROG, NORE, PROG), pertinents à nos travaux. La compilation des détails impliqués dans le développement analytique pour les hormones (chromatographie, sources d'ionisation, matrice d'eau, conservation d'échantillon, type d'extraction, type de filtre, colonne analytique, type de cartouche d'extraction, conditionnement, volume d'extraction, phase mobile, dérivation, temps d'analyse, limite de détection, limite de quantification et recouvrement) est résumée en **Annexe 2 (Tableau A2-1 et A2-2)**. Les données recueillies seront présentées séparément dans les sections à venir pour faciliter leur interprétation et montrer comment nos travaux présentés dans les **Chapitre 2 et 3** ont servi à introduire de nouvelles approches méthodologiques pour l'analyse des hormones dans l'eau.

### **1.5.1 L'extraction sur phase solide automatisée en ligne (on-line SPE)**

La SPE manuelle demeure une technique populaire et donne de bons résultats, avec des facteurs de concentration très élevés, ce qui permet l'analyse d'espèces à des concentrations au niveau de traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dans les matrices d'eau très chargées et qui ne seraient pas analysables autrement avec les appareils analytiques disponibles sur le marché présentement. La SPE manuelle est donc une technique de pré-concentration efficace et nécessaire, mais demeure très laborieuse (12-18 heures par série d'échantillons) en raison de toutes les étapes et manipulations manuelles qu'elle nécessite pour arriver à une réponse analytique (**Figure 1-15**). De plus, le faible nombre d'échantillons traitables dans notre laboratoire (~10 par jour) rend cette technique peu pratique pour nos besoins.

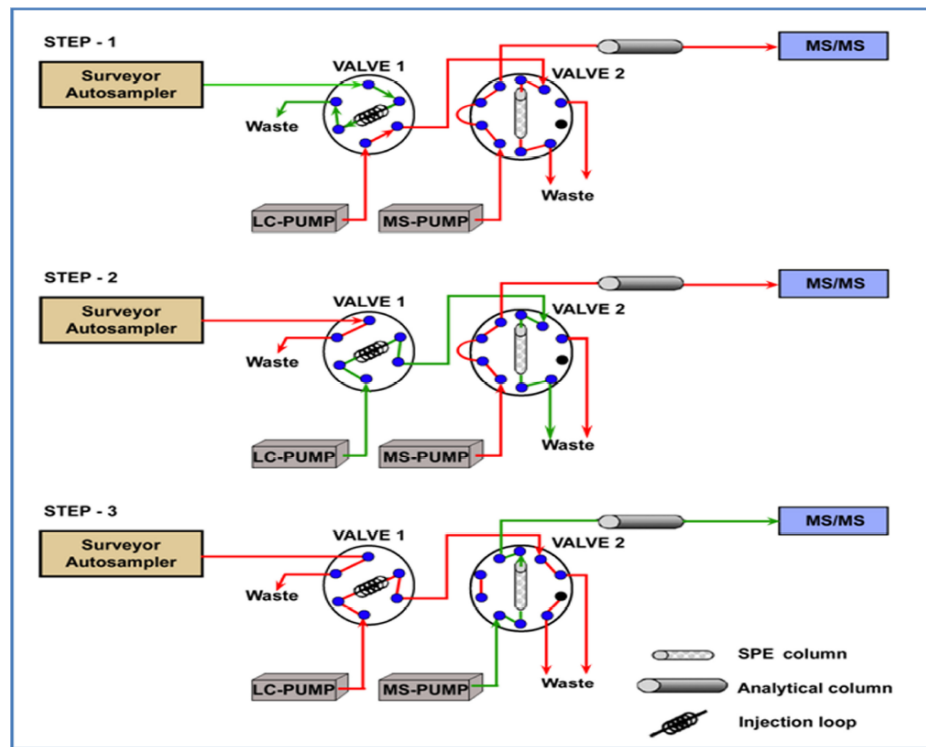


**Figure 1-15** Énumération des étapes impliquées pour le pré-traitement d'échantillons par SPE avec les temps associées. Exemple choisi lors de l'optimisation de la méthode SPE avec la cartouche STRATA<sup>TM</sup>-X pour l'analyse des hormones dans l'eau usée.

Pour ces raisons, nous avons développé une méthode de pré-concentration par SPE automatisée en-ligne pour éliminer la nécessité de devoir manipuler de grands volumes d'échantillon en SPE manuelle et diminuer le temps total de traitement et d'analyse par échantillon. Toutes les étapes mentionnées pour la SPE à la section précédente demeurent les mêmes, avec la différence d'être automatisées et directement couplées à la technique d'analyse (LC-MS/MS dans notre cas). Ceci est possible par l'utilisation d'un système de permutation de valves (une valve de six voies et l'autre de 10) monté sur un auto-échantillonneur d'injection à volume variable (0.5 à 20 mL), selon les facteurs de pré-concentration nécessaire (**Figure 1-16**). La différence pour la SPE en ligne réside dans l'utilisation d'une petite colonne chromatographique (plutôt qu'une cartouche à usage unique en mode manuel), qui est réutilisable plusieurs fois, variant selon le type, le nombre et la nature des matrices analysées. Jusqu'à présent, nous avons recensé neuf articles qui ont



utilisé la SPE automatisée en ligne pour l'analyse des hormones dans les matrices d'eaux (**Tableau A2-1**), dont seulement trois portant sur les oestrogènes et les progestagènes [98, 252, 253]. Toutefois, les façons dont l'optimisation de la SPE automatisée en ligne n'ont pas toujours été correctement effectuées selon certains critères que nous considérons importants. Le **Chapitre 3** discute en détails de l'optimisation de la SPE automatisée en ligne et nous y décrivons les critères à considérer qui semblent parfois être escamotés.



**Figure 1-16** Différentes étapes de la SPE automatisée en ligne; étape 1 : conditionnement de la colonne SPE; étape 2 : enrichissement et lavage de la colonne SPE et étape 3 : élution des analytes retenus vers la colonne chromatographique pour l'analyse pas MS/MS [98].

Il y a plusieurs avantages à faire la SPE automatisée en-ligne: *i*) réduction du temps de manipulation des échantillons (quelques minutes au lieu de plusieurs heures), *ii*) réduction du volume d'échantillon nécessaire pour l'analyse (1 à 10 mL au lieu de 250 à 3000 mL), *iii*) meilleure précision et reproductibilité grâce à l'automatisation et *iv*) augmentation du nombre d'échantillons analysables par jour (une centaine versus une douzaine pour la SPE manuelle). Les désavantages de la SPE en-ligne sont la limitation des solvants utilisables (compatibilité avec la LC et les sources d'ionisation), les limites de détection plus élevées que la SPE manuelle ou automatique, volume de fuite plus faible (masse de sorbant très

faible) que pour la SPE avec cartouche et solvant de chargement très limité (phase inverse). La SPE manuelle nécessite un volume initial entre 100 et 3000 mL (Error! Reference source not found.) alors que celle en-ligne ne requiert que 1 mL pour atteindre des limites de détection similaires (mais sont rarement meilleures que celles obtenues par SPE manuelle). La **Figure 1-17** permet de comprendre comment les limites de détections avec de faibles volumes d'échantillon, 1 mL, peuvent être comparées à celles d'une SPE manuelle un volume de 250 mL.

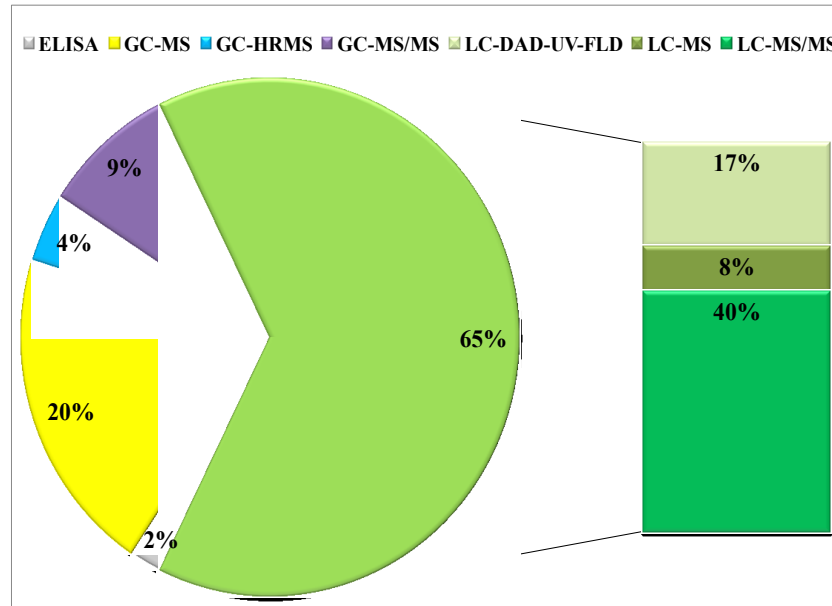
Si $[EE2]_{\text{initiale}} = 1 \mu\text{g L}^{-1}$	SPE manuelle	SPE en-ligne
<b>Volume initial</b>	<b>250 mL</b> masse EE2= 250 ng	<b>1 mL</b> masse EE2= 1 ng
Volume final	0.250 mL masse EE2= 250 ng	1 mL masse EE2= 1 ng
<b>Volume d'injection</b>	<b>0.010 mL</b> masse EE2= 10 ng	<b>1 mL</b> masse EE2= 1 ng
	<b>seule 4% de la masse initiale est injectée</b>	<b>100% de la masse initiale est injectée</b>

**Figure 1-17** Illustration des limites de détections obtenues par la SPE automatisée en ligne qui sont comparables à celle par la SPE manuelle avec un exemple théorique pour la EE2 avec une concentration de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  selon un volume initial d'échantillon de 1 mL et 250 mL, respectivement.

### 1.5.2 Méthodes instrumentales d'analyse des hormones

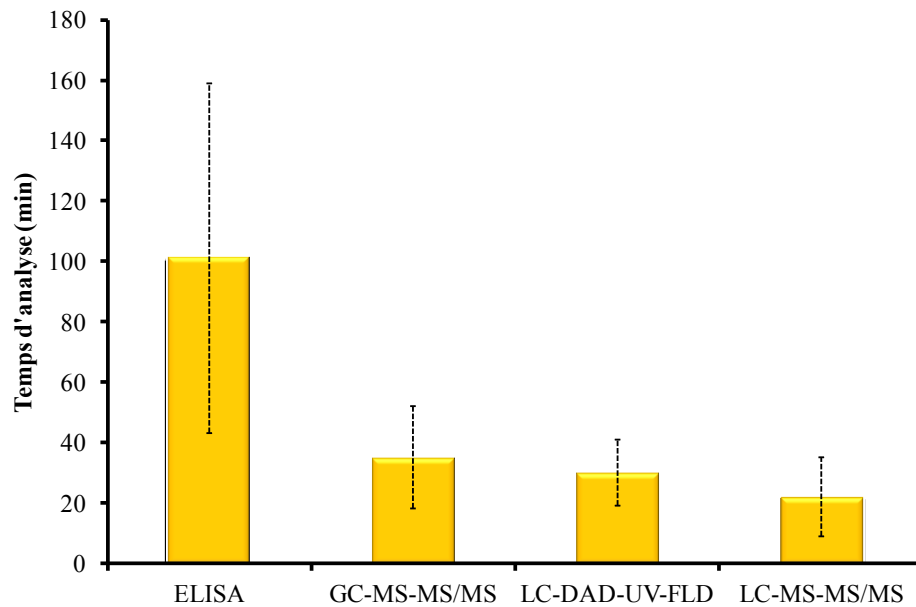
L'objectif de cette section est de faire une revue de la littérature des méthodes de séparation et de détection qui ont servi à l'analyse des hormones dans les matrices d'eau et d'expliquer leur principe. En générale, les méthodes analytiques sont développées en considérant la vitesse, les limites de détection, la sensibilité, la reproductibilité et le coût de l'analyse. Plusieurs facteurs dans l'analyse des hormones dans les milieux aqueux font en sorte que l'atteinte de ces critères n'est pas toujours facile, compte tenu de leurs très faibles concentrations (niveau de traces) associées à la complexité des matrices (affluent, effluent,

boues) dans lesquelles les hormones sont détectées. La **Figure 1-18** montre quelles techniques et le pourcentage qu'elles occupent pour l'analyse des hormones dans les matrices aqueuses environnementales dans une revue de la littérature de 1999 à 2013, selon la compilation de 83 articles (**Tableau A2-2**). La majorité des méthodes utilisent la GC et la LC couplée à la MS seule et la MS/MS. Les méthodes par GC représentent 33% du total comparativement à 65% pour la LC.



**Figure 1-18** Départage et identification des méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des hormones dans les eaux environnementales selon une revue de la littérature faite entre 1999 et 2013 (n = 83) (**Annexe 2**).

En termes de temps d'analyse, aucune des méthodes chromatographique n'est plus rapide qu'une autre si on considère l'écart-type associée au moyenne (**Figure 1-19**). Nous allons nous concentrer sur les méthodes LC en particulier pour la discussion dans les sections qui suivent, puisque c'est cette méthode que nous avons privilégiée lors de nos travaux au **Chapitre 3**.



**Figure 1-19** Comparaison du temps d'analyse pour les différentes méthodes analytiques, ELISA (n = 2), GC-MS-MS/MS (n = 27), LC-DAD-UV-FLD (n = 16) et LC-MS-MS/MS (n = 43), pour l'analyse des hormones dans les matrices d'eaux avec leurs écarts-types (valeurs prises du **Tableau A2-2**).

### 1.5.2.1 La chromatographie liquide pour l'analyse des hormones

La LC est une technique séparative qui précède l'étape d'ionisation avant l'analyse par MS. Le rôle de la séparation chromatographique est non seulement d'isoler, dans la mesure du possible, nos analytes mais également les espèces qui pourraient causer une interférence à l'ionisation (à la source) ou massique (à l'analyseur). Les séparations sont possibles par l'intermédiaire d'une phase stationnaire (une colonne remplie contenant un liquide immobilisé par greffage sur gel de silice) et d'une phase mobile liquide dont les interactions avec la phase stationnaire sont minimales, soit la chromatographie de partage [254, 255]. En phase inverse, qui est la technique chromatographique la plus utilisée (plus de 80% du temps), la phase stationnaire est apolaire (chaîne alkyle, polystyrène-divinyl benzène) et la phase mobile est polaire (mélange de eau-MeOH ou eau-ACN). Les analytes (A) se distribuent selon le coefficient de partage :

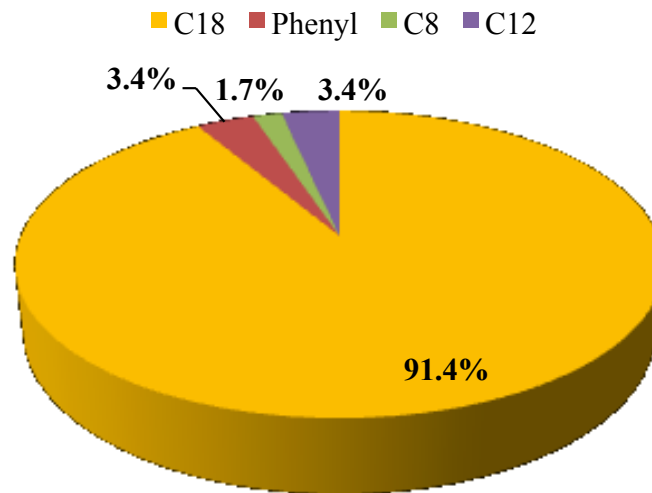
$$K = [A]_s / [A]_m \quad (37)$$

avec  $[A]_s$  la concentration de l'analyte dans la phase stationnaire et  $[A]_m$  la concentration de l'analyte dans la phases mobile [256]. Pour séparer deux analytes en solution, il faut qu'ils aient des coefficients de partage différents.

Au début du développement de méthode pour la séparation chromatographique par phase inverse, plusieurs points sont à considérer : le choix de la bonne colonne pour effectuer une séparation donnée en sachant qu'il existe plusieurs centaines de différentes colonnes disponible, comment atteindre les objectifs de séparation rapidement et à peu de coûts mais sans effet sur la robustesse de la méthode, quelle va être la répétabilité ainsi que la reproductibilité de la colonne analytique et la longévité de la colonne, c'est-à-dire le nombre d'injections effectuées avant de perdre son efficacité selon le protocole adopté [257].

Pour l'analyse des hormones dans l'eau, suite à la revue de la littérature nous avons tout d'abord regardé quelles colonnes avaient été utilisées pour leur séparation (**Annexe 1**). La **Figure 1-20** montre que dans plus de 91% des études recensées ( $n = 58$ , entre 1999 et 2013) des colonnes C18 à phase inverse sont utilisés. Ce choix de colonne est certainement populaire en raison de l'hydrophobicité des hormones (**Tableau 1-4**) qui favorise les interactions avec les phases stationnaires C18, apolaires. À noter que ce choix est aussi en accord avec celui de la colonne SPE, également une méthode chromatographique, pour laquelle les phases stationnaires hydrophobes permettent une rétention adéquate des hormones (**section 1.5.1**). Avec les données dans la littérature et en raison de l'accessibilité des colonnes à phases inverses disponibles dans nos laboratoires, nous avons testé une phase stationnaire de nature phase inverse Hypersil GOLD<sup>TM</sup> avec une sélectivité similaire à une C18, mais avec deux diamètres de particule différents (1.9  $\mu\text{m}$  et 3.0  $\mu\text{m}$  avec un diamètre de colonne de 2.1 mm et une longueur de 100 mm). Les tests préliminaires ont été faits sans colonne d'extraction en ligne avec la colonne chromatographique standard. Le choix d'évaluer une colonne à porosité plus élevée repose sur les pressions importantes (perte de charge) associées aux particules de faibles diamètres, à l'utilisation de débits de la phase mobile plus grands donc une analyse plus rapide et pour éviter de boucher l'entrée de la colonne (le frité plus spécifiquement), ce qui augmente sa longévité, principalement à cause de la lourdeur des matrices d'eau usées (affluents ou effluents). À noter que nous avons également utilisé une colonne Hypercarb (charbon graphite poreux), mais les hormones avaient une trop grande rétention et dans certain cas, il était impossible de les faire sortir de

cette colonne, peu importe la phase mobile utilisée (de la même manière que pour la SPE avec l'Hypercarb, Error! Reference source not found.).



**Figure 1-20** Pourcentages des types de colonnes utilisées pour la séparation des hormones dans les matrices d'eau selon une revue de la littérature ( n= 58, entre 1999 et 2013, **Tableau A2-2**).

Lorsque nous calculons les paramètres chromatographiques (nombre de plateaux théorique,  $N_{th}$ , la largeur des pics (min),  $w$ , l'asymétrie de pics,  $TF$ , le facteur de capacité,  $k'$  et la résolution,  $R_s$ ) données au **Tableau 1-8**, il est possible de remarquer une amélioration du nombre de plateaux, alors que les pics sont effectivement plus fins ( $w$ ) et la résolution ( $R_s$ ) entre les pics des hormones (EE2, E1, E2 et NORE) est meilleure (mais pas satisfaisante,  $R_s \leq 1.25$ ). Les équations utilisées pour calculer les paramètres chromatographiques sont présentées en **Annexe 3**. Nous avons donc choisi d'utiliser la colonne de 1.9  $\mu\text{m}$ , surtout en raison de la finesse des pics puisqu'elles nous permettent d'avoir des limites de détection plus faibles (amélioration du rapport S/N), qu'elle va permettre de mieux séparer les interférences des matrices d'eaux d'affluent ou d'effluent des hormones et surtout pour permettre de compenser l'élargissement des pics de la colonne d'extraction en ligne avec la colonne chromatographique.

**Tableau 1-8** Paramètres chromatographiques calculés pour les deux colonnes Hypersil GOLD™ évaluées pour l'analyse des hormones, soit celle à 1.9 µm (2.1 × 100 mm) et à 3.0 µm (2.1 × 100 mm).

<i>Hypersil GOLD 3.0 µm (2.1 × 100 mm)</i>									<i>Hypersil GOLD 1.9 µm (2.1 × 100 mm)</i>								
	E3	EE2	E2	E1	NORE	LEVO	MEDRO	PROG		E3	EE2	E2	E1	NORE	LEVO	MEDRO	PROG
<b>w</b>	0.094	0.162	0.166	0.166	0.179	0.200	0.200	0.200	<b>w</b>	0.043	0.090	0.079	0.043	0.090	0.089	0.089	0.089
<b>tr</b>	1.150	2.020	2.050	2.120	2.130	2.780	3.140	3.680	<b>tr</b>	0.720	1.220	1.240	1.300	1.300	1.620	1.790	2.080
<b>TF</b>	1.330	1.380	1.210	1.330	1.250	1.100	1.100	1.440	<b>TF</b>	1.200	1.250	1.530	1.400	1.000	1.125	1.140	1.330
<b>N</b>	3179	2292	2408	2678	2187	3799	12150	4337	<b>N</b>	5801	3065	3061	15076	3867	5171	8057	11794
<b>k'</b>	1.771	3.867	3.940	4.108	4.133	5.699	6.566	7.867	<b>k'</b>	0.735	1.940	1.988	2.133	2.133	2.904	3.313	4.012

<i>Hypersil GOLD 3.0 µm (2.1 × 100 mm)</i>									<i>Hypersil GOLD 1.9 µm (2.1 × 100 mm)</i>								
<b>Rs</b>	E3	EE2	E2	E1	NORE	LEVO	MEDRO	PROG	<b>Rs</b>	E3	EE2	E2	E1	NORE	LEVO	MEDRO	PROG
<b>E3</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	<b>E3</b>	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>EE2</b>	6.8	—	—	—	—	—	—	—	<b>EE2</b>	7.5	—	—	—	—	—	—	—
<b>E2</b>	6.9	0.2	—	—	—	—	—	—	<b>E2</b>	8.6	0.2	—	—	—	—	—	—
<b>E1</b>	7.5	0.6	0.4	—	—	—	—	—	<b>E1</b>	13.6	1.2	1.0	—	—	—	—	—
<b>NORE</b>	7.2	0.6	0.5	0.06	—	—	—	—	<b>NORE</b>	8.7	0.9	0.7	0.00	—	—	—	—
<b>LEVO</b>	11.1	4.2	4.0	3.6	3.4	—	—	—	<b>LEVO</b>	13.7	4.5	4.5	4.9	3.6	—	—	—
<b>MEDRO</b>	13.5	6.2	6.0	5.6	5.3	1.8	—	—	<b>MEDRO</b>	16.3	6.4	6.6	7.4	5.5	1.9	—	—
<b>PROG</b>	17.2	9.2	8.9	8.5	8.2	4.5	2.7	—	<b>PROG</b>	20.7	9.6	10.0	11.9	8.7	5.2	3.3	—

-  $N_{th}$  : nombre de plateaux théoriques; w : la largeur des pics (min); TF : l'asymétrie de pics;  $k'$  : le facteur de capacité;  $R_s$  : la résolution; tr : temps de rétention (min).

- Les zones grisâtres représentent les pics ayant une faible résolution chromatographique ( $R_s \leq 1.25$ )

Le choix de la phase mobile a été fait en fonction de l'efficacité de l'ionisation, plutôt que sur la séparation à la ligne de base de chaque analyte. En effet, puisque nous travaillons en MS, les pics qui éluent en même temps peuvent être séparés par leur ratio m/z (**section 1.5.2.3**). Il n'est pas avantageux de sacrifier les temps d'analyses qui sont de l'ordre de 30 à 40 min pour séparer adéquatement les hormones (EE2, E1 et E2) par les méthodes spectroscopiques (DAD, UV, FLD) (**Annexe 2**), si la méthode de détection le permet. Donc, par l'évaluation des solvants testés en APCI (**Figure 1-22**), nous avons utilisé le MeOH comme solvant organique en combinaison avec l'eau pour effectuer l'analyse des hormones dans les matrices d'eau naturelles, tel que discuté au **Chapitre 3**.

### 1.5.2.2 La spectrométrie de masse (MS)

Le principe de base de la MS est de séparer les ions produits par une source d'ionisation selon leur ratio masse-sur-charge ( $m/z$ ) et de les détecter qualitativement ou quantitativement en fonction de leur  $m/z$  et leur abondance [258]. Que ce soit en LC ou GC, la MS est le mode de détection et d'identification des composés le plus populaire (**Figure 1-18**) et aussi le plus approprié pour la détection des hormones dans les matrices d'eau, de part sa sélectivité et sa sensibilité. En effet, elle permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces lorsqu'associée aux méthodes séparatives comme la LC et la GC. Il existe plusieurs types de spectromètre de masse qui comportent tous trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur [258-260]. Dans les sections qui suivent, nous allons détailler ces trois éléments pour les analyseurs, dits quadripolaires, dont il est question dans la grande majorité des études pour l'analyse des hormones dans l'eau (**Annexe 2, Figure 1-18**) et dont nous faisons usage dans nos travaux. Les quadripôles sont populaires pour plusieurs raisons, dont leur vitesse de balayage très élevée, leur robustesse, le nombre de différentes expériences possibles, leur facilité à maintenir et leur coût devenu raisonnable dans les dernières années. La MS/MS représente une méthode qui utilise deux analyseurs de masse (quadripôle) successifs, 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) [258]. Dans le cadre de nos travaux sur les hormones, nous avons utilisé la MS/MS qui comprend trois analyseurs, dont deux quadripôles (Q1 et Q2) et un hexapôle (ou quadripôle, q) entre Q1 et Q2 placé à l'intérieur d'une cellule de collision [258, 259]. Ce type de configuration est indiqué comme QqQ.

Les sources d'ionisation sont les composantes du spectromètre de masse où sont produits les ions gazeux des analytes d'intérêts. Il existe un nombre très important de sources disponibles qui ont fait l'objet de plusieurs revues de la littérature [261-264] mais ceci dépasse le cadre de cette thèse. Elles peuvent soit produire *i*) une ionisation qualifiée de douce (molécules intactes chargées, sans rupture de liaison ou *ii*) des ions moléculaires à nombre pair d'électrons) ou fortes (ions moléculaires avec un nombre impair d'électrons qui se fragmentent beaucoup et parfois même totalement). La source à choisir va dépendre de la nature de l'échantillon à analyser, qu'il soit liquide, solide ou gazeux et des propriétés des composés (labilité chimique, taille des molécules, volatilité, stabilité thermique). Nous



allons discuter de la source d'ionisation que nous avons utilisée lors de nos travaux, soit l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

### 1.5.2.3 L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique qui est complémentaire à l'ionisation par nébulisation électrostatique (ESI). En APCI, les analytes dans la phase liquide mobile de la LC sont vaporisés à température élevée (300-600 °C) et ionisés par des réactions ion-molécule en phase gazeuse initiées par une aiguille à décharge corona [265, 266]. L'APCI ionise les petites molécules thermiquement stables avec des masses moléculaires entre 1000 et 2000 Da. Comparativement à l'ESI, l'APCI permet une meilleure ionisation des molécules neutres ou moins polaires, elle peut se faire avec des solvants polaires ou non-polaires et des concentrations plus élevées d'additifs. L'APCI est aussi une source d'ionisation douce, mais contrairement à l'ESI elle produira plus de fragmentation permettant d'avoir une information additionnelle sur la structure des molécules [267]. La source APCI est composée d'une tige capillaire de faible diamètre dans laquelle passe la phase mobile, un tube de vaporisation en céramique (ou quartz) chauffé autour du capillaire pour l'étape de désolvatation rapide et une aiguille à décharge corona qui produit des ions réactifs à partir des gaz présents dans l'atmosphère. Un flux de gaz (azote) continu est aussi utilisé en APCI pour aider à la désolvatation et briser les amas d'ions de solvant (*solvent-ion clusters*).

Une différence de potentiel (3–5 kV) est appliquée à l'aiguille à décharge corona alors qu'en ESI le potentiel est appliqué au liquide au bout de la tige. Le potentiel électrique appliqué varie de manière à ce que l'intensité de courant résultant soit constant (1–5  $\mu$ A). Si l'aiguille est maintenue à un potentiel positif, l'aiguille capture les électrons. Si l'aiguille est maintenue à un potentiel négatif, l'aiguille émet des électrons. Par l'intermédiaire des électrons capturés ou émis par la décharge de corona, une série de réactions chimiques en phase gazeuse se produit avec les molécules de gaz présentes dans la source. L'APCI produit principalement des ions mono-chargés avec peu de fragmentations (mais plus qu'en ESI). Les réactions impliquées dans l'ionisation par APCI dans les modes positifs et négatifs sont détaillées dans le **Tableau 1-9**.

**Tableau 1-9** Détails des réactions impliquées dans l'ionisation par APCI en mode positif (+) et négatif (-) (adapté de Kostianen [265]).

Mécanisme d'ionisation en APCI (+)*	Mécanisme d'ionisation en APCI (-)*
$N_2 + e^- \rightarrow N_2^{+\bullet} + 2e^-$ (1)	$M + e^- \rightarrow M^{\bullet}$ si EA (M) > 0 (8)
$N_2^{+\bullet} + 2N_2 \rightarrow N_4^{+\bullet} + N_2$ (2)	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet}$ car EA (O <sub>2</sub> ) = 0.48 eV (9)
$H_2O^{+\bullet} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + HO^{\bullet}$ (3)	$O_2^{\bullet} + M \rightarrow M^{\bullet} + O_2$ si EA (M) > EA (O <sub>2</sub> ) = 0.48 eV (10)
$H_3O^+ + H_2O + N_2 \rightarrow H^+(H_2O)_2 + N_2$ (4)	$HA + O_2^{\bullet} \rightarrow A^- + HO_2^{\bullet}$ si $\Delta G_{\text{acide}}(HA) < \Delta G_{\text{acide}}(HO_2^{\bullet})$ (11)
$H^+(H_2O)_{n-1} + H_2O + N_2 \rightarrow H^+(H_2O)_n + N_2$ (5)	$M + [B-H]^- \rightarrow [M-H]^- + B$ si $\Delta G_{\text{acide}}(M) < \Delta G_{\text{acide}}(B)$ (12)
$S + B^{+\bullet} \rightarrow S^{+\bullet} + B$ avec $B^{+\bullet} = N_2^{+\bullet}, N_4^{+\bullet}$ (6)	$A + O_2^{\bullet} \rightarrow [A-X+O]^- + OX^{\bullet}$ avec X = halogène, NO <sub>2</sub> , H (13)
$S + BH^+ \rightarrow SH^+ + B$ avec $BH^+ = H^+(H_2O)_n$ (7)	$A^{\bullet} + O_2 \rightarrow [A-X+O]^- + OX^{\bullet}$ avec X = halogène, NO <sub>2</sub> , H (14)

\*S est l'analyte en mode positif (APCI (+)) et M et A représentent l'analyte en mode négatif (APCI (-))

Dans le mode positif, en absence de solvant, les premières réactions (réactions (1) à (5), **Tableau 1-9**) impliquent l'ionisation des espèces présentes dans l'atmosphère, soit l'azote (N<sub>2</sub>), l'eau (H<sub>2</sub>O) ou l'oxygène (O<sub>2</sub>), par la décharge corona. Au moment où le solvant (B) intervient, des réactions de transfert de proton ou d'échange de charge (réactions (6) et (7) respectivement, **Tableau 1-9**). L'affinité protonique des solvants va initier les réactions d'échanges de proton. Les réactions d'échanges de charge ont lieu avec les solvants qui ont une faible énergie d'ionisation (**Figure 1-21**). Les solvants les plus utilisés en APCI sont le MeOH, l'eau et l'ACN en raison de leur énergie d'ionisation (IE) élevée et de leur activité protonique (PA) importante. Les molécules ciblées sont ensuite ionisées par transfert de proton si elles ont une affinité protonique plus grande que les solvants ou des réactions d'échange de charge peuvent avoir lieu si un solvant de faible affinité protonique et énergies d'ionisation (benzène ou acétone, par exemple) est choisi pour la phase mobile [268]. La **Error! Reference source not found.** résume schématiquement les réactions impliquées dans le mode positif à l'intérieur de la source d'APCI.

	IE (eV)	PA (kJ/mol)
Nitrogen	15.581	493.8
Oxygen	12.1	421.0
Carbon dioxide	13.777	540.5
Water	12.6	691.0
Methanol	10.84	754.3
Ethanol	10.48	776.4
Acetonitrile	12.2	779.2
Ammonia	10.07	853.6
<i>n</i> -Hexane	10.13	–
Chloroform	11.37	–
2-Propanol	10.17	793
Isooctane	9.89	–
Benzene	9.243	750.4
Toluene	8.83	784.0
Acetone	9.703	812.0
Anisole	8.20	839.6

**Figure 1-21** Énergies d'ionisation (IE, eV) et affinité protonique (PA, kJ mol<sup>-1</sup>) de différents solvants [265].

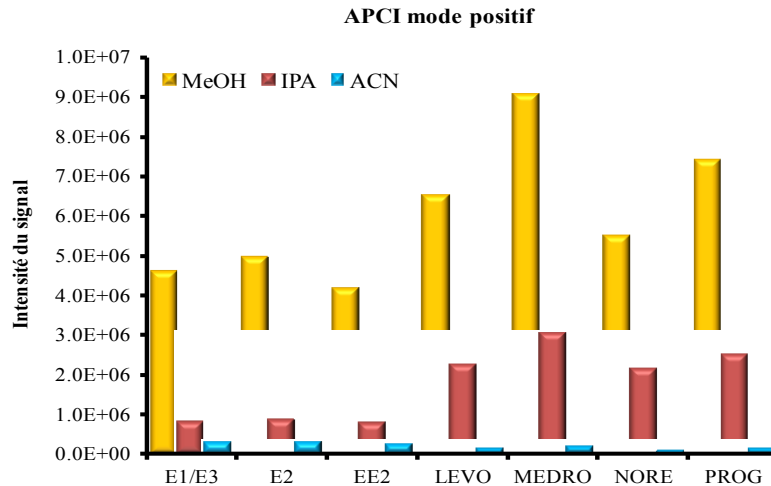
Dans le mode négatif, l'ionisation est possible par les électrons à faible énergie produits à la pointe de l'aiguille corona. En effet, les molécules (M) peuvent s'accaparer des électrons s'ils ont une affinité électronique (EA) positive (réaction (1), **Tableau 1-9**). Puisque l'oxygène est présent à pression atmosphérique et possède une affinité électronique positive (EA = 0.48 eV, **Tableau 1-9**), un superoxyde très réactif est formé, le O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (réaction (2), **Tableau 1-9**) qui peut ensuite interagir avec une espèce (solvant ou autre, HA ou analyte, M) par échange de charge ou transfert de proton (réactions (3) et (4) respectivement, **Tableau 1-9**). Les réactions (3) et (4) vont dépendre de leur acidité en phase gazeuse (variation de l'énergie libre de la réaction pour un acide, ΔG<sub>acide</sub>). D'autres réactions peuvent avoir lieu entre des espèces neutres (A) et le superoxyde (réaction (6), ou entre un ion moléculaire négatif d'un analyte (A<sup>-•</sup>) et l'oxygène (réaction (7), **Tableau 1-9**) qui forment des espèces [M-X-O]<sup>-</sup>. Ces dernières réactions ont lieu pour des composés aromatiques qui possèdent un halogène ou un groupement nitro [269].

L'APCI est une technique robuste, moins sensible que l'ESI aux variations des paramètres ainsi qu'à l'effet de matrice, qui peut se faire en mode inverse ou normal en LC, est indépendante du débit de la phase mobile et qui peut permettre d'avoir une ionisation par transfert de proton ou par échange de charge. Il faut toutefois optimiser le courant de décharge corona, la nature de phase mobile et la température de la source APCI. Une autre différence entre les deux sources est que l'intensité du signal par l'ESI est dépendante de la

concentration (*concentration-dependant*) alors que pour l'APCI elle dépend de la masse (*mass-dependant*). Cette réalité peut être difficile à concevoir, puisque pour la majorité des détecteurs en LC (UV, MS) les limites de détection sont améliorées en injectant un plus grand volume d'échantillon, donc une quantité (masse) plus importante. En effet, pour une concentration donnée en ESI, une augmentation du volume d'injection ne donnera pas une réponse proportionnellement plus élevée, mais restera sensiblement inchangée [266] selon la gamme des concentrations. Pour l'APCI, si le volume d'injection (la masse de l'analyte) augmente, la réponse va croître linéairement.

Pour l'analyse des hormones dans l'environnement, très peu d'études utilisent l'APCI comme source d'ionisation, soit seulement 9% (n = 54) (**Annexe 1**). Une étude effectuée sur les stéroïdes (molécules très semblables aux hormones ciblées) a comparé deux sources, soit l'APCI et l'ESI [270]. Les comparaisons ont été faites dans la phase mobile (eau:MeOH ou eau:ACN), c'est-à-dire une matrice non-chargée en regardant l'intensité des pics et le signal sur bruit (S/N). La conclusion de cette étude montre que la source la plus sensible et qui permet d'obtenir des limites de détection plus faible est l'ESI. Cette même expérience a été effectuée par d'autres pour les hormones oestrogéniques (E1, E2, E3 et EE2), avec les mêmes conclusions entre ces deux sources [271]. Toutefois, l'article le plus récent portant sur les oestrogènes (E1, E2, E3, EE2) et un progestatif (PROG) donne des résultats qui varient en fonction du composé, avec l'APCI donnant les meilleures limites de détection pour E1 et E3 alors que pour E2, EE2 et PROG c'est l'HESI (à noter ici que c'est la source ESI modifiée avec un tube de vaporisation chauffé) qui se démarque [272]. Donc, nous avons décidé en premier lieu d'évaluer de la même manière les deux sources, ESI et APCI, dans les deux modes (positif et négatif) pour nos huit hormones, surtout pour les progestatifs très peu étudiés dans les articles répertoriés dans la littérature. De plus, nous avons voulu évaluer l'effet de solvant de différente affinité protonique sur l'ionisation des hormones ciblées, soit le MeOH, l'ACN et l'isopropanol (IPA), voir **Figure 1-21**. La source d'ionisation qui a donné les intensités les plus élevées pour les huit hormones à l'étude était l'APCI. L'effet du solvant montre que le MeOH dans le mode positif donne les meilleurs résultats (**Figure 1-22**). Ceci est en accord avec les résultats préalablement obtenus sur les stéroïdes [270] et aussi la théorie, puisque le MeOH ( $PA = 754.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) a l'affinité protonique la plus faible des trois solvants (**Figure 1-21**) et peut donc libérer un proton plus facilement. Cette logique n'est pas observée pour l'IPA et l'ACN, avec l'affinité protonique de l'ACN plus faible que

celui du IPA, soit  $779.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  et  $793 \text{ kJ mol}^{-1}$ , respectivement. Toutefois, avec l'ACN il y avait formation d'adduits qui étaient très intenses, mais instables (RSD = 65%), donc nous avons plutôt regardé les  $m/z$  des hormones sans adduits beaucoup moins intense. Donc, suite à nos expériences, nous avons choisi d'utiliser l'APCI pour l'analyse des hormones dans l'eau pour effectuer nos travaux sur l'optimisation de l'approche analytique, tel que décrit au **Chapitre 3**.



**Figure 1-22** Effet de différents solvants (MeOH, IPA et ACN) sur l'intensité du signal des hormones par APCI selon les paramètres optimaux pour chacun. Les solvants sont ajoutés à l'eau (50:50, v/v).

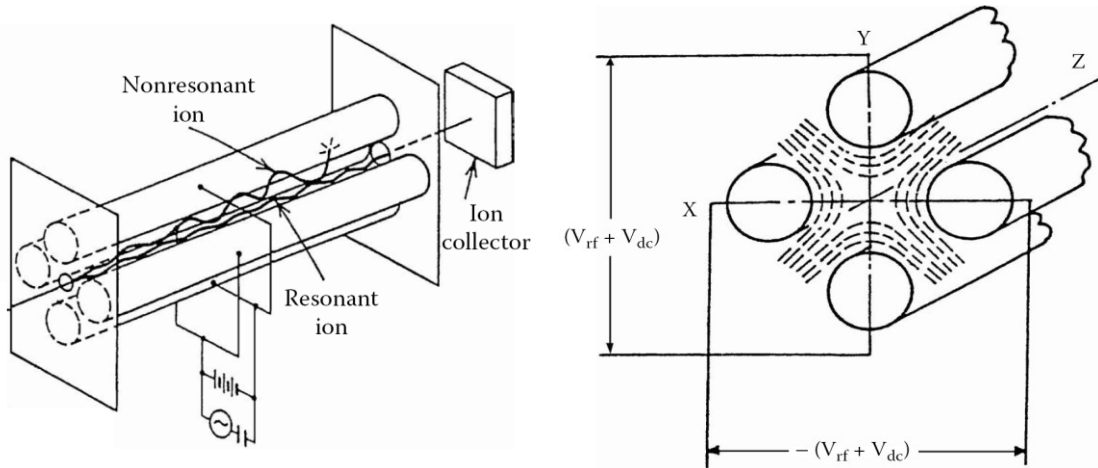
### 1.5.2.3 L'analyseur : le quadripôle simple et triple

Les analyseurs quadripolaires sont les plus populaires pour l'analyse des hormones dans l'eau selon les articles de 1999-2013 (**Annexe 2, Figure 1-56**). Cet analyseur emploie une combinaison d'une tension continue (DC, *direct current*) et d'une tension alternative (RF, *radio frequency*) qui créent un champ électrique qui permet de faire la discrimination d'ions avec différents  $m/z$  («filtre» de masse) en modifiant leur trajectoire [266]. Un quadripôle est composé de quatre électrodes, idéalement hyperbolique mais parfois circulaire, qui sont soumises deux à deux (opposées diagonalement) à une combinaison de DC et de RF de charges opposées **Figure 1-23**. La tension ( $\Phi$ ) appliquée sur chaque paire d'électrodes peut se définir selon les équations suivantes :

$$\Phi_{x-z} = + (U + V \cos \omega t) \quad (31)$$

$$\Phi_{y-z} = - (U - V \cos \omega t) \quad (32)$$

Avec  $U$  l'amplitude de la tension continue,  $V$  l'amplitude de la tension alternative,  $\omega$  la fréquence angulaire ( $2\pi f$ ) et  $t$  le temps.

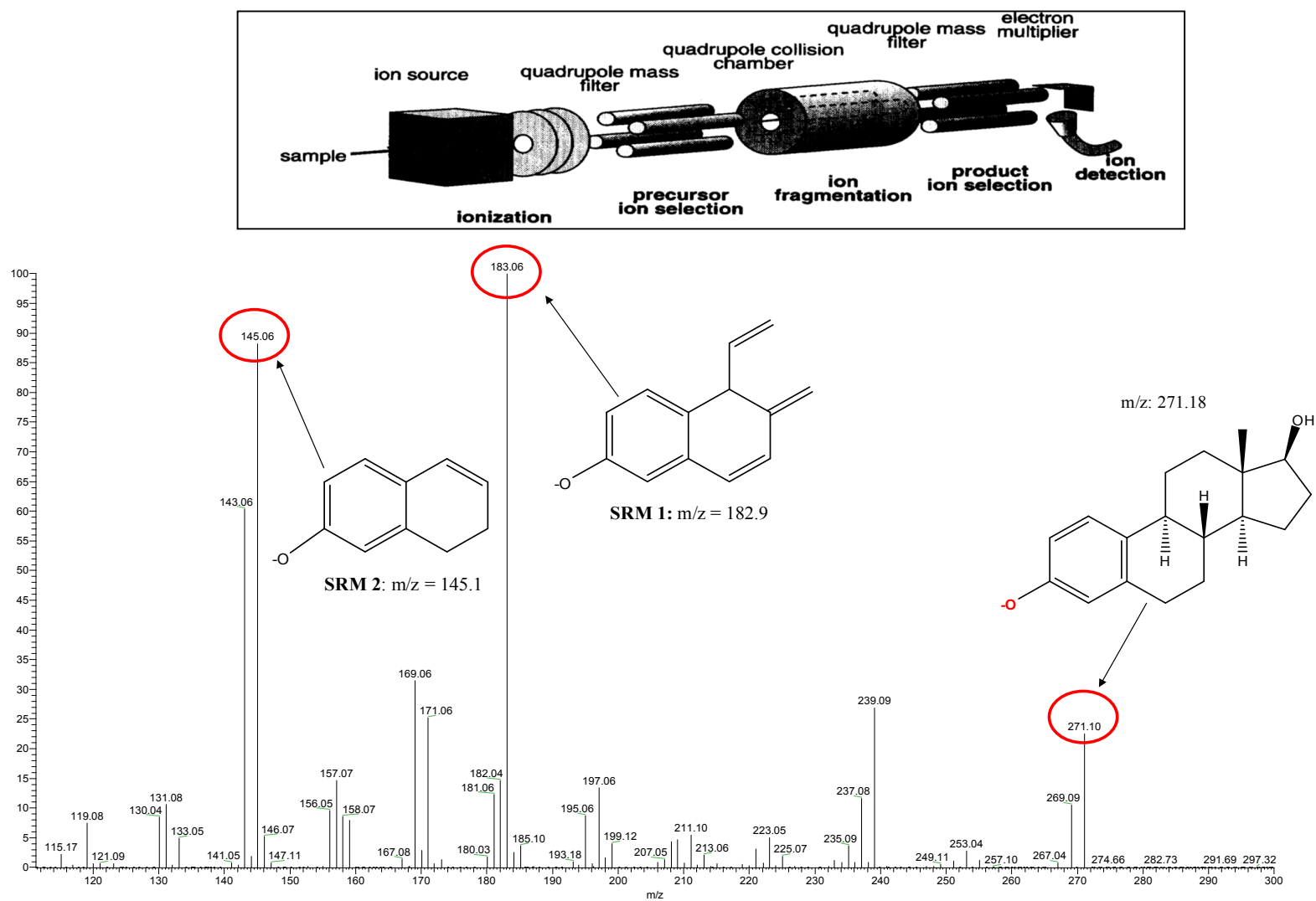


**Figure 1-23** Schématisation d'un quadripôle (gauche) et des paires d'électrodes auxqueltes sont appliquées les tensions directe (DC) et alternative (RF) [273].

Dans le cadre de nos recherches pour l'analyse des hormones dans l'eau nous avons utilisé le triple-quadripôle, soit QqQ (**section 1.5.2.2**). Ce spectromètre de masse présente un quadripôle à chaque étape de l'analyse, avec un quadripôle (q) qui sert de cellule de collisions (et non comme un analyseur de masse). Pour ce faire, on applique uniquement une RF ( $U = 0$ ) dans le second quadripôle (q) laissant passer tous les ions de différentes masses qui seront exposés à un gaz (Ar) pour permettre leur fragmentation (*collision induced dissociation*) (**Figure 1-24**). Ce type d'approche que nous avons utilisé correspond à une des expériences possibles avec cette configuration d'analyseur, soit les multiples fragmentations sélective (*multiple reaction monitoring, MRM* ou *selective reaction monitoring, SRM*) [259]. Un exemple de spectre de masse (MS/MS) obtenu avec cette méthode pour l'E2 et deux ions fragments produits dans la cellule de collision, avec leurs structures (SRM 1 et SRM 2), en mode négatif par APCI est illustré à la **Figure 1-24**. Les avantages de la QqQ sont nombreux, dont sa bonne transmission des ions, son efficacité dans l'enceinte de collision, le nombre d'expériences possibles (perte de neutre, spectres de précurseurs, spectres d'ions fragments, balayage sélectif et balayage complet), le fait que l'énergie de

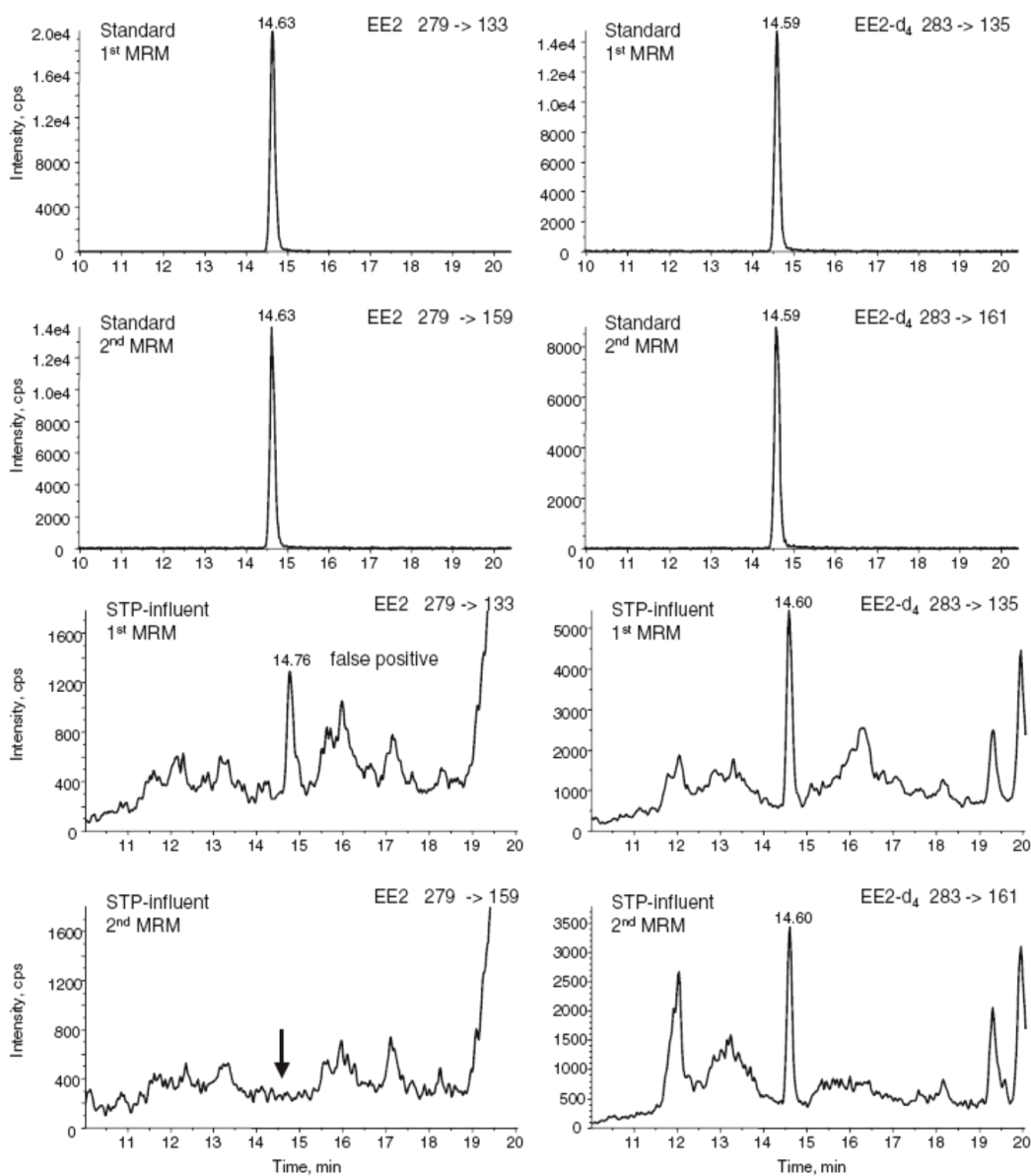
collision peut être modifiée et qu'il permet de travailler avec une gamme dynamique linéaire élevée.

Le triple-quadripôle donne un avantage important dans l'analyse de composés, puisque qu'il permet d'être beaucoup plus sélectif, comparativement à un simple quadripôle, et donc diminue la possibilité d'obtenir de faux positifs. En effet, avec un simple quadripôle on se fit à deux paramètres au cours de l'analyse, le temps de rétention du composé (s'il y a une étape chromatographique) et la masse du précurseur. Dans l'analyse par triple-quadripôle, nous nous basons sur plusieurs points, soit le temps de rétention du composé, la masse du précurseur, la masse des ions produits (deux au minimum) et le ratio de ces derniers. D'ailleurs nos analyses des hormones dans l'eau ont pris en compte tous ces aspects de l'utilisation du triple-quadripôle pour éviter les faux positifs. Les points sur lesquels nous nous sommes inspirés sont décrits en détail dans un document produit par l'Union Européenne (décision 2002/657/L221) pour le nombre de critères à choisir pour la confirmation de la présence d'un analyte par LC-MS/MS [274]. D'ailleurs un exemple montre l'importance de suivre ces critères [275], surtout quand au nombre d'ions produits à suivre (soit deux au minimum), et illustré pour l'analyse de l'EE2 dans un échantillon d'effluent par LC-MS/MS où on illustre que de considérer une seule SRM aurait donné lieu à de faux positifs (**Figure 1-25**). En effet, dans l'exemple de la **Figure 1-25**, le critère du temps de rétention est maintenu entre l'échantillon réel et celui du standard ( $\pm 2.5\%$ ) [274], mais c'est seulement en regardant la seconde SRM que l'on remarque que l'échantillon ne contient pas l'analyte d'intérêt. Le **Tableau 1-10** donne les détails sur les ions précurseurs et produits pour les hormones à l'étude dans les chapitres suivants, selon une ionisation par APCI en mode positif ou négatif.



**Figure 1-24** Diagramme d'un spectromètre de masse triple-quadrupolaire (haut) [259] et exemple de spectre MS/MS pour l'E2 en mode négatif par APCI avec les deux ions fragments (SRM 1 et SRM 2) les plus intenses (bas).





**Figure 1-25** Chromatogrammes de deux MRM pour l'analyse de l'éthinylestradiol (EE2) dans un échantillon standard et dans un échantillon réel d'affluent d'une usine de traitement des eaux usées. Cet exemple montre l'importance de considérer au minimum deux ions produits pour l'analyse par LC-MS/MS pour éviter les faux positifs [275]

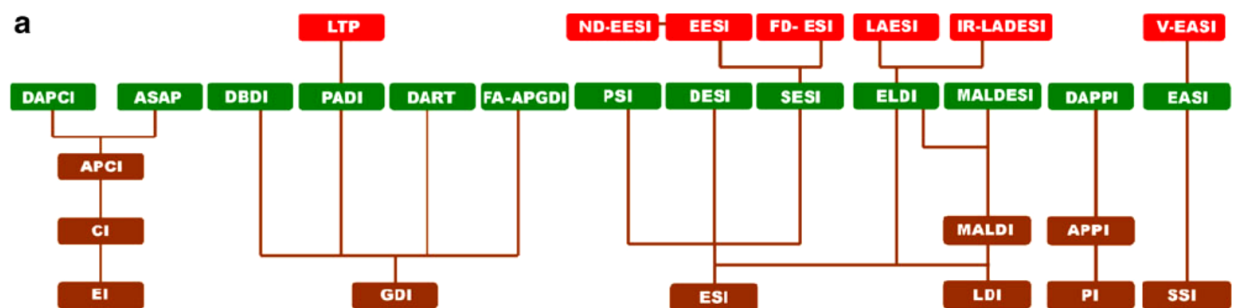
**Tableau 1-10** Paramètres MS/MS des hormones oestrogénique et progestagéniques par APCI en mode négatif et positif.

Composé	Mode d'ionisation	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Ratio des intensités relatives (%)	TL (V)	CE (eV)
E1	NI	269 [M-H] <sup>-</sup>	145	45 ± 6	-84	57
			143	100	-84	41
	PI	271 [M+H] <sup>+</sup>	157	93 ± 6	91	22
			133	100	91	22
E2	NI	271 [M-H] <sup>-</sup>	143	51 ± 13	-74	47
			145	66 ± 20	-74	37
			183	100	-74	49
	PI	255 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	31 ± 3	68	18
			144	21 ± 3	68	40
			159	100	68	19
E3	NI	287 [M-H] <sup>-</sup>	143	67 ± 12	-97	54
			171	100	-97	40
	PI	271 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	91 ± 6	91	22
			157	100	91	22
EE2	NI	295 [M-H] <sup>-</sup>	143	63 ± 12	-82	70
			145	100	-82	45
			183	58 ± 13	-82	44
	PI	279 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	100	46	16
			159	69 ± 11	46	20
			109	83 ± 19	64	27
LEVO	PI	313 [M+H] <sup>+</sup>	185	45 ± 8	64	20
			245	100	64	18
			97	26 ± 4	74	23
MPROG	PI	345 [M+H] <sup>+</sup>	123	100	74	25
			91	85 ± 16	69	35
NOR	PI	299 [M+H] <sup>+</sup>	109	100	69	26
			97	98 ± 17	65	20
PROG	PI	315 [M+H] <sup>+</sup>	109	100	65	24

#### 1.5.2.4 La désorption thermique à diode laser (LDTD)

La réalisation de l'ionisation à pression atmosphérique a contribué à l'élaboration de nombreuses nouvelles sources (ou plutôt des variations des sources conventionnelles d'APCI et ESI) depuis une dizaine d'années. En effet, le précurseur de ces sources d'ionisation a été présenté et décrit en 2004 par Takats *et al.* [276] dans le groupe de Graham Cooks, soit la DESI (*desorption electrospray ionization*). Dans cette source, un solvant va être propulsé à travers un capillaire sous haute tension vers la surface d'un échantillon. Au moment de l'impact des gouttelettes sur la surface, les analytes sont extraits dans des gouttelettes sortantes puis sont ionisés avec les mêmes étapes d'une ionisation par ESI standard (**section Error! Reference source not found.**). Cette technique a servi pour étudier de nombreuses

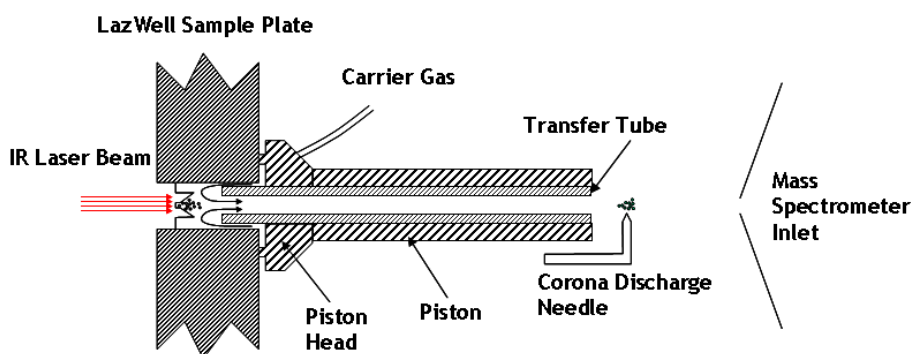
lasses de composés présents sous forme de trace, incluant des médicaments, des explosifs, des peptides et des protéines, entre autres [277]. La seconde source qui a fait son apparition est la DART (*direct analysis in real time*), développée par Cody *et al.* [278] en 2005. Les mécanismes d'ionisation impliqués dans la source DART ne sont pas encore bien élucidés [278-280], mais ils débutent avec l'utilisation d'un gaz ayant un haut potentiel d'ionisation (He) auquel un potentiel électrique est appliqué. Un plasma est formé, constitué d'atomes excités et d'ions qui entreront en contact avec la surface de la matrice (gazeuse, solide ou liquide) résultant en une désorption d'ions de faibles masses moléculaires. Depuis l'introduction de ces deux sources, un nombre important de sources différentes ont été développées (**Figure 1-26**) qui possèdent leurs avantages et leurs inconvénients selon leurs applications, tel que la nature du composé, le type de matrice ou si l'analyse est qualitative ou quantitative. Deux revues de la littérature [281, 282] font le tour de toutes ces sources d'ionisation à température ambiante, dont le principal objectif est leur rapidité d'analyse (de l'ordre des secondes) qui permet d'obtenir des résultats pour un nombre important d'échantillon en très peu de temps (*high throughput*).



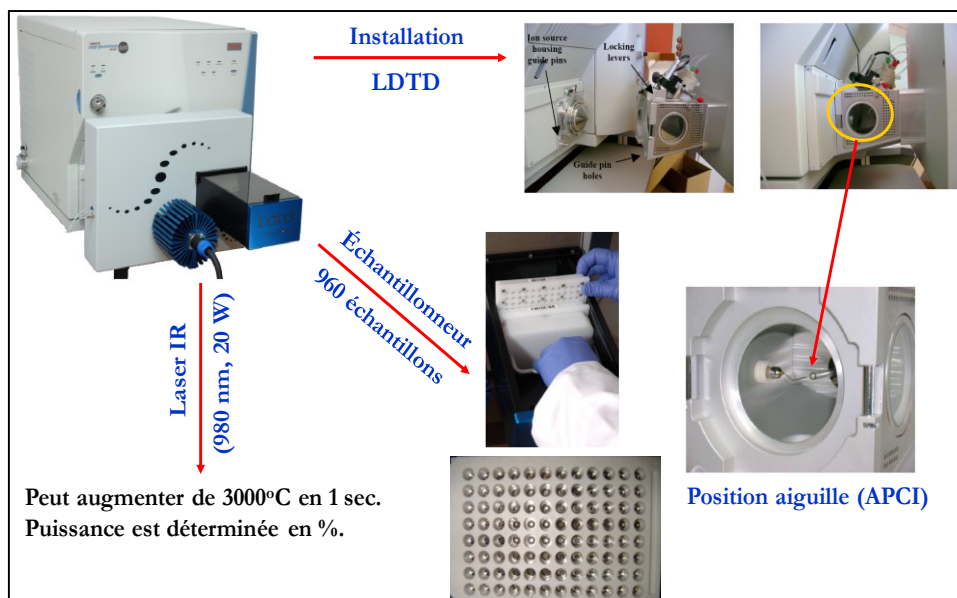
**Figure 1-26** Les sources d'ionisation ambiante (en vert) connectées aux sources «traditionnelles» desquelles elles découlent (en brun) ainsi que les sous sources développées à partir des sources d'ionisation ambiantes (en rouge). Les définitions des acronymes sont présentées en **Annexe 4** [281].

Une des sources développées en 2008 et présentée par Picard *et al.* [283] et qui a fait l'objet du **Chapitre 2** de cette thèse, est la LDTD (*laser diode thermal desorption*) développée par Phytronix Technologies (Québec, Qc, Canada). La LDTD est une technique qui combine la désorption thermique, par l'intermédiaire d'un laser, à une source APCI. Les analytes dissous dans un solvant approprié sont déposés à l'intérieur de puits, selon un volume

de 1 à 10  $\mu\text{L}$ , à l'intérieur d'une plaque avant d'être mis à sécher (à l'air ou dans un four). Les analytes neutres sont désorbés sous l'effet de la chaleur générée par le laser qui frappe l'arrière du puits dans lequel a été déposé l'échantillon (le laser n'est jamais en contact direct avec l'échantillon). Les analytes en phase gazeuse sont dirigés par un gaz de transfert (air) à l'intérieur d'un tube de transfert vers la région d'ionisation APCI où ils seront ionisés (en mode positif ou négatif) puis analysés par MS/MS. La **Figure 1-27** montre la schématisation de la source LDTD et la **Figure 1-28** illustre la manière dont la source est montée sur le MS/MS en plus de l'image des plaques d'échantillonnages.

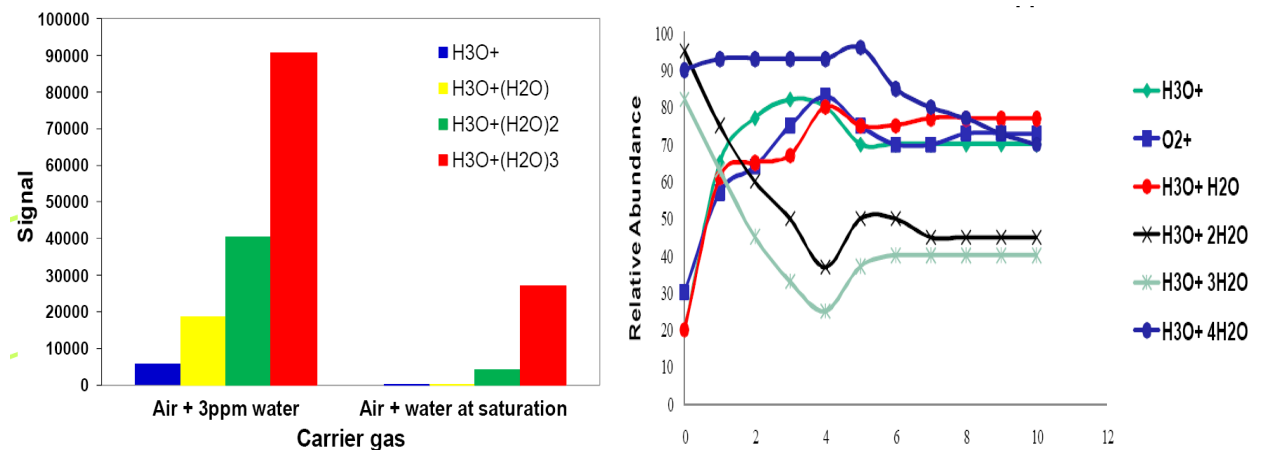


**Figure 1-27** Schématisation de la source LDTD avec ses composants [283].



**Figure 1-28** Image du montage de la LDTD sur le spectromètre de masse avec la description de l'appareillage.

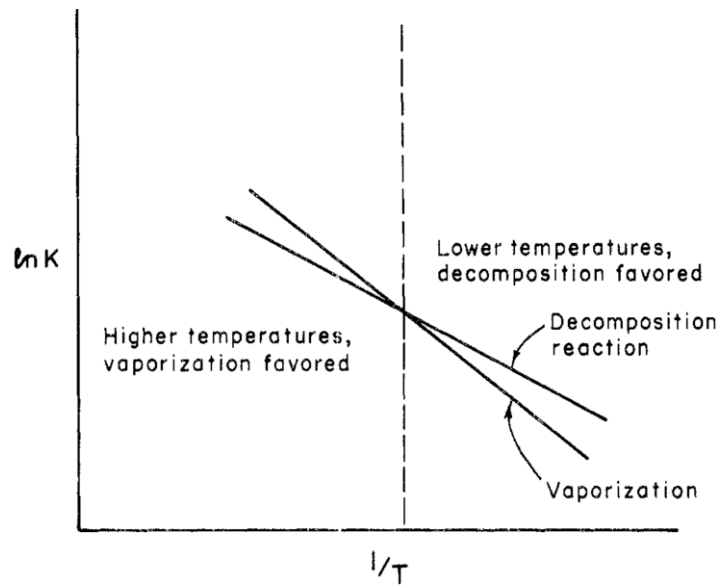
Les mécanismes impliqués dans l'ionisation s'apparentent à celles avec l'APCI traditionnelle (**section** Error! Reference source not found., **Tableau 1-9**) à l'exception qu'ils n'impliquent pas la présence de phase liquide évaporée. En effet, la «phase mobile» et le gaz vecteur utilisé (air) promouvoit l'ionisation à travers la présence de traces d'eau (réaction (5), **Tableau 1-9**). Ce sont alors les ions hydroniums ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) produits et qui se retrouvent à différents niveaux de solvation  $(\text{H}_2\text{O})_{n-1}(\text{H}_3\text{O})_n^+$  qui seront responsables du transfert de proton vers les analytes (en mode positif). L'affinité protonique va en augmentant avec la taille de l'ion de solvation (nombre élevé de  $n$ ). C'est-à-dire que l'ion hydronium simple est celui avec l'affinité protonique la plus faible (**Figure 1-21**) et donc la forme qui permettra d'avoir une meilleure efficacité d'ionisation. Il a été démontré qu'une trop grande humidité du gaz vecteur appauvrissait la couronne de décharge en ions de bas niveaux de solvation, particulièrement pour  $n < 3$  (Error! Reference source not found.) [284]. C'est pour cette raison u'avec la source LDTD, le gaz de transfert et de l'air sec ne doivent contenir idéalement que des traces d'eau ( $< 3$  ppm). Aussi, en fonction du débit ( $\text{L min}^{-1}$ ) du gaz de transfert, l'abondance d'ions hydronium  $\text{H}_3\text{O}^+$  est maximale entre 2 et 4  $\text{L min}^{-1}$  (**Error! Reference source not found.**).



**Figure 1-29** Abondance des ions hydroniums solvatés ( $n < 4$ ) formés dans la source LDTD avec de l'air sec (3 ppm d'eau) et saturé en eau (à gauche) et l'abondance relative de différents ions en fonction du débit de l'air (3 ppm d'eau) (à droite) [284].

L'absence de dégradation des analytes soumis à la désorption laser s'explique par *i*) le volume de déposition très faible ( $\mu\text{L}$ ), *ii*) le débit du gaz de transfert et *iii*) le chauffage très rapide de l'arrière du puits par le laser. Pour le premier point, le volume de déposition, il a

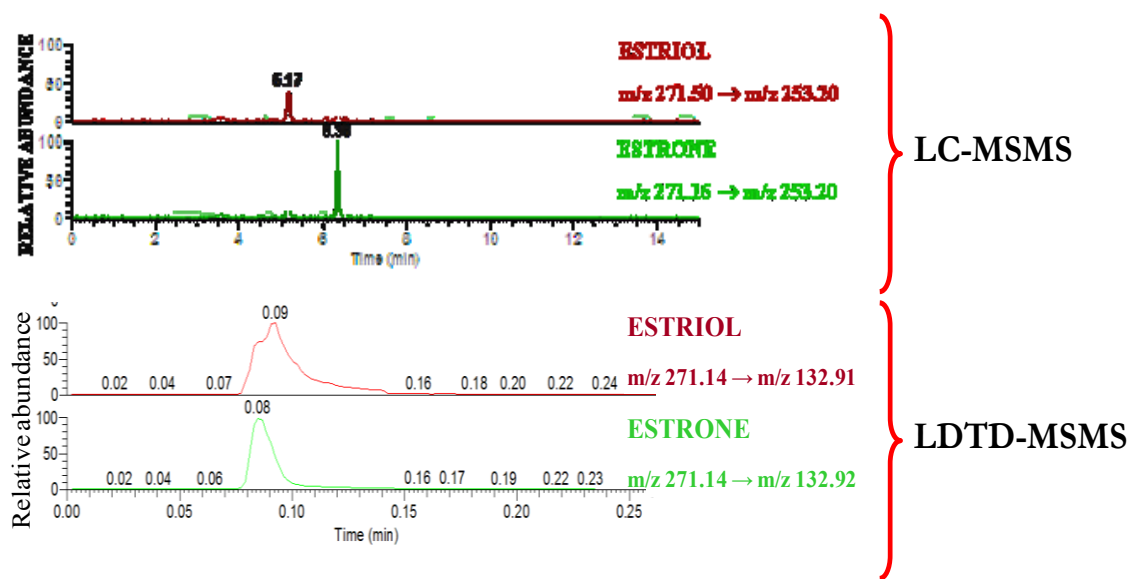
été démontré que les propriétés physicochimiques (dont la volatilisation) changent pour des quantités microscopiques de matériel versus des quantités macroscopiques [285-287]. Pour un grand nombre de composés analysés par LDTD, la température de fusion est supérieure à 200°C, par contre ils sont volatilisés en chauffant la surface arrière du puits entre 100 et 180°C et parfois à 60°C comme pour le sulfadiazine (un antibiotique) [283]. Pour le second point, le gaz de transfert permet un refroidissement très rapide de la surface du puits (par exemple à 39°C pour une température de chauffage de 100°C avec un débit de 2 L min<sup>-1</sup> pour le gaz de transfert), ce qui contribue également à éviter la dégradation par fragmentation thermique [283]. Le dernier point, soit l'avantage du chauffage rapide a été étudié dans les années 1970 [288, 289]. En effet, la **Figure 1-30** illustre comment la volatilisation d'un composé peut se faire en évitant sa dégradation si elle est effectuée rapidement. À une température plus faible ( $1/T$  élevé) les réactions de décomposition sont favorisées (constante de vitesse de réaction  $K$  élevée, **Figure 1-30**), ce qui implique que les produits de dégradation seront formés dans une phase gazeuse. Toutefois, si l'énergie d'activation ( $E_a$ ) pour la vaporisation (bris des liens intermoléculaire ainsi que ceux entre la molécule et la surface du puits de la plaque en LDTD) est plus élevée que celle de la décomposition (bris de lien intramoléculaire), les droites des graphiques d'Arrhenius doivent se croiser à un certain point (indiqué par la ligne verticale hachurée dans la **Figure 1-30**). Donc, si le chauffage peut se faire rapidement au-dessus de ce point de rencontre des deux droites, les constantes de vaporisation seront favorisées et les molécules se retrouveront intactes dans la phase gazeuse.



**Figure 1-30** Démonstration graphique de la relation entre la température (en K) de vaporisation et la décomposition moléculaire théorique d'un composé non-volatile et thermiquement labile. Ceci explique pourquoi le désorption par la LDTD n'induit pas une fragmentation des substances lors de l'étape de volatilisation et que l'ion moléculaire chargé est détecté [288].

Comme toute technique, la LDTD possède certains désavantages. Comparativement à la chromatographie, il n'y a de séparation dans le temps et ceci peut causer un problème dans l'analyse des hormones. L'ionisation dans le mode positif par APCI de l'E3 et de l'E1 donne le même  $m/z$  pour leurs précurseurs et leurs ions fragments (**Tableau 1-9**) donc il est impossible de les séparer par la masse, mais seulement par la chromatographie, comme illustré à la **Figure 1-31**. Ce problème a été résolu par l'analyse des deux composés en mode négatif, pour lequel leurs  $m/z$  sont différents (**Tableau 1-9**). Aussi, les effets de matrices doivent être considérés dans l'analyse, puisque tous les composés (analytes ciblés ou ceux de la matrices) désorbent au même moment, donc une étape de lavage dans l'étape de pré-traitement peut être nécessaire pour obtenir de meilleurs limites de détections. Ceci est toutefois le point faible des méthodes d'ionisation directe (DESI, DART), compte-tenu du fait que la chromatographie permet également de séparer les composantes de la matrice des molécules ciblées. Finalement, comme cette source se base sur l'ionisation par APCI, les molécules très polaires (métabolites conjugués de médicaments, par exemples) ou ayant de fortes masses (protéines) plus facilement ionisables en ESI sont difficilement ionisés avec la

LDTD. Une étape de dérivation pourrait servir à ioniser les molécules plus polaires. Les avantages de la LDTD sont : sa rapidité, la réduction des coûts d'analyse (aucun besoin de colonnes, de pompes analytiques et de phases mobiles), le phénomène de contamination des blancs (*carryover*) est sensiblement éliminé puisque l'analyse se fait en phase gazeuse (comparativement à la LC avec l'adsorption des analytes sur les parois des composants des valves d'injections, des lignes de transfert ou de la seringue), l'ionisation est indépendante du solvant de la phase mobile (puisque'elle est éliminée) et l'analyte peut être solubilisé dans n'importe quel solvant sans devoir être compatible avec une méthode séparative (LC ou GC), car elle est éliminée.



**Figure 1-31** Comparaison des chromatogrammes entre la LC-MS/MS et des pics dans le temps de la LDTD-MS/MS pour l'analyse de deux hormones (E3 et l'E1) qui ont les mêmes  $m/z$  pour leurs précurseurs et ions produits. L'analyse par LDTD ne permet pas de distinguer entre les deux.

Dans le cadre de travaux de recherche, la LDTD a été choisie pour l'analyse des hormones dans les matrices d'eau dans l'objectif d'éliminer l'étape chromatographique de l'analyse. De cette façon, les analyses se font en 15 sec par échantillon [290] au lieu de plusieurs minutes (8 à 15 min, avec l'étape d'équilibration de la colonne, **Figure 1-31**). En effet, au début de nos recherches l'étape de la SPE devait se faire manuellement mais afin de pouvoir sauver du temps et sans compromettre la fiabilité et la robustesse de la méthode, la



LDTD était avantageuse. Aussi, c'était la première application de la LDTD dans le domaine de l'environnement et le premier papier à discuter systématiquement des paramètres et des conditions qui influencent l'ionisation des molécules par cette source, soit le type de solvant, la puissance laser, le patron laser, le débit du gaz de transfert et le volume de déposition. Le **Chapitre 2** discute de ces paramètres en détails et montre l'application de cette source à l'analyse de contaminants environnementaux dans les matrices d'eau.

## 1.6 Structure de la thèse

Les chapitres de la thèse sont organisés de façon à montrer les nouveaux développements analytiques et leurs applications dans l'étude de l'analyse des hormones stéroïdiennes dans les matrices d'eau, autant pour leur quantification et détection que pour l'évaluation de leur enlèvement par oxydation chimique.

Le **Chapitre 2**, article publié dans *Analytical Chemistry*, décrit pour la première fois l'utilisation d'une nouvelle méthode d'introduction d'échantillon, soit la source d'ionisation LDTD-APCI, couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des hormones dans les eaux naturelles. Les hormones stéroïdiennes choisies comptaient quatre oestrogènes et quatre progestagènes retrouvées dans les eaux usées et de surface de la région de Montréal (Qc, Canada). L'avantage de la LDTD-APCI est le temps d'analyse très court, soit 15 secondes par échantillon, comparativement à plusieurs minutes par les méthodes séparatives conventionnelles. Les paramètres impliqués dans l'optimisation de la source LDTD-APCI sont discutés afin de mieux comprendre leur impact sur l'efficacité de l'ionisation et le développement de la méthode. Le pré-traitement des échantillons ont été effectués pas SPE manuelle afin de valider la méthode d'analyse et de montrer son applicabilité pour des échantillons réelles.

Le **Chapitre 3**, est un article publié dans *Talanta* qui vise à développer une méthode par SPE automatisée couplée à la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées et de surfaces. Les hormones stéroïdiennes choisies comptaient quatre oestrogènes et quatre progestagènes retrouvés dans les eaux usées et de surface de la région de Montréal (Qc, Canada). Les objectifs de cet article étaient nombreux, soit de : *i*) développer une méthode d'analyse rapide qui simplifie la méthode de pré-concentration des échantillons, *ii*) évaluer l'étape de pré-traitement de l'échantillon (filtration et préservation) sur l'analyse, *iii*) présenter une approche analytique valable pour la validation des méthodes pour la SPE automatisée en ligne et *iv*) appliquer les méthodes de validation statistique plus adaptées à l'analyse des composés environnementaux dans les matrices complexe par spectrométrie de masse (limite de détection, de quantification et effets de matrice).

Le **Chapitre 4**, article publié dans *Chemistry Central Journal*, explore la possibilité d'enlèvement des hormones stéroïdiennes par oxydation chimique impliquant le permanganate de potassium, soit quatre progestagènes. Les constantes d'oxydations par le permanganate ont été rapoortées pour la première fois pour ces hormones dans les eaux potables. Plusieurs facteurs pouvant affecter l'efficacité de l'oxydation, soit la température, le pH et la présence de la matière organique, ont été considérés pour quantifier leur impact sur les constantes d'oxydation. La méthode développée par LDTD-APCI-MS/MS au **Chapitre 2** a servi pour l'analyse des échantillons produits pour la détermination des constantes d'oxydation.

Le **Chapitre 5**, article soumis à *Journal of Hazardous Materials*, montre la capacité du chlore comme agent d'oxydation pour l'enlèvement des hormones oestrogénique dans les eaux potables. Les constantes d'oxydation ont été déterminées pour la première fois dans les eaux usées et comparées avec celles observées dans la littérature pour des tests dans l'eau ultrapure. Plusieurs facteurs pouvant affecter l'efficacité de l'oxydation, soit le pH, la présence de la matière organique et surtout l'effet de la concentration de bromure, ont été considérés pour quantifier leur impact sur les constantes d'oxydation. La méthode développée par LDTD-APCI-MS/MS au **Chapitre 2** a servi pour l'analyse des échantillons produits pour la détermination des constantes d'oxydation.

Le **Chapitre 6** comprend une conclusion générale ainsi que les défis et recherches à venir sur les hormones stéroïdiennes.

## **Chapitre 2 Optimisation et validation d'une méthode d'analyse des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées par désorption thermique à laser diode couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

---

Laser Diode Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry Analysis of Selected Steroid Hormones in Wastewater: Method Optimization and Application

Paul B. Fayad, Michèle Prévost and Sébastien Sauvé, 2010

*Anal Chem.*, 2010, 82(2) : 639-645.

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche: J'ai effectué les expériences, réalisé les l'analyses ainsi que l'interprétation de données.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires des Profs. Prévost et Sauvé, mes directeurs de thèse.

## Abstract

A rapid and reliable method enabling high-throughput sample analysis for quicker data generation, detection and monitoring of eight selected steroid hormones in water matrices was developed and validated. Our approach is based on a novel sample introduction method, the laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization (LDTD/APCI) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). The optimization of instrumental parameters and a method application are presented. Our method was successfully applied to spiked effluent wastewater in the low-nanogram per liter concentrations with total analysis time reduced to seconds (15 s) using LDTD-APCI-MS/MS compared to minutes with traditional liquid-chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) following solid-phase extraction (SPE). The instrumental detection limits for LDTD-APCI-MS/MS ranged from 5 to 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  and from 13 to 43  $\text{ng L}^{-1}$  for the method detection limits. Calibration curves in wastewater matrix showed good linearity ( $R^2 > 0.99$ ) and precision (intraday and interday) was below 20%. This work demonstrates that LDTD/APCI-MS/MS could be used for fast and effective quantitative analysis of emerging contaminants in different water matrixes with reduced cost by eliminating the chromatography step used in traditional LC-MS/MS.

## 2.1 Introduction

Monitoring of emerging contaminants (ECs) in the aquatic environment is progressively becoming a priority for government agencies and regulatory agencies as well as the general public. Among the various compounds considered as ECs, there has been growing concerns toward endocrine-disrupting chemicals (EDCs), such as steroid ovarian hormones that affect the reproductive physiology of wildlife populations with possible implications in human reproductive health as well [291]. Estrogens and progestogens, from naturally occurring (e.g. estradiol excreted from mammals urine) and synthetic (oral contraception and livestock-farming) sources, have both been detected in waste and surface water matrixes [135, 151, 292, 293]. To date, numerous analytical procedures have been developed to identify and quantitate steroid hormones in water matrixes and often include the use of chromatography (liquid or gas) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). Preconcentration and purifying processes, such as solid-phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) are necessary because of matrix complexity and the low-nanogram per liter levels at which they have been reported in the aquatic environment [294]. As a result, the identification and quantification of steroid hormones can be time-consuming, costly and often result in slow turnover. Although sample preparation steps are time-consuming for steroid hormone analysis in water matrixes, the liquid chromatographic (LC) step also requires several minutes, increasing the overall analysis time and data generation.

Several alternative techniques have eliminated the use of an LC step prior to detection, reducing analysis time, sample pretreatment and cost, by eliminating column usage and reducing solvent consumption, while increasing sample throughput, such as direct analysis in real time (DART) [278], desorption electrospray ionization (DESI) [276] and atmospheric pressure matrix assisted laser desorption/ionization (AP MALDI) [295] all coupled to MS/MS. Tandem mass spectrometry is recognized for its ability to quantitate and confirm the presence of selected target compounds in complex mixtures [296, 297] with excellent selectivity and specificity. However, to the best of our knowledge, none of these innovative ionization sources coupled to MS/MS have been applied to the quantification of ECs in environmental matrixes. Therefore, the need for an environmental screening and/or monitoring method that is both fast and cost effective is relevant.

This work presents the use of a sensitive method enabling high-throughput sample analysis of eight selected steroid feminizing hormones (Supporting Information **Figure 2S-1**) in effluent wastewater using a novel sample introduction method combined to an atmospheric pressure ionization source, the laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization (LDTD/APCI), coupled to MS/MS. The assembly and schematic diagram of the LDTD/APCI source have previously been reported [298]. The analysis time is achieved in seconds compared to minutes for traditional LC-MS/MS methods by eliminating the LC step. The LDTD-APCI-MS/MS uses a heat gradient to volatilize the analyte of interest which is then ionized in the APCI region upon entering the triple quadrupole system for detection. Our objective in this study is to optimize the method and its operating parameters and identify the limitations. The determination of the selected steroid hormones at low-nanogram per liter levels in effluent wastewater was done to confirm the applicability of the method in real environmental samples, with simple sample preparation, SPE, followed by quantification using the LDTD/APCI-MS/MS system. Method validation was done by evaluating selectivity, linear range and precision (interday and intraday).

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Chemicals, Reagents and Stock Solutions

All selected steroid hormones standards (purity  $\geq 97\%$ ), estrone (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3),  $17\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), levonorgestrel (LEVO), medroxyprogesterone (MPROG), norethindrone (NOR) and progesterone (PROG) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Isotopically labeled estradiol,  $[13C2]$ -E2, used as a surrogate and  $17\alpha$ -ethinylestradiol,  $[13C2]$ -EE2, used as an internal standard (IS) were obtained from ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada). Individual stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1000 mg/L and kept at  $-20^{\circ}C$  for a maximum of 3 months. A primary mix of steroid hormone working solution was prepared daily at a concentration of 100 mg/L by dilution in acetonitrile (ACN) of individual stock solution aliquots. Subsequent working solutions were prepared in ACN or water to give solutions of desired concentration.

All solvents used were of HPLC grade purity from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ) and deionized/distilled water (dd-H<sub>2</sub>O) was used for dilutions.

### 2.2.2 Solid-Phase Extraction

SPE was done using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). Reversed-phase Strata-X (surface-modified styrene divinylbenzene polymer) cartridges with a 200 mg bed mass from Phenomenex were used to extract the selected steroid hormones from water matrixes. Prior to dilution (1:10, v/v) in dd-H<sub>2</sub>O and extraction, wastewater effluent samples were collected in precleaned 4-L amber bottles from the St-Eustache wastewater treatment plant (WWTP) (St-Eustache, QC, Canada), filtered using 0.45- $\mu$ m pore size membranes to eliminate particulate material and stored at 4°C to avoid microbial growth. SPE was performed with 500 mL aliquots of the diluted filtered wastewater effluent and dd-H<sub>2</sub>O spiked with an appropriate amount of the mix steroid working solution and surrogate ([<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-E<sub>2</sub>). The IS ([<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-EE<sub>2</sub>) was added after the elution step. The SPE cartridges were conditioned with 2  $\times$  3 mL of MeOH followed by 2  $\times$  3 mL of dd-H<sub>2</sub>O. Samples were loaded on the cartridge column at a flow rate of 2-3 mL/min by applying negative pressure using a mechanical pump. After the loading step, the cartridges were air-dried at maximum pressure (7 kPa). The steroid hormones were eluted twice with 3 mL of MeOH into conical-bottom centrifuge tubes. The eluates were evaporated to total dryness under a gentle stream of nitrogen at 40°C with a nine-port Reacti-vap unit from Pierce (Rockford, IL) and then reconstituted to 300  $\mu$ L with ACN/H<sub>2</sub>O (2:1 v/v) for LDTD/APCI-MS/MS analysis.

### 2.2.3 LDTD-APCI-MS/MS

Ionization of steroid hormones was achieved with the LDTD/APCI ionization source, developed and manufactured by Phytronix Technologies (Québec, QC, Canada), mounted on a Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) for analyte detection. Samples were first spotted (1-10  $\mu$ L) into the LazWell 96-well polypropylene plate cavities containing inserts made of proprietary stainless steel alloy with an appropriate solvent and then left to dry at room temperature. The designed well



shape allows the sample to concentrate in the heating zone while drying. The loaded plate is then transferred to an X-Y moveable stage of the LDTD housing unit. Upon operation, a glass transfer tube is inserted into a well by an air-powered piston to avoid any sample loss. An infrared (IR) laser diode (980 nm, 20 W, continuous) is then focalized to impact the back of the inserts, thermally desorbing the dried sample, which is vaporized into the gas phase (see the Supporting Information for the LDTD/APCI source principles). The uncharged analyte molecules travel along the transfer tube by a carrier gas (medical grade purified air) to eventually reach the corona region for ionization by APCI and then transferred to the MS inlet.

The LDTD/APCI sample optimization for MS and MS/MS conditions in negative ionization mode (NI) and positive ionization mode (PI) was performed by depositing 2  $\mu$ L of the standard steroid hormone of interest; the IS and surrogate were at a concentration of 2 mg/L in the well plate inserts and are presented in Supporting Information **Tableau 2S-1**. The LDTD/APCI source parameters were set to the following values: corona discharge voltage of 5000 V in PI mode and 5500 V in NI mode, a carrier gas temperature of 50 °C, a sheath gas and auxiliary gas set at 0 for both modes and the ion transfer tube was set at 350 °C for both modes. Physical parameters of the LDTD/APCI source were optimized to improve signal intensity of spiked aliquots of wastewater effluent in order to account for matrix effects and include solvent choice for analyte deposition, mass of deposition into plate wells, carrier gas flow, laser power and laser pattern. Analytes were spotted into the sample well once reconstituted in an ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) solution following SPE with a deposition volume of 4  $\mu$ L. Following optimization, carrier gas flow was set at 3 L/min for all selected hormones in both PI and NI mode, except for E3 for which the rate was reduced to 2 L/min while laser pattern programming consisted of a 1 s ramp from 0% to 20%, held for 3 s at 20% before shutting off. The steroid hormones samples were analyzed in three desorption events, i.e., E2, EE2, LEVO, MPROG, NOR and PROG in PI mode, E1, E2 and EE2 in NI mode with a different well for E3 which was analyzed separately in NI mode because of the lower gas flow rate (2 L/min) used.

#### **2.2.4 Data Analysis and Method Validation**

The LD/MS/APCI source was controlled by the LazSoft 4.0 software (Phytronix Inc., Quebec, Qc, Canada). Resulting MS/MS peaks were integrated using the ICIS algorithm of the Xcalibur 1.2 software from Thermo Fisher Scientific. A minimum of two selected reaction monitoring transitions (SRM) were used as well as the relative intensities of their ratios so as to avoid false positives and confirm the presence of the detected steroid hormone. In accordance with the European Commission [299], the SRM ratios were acceptable if for relative intensities greater than 50%, the error was within  $\pm 20\%$  and within  $\pm 50\%$  for relative intensities inferior to 10%. The instrument response was determined as the ratio of the analyte area to that of the isotopically labeled IS.

The recovery values for the SPE method were evaluated at a concentration of environmental relevance, i.e., 50 ng/L, in aliquots of spiked dd-H<sub>2</sub>O containing no wastewater effluent (matrix-free) and in aliquots of the diluted (1:10 v/v) wastewater effluent in dd-H<sub>2</sub>O (in matrix). Extraction recoveries and matrix effects were determined by comparing mean peak areas of the selected steroid hormones spiked prior to extraction in matrix-free samples and matrix-containing samples with those of the selected steroid hormones spiked in postextraction matrix-free samples in triplicates and were reported as percentages. Values below 100% indicate ion suppression, whereas values above 100% represent ion enhancement.

Instrumental limits of detection (ILD) were determined using seven-point, each analyzed in duplicate, internal standard calibration curves in ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) solution free of any effluent wastewater. Method detection limits (MDL) were determined using standard addition calibration curves with four calibration points, analyzed in duplicate, on samples containing diluted effluent wastewater initially spiked at a concentration of approximately 30 ng/L of steroid hormones and an isotopically labeled surrogate before the SPE. The IS was added following the elution step and prior to evaporation at a concentration of 200  $\mu\text{g/L}$ . Three method blank samples (nonspiked wastewater diluted in dd-H<sub>2</sub>O 1:10 v/v) were also added to the SPE procedure. Both ILD and MDL were calculated by multiplying by 3.3 the error on the y-intercept and dividing by the slope of the regression line equations.

Interday and intraday precision were determined for a concentration of 100  $\mu\text{g/L}$  of steroid hormones spiked in diluted effluent wastewater following SPE. Intraday precision

was calculated as the relative standard deviation (RSD) in percentage of the steroid hormone to IS peak area ratio from then replicates. The interday precision ( $n = 10$ ) was determined by combining the results of this process over 2 consecutive days.

The Statistical Package for Social Science (SPSS 13.0, Chicago, IL) for windows, ANOVA test was used to compare the signal intensities for the optimization of the LDTD/APCI physical parameters and we performed the Tukey's b test as post hoc test. Statistical significance was defined as a P value  $<0.05$ .

## **2.3 Results and discussion**

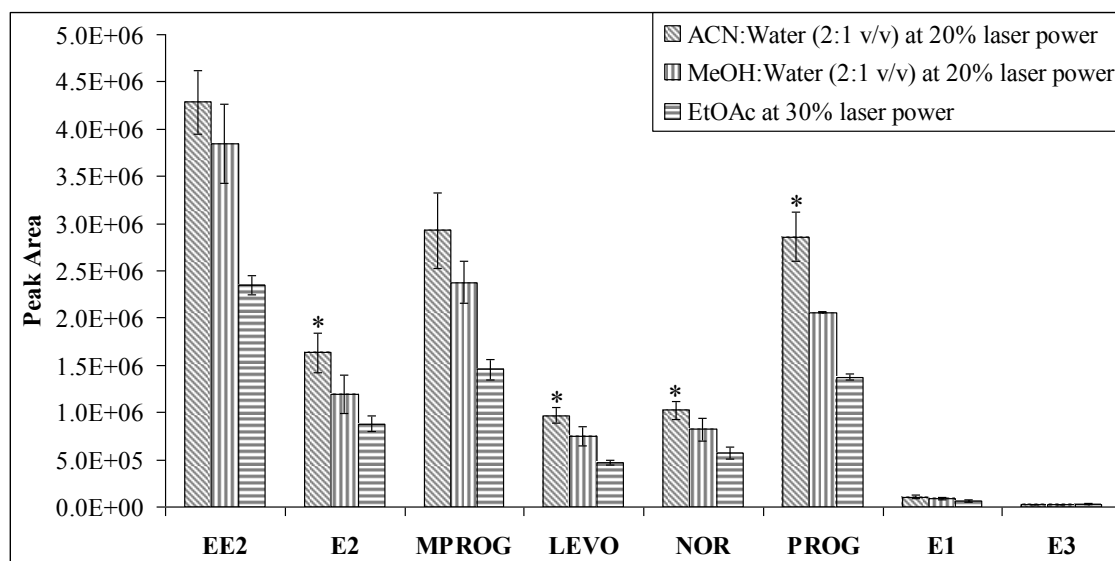
### **2.3.1 LDTD/APCI Physical Parameters Optimization**

The LDTD/APCI physical parameters must be optimized to improve signal intensity. Aliquots of wastewater effluent were spiked at a concentration of 2 mg/L to account for matrix effects and samples were analyzed in triplicate.

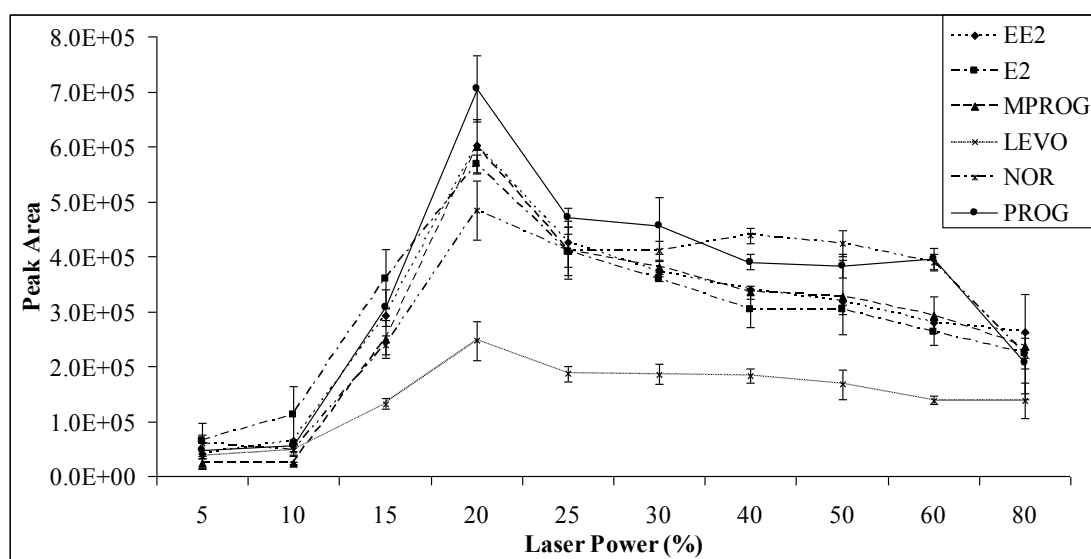
The LDTD/APCI source produces precursor ions or structure-specific ions upon desorption that are characteristic of the analyte molecules and essential for compound identification in complex matrixes. This is achieved by utilizing rapid sample heating in order to provide sufficient energy to the sample molecules, allowing for vaporization of the intact molecules while minimizing fragmentation. Rapid sample heating is based on a kinetic competition between the temperature dependencies of vaporization (dissociation of intermolecular bonds) and molecular decomposition (dissociation of intramolecular bonds) processes [289] and can be applied to thermally unstable compounds, such as the steroid hormones used in this study that would normally require a derivatization step, or nonvolatile compounds. The heating rate of the LDTD laser is  $3000^{\circ}\text{C}/\text{s}$  which allows the samples to be quickly heated at high temperatures, minimizing the time spent in the decomposition region and favoring vaporization which generates a greater amount of the uncharged molecular species. The actual working temperatures are usually between  $100$  and  $150^{\circ}\text{C}$ . Volatilization is also a function of the thickness of the crystal film that forms once the analytes have been

deposited into the sample wells and left to dry (1 to 3 min) prior to laser desorption. Previous studies have confirmed that the effective melting temperatures of nanocrystals (whether it is for metals, inert gases and molecular crystals) can be significantly lowered in relation to their decreasing size compared to the bulk melting point [284, 285]. This phenomenon could be related to the adequate dispersal of nanocrystals onto the plate well surface upon drying, which would reduce surface-molecule interactions due to poor affinity between the stainless steel alloy well surface and the analytes as well as molecule-molecule interactions compared to bulk material. Consequently, the temperature needed to overcome the bonding energies and allow for volatilization is below the bulk melting point. This suggests that for a given product, if decomposition is favored before melting can occur in the bulk state, it can still be analyzed using the LDTD/APCI source. Therefore, optimization of the type of solvent in combination with the energy (laser power) needed to vaporize our compound is done simultaneously.

The solvent used for analyte deposition should have a surface tension superior to 27 mN/m to prevent the sample droplet to flow outside the designed cavity of the sample well. **Figure 2-1** compares the peak intensity of the eight selected steroid hormones for three different solvents used for analyte deposition at their respective optimal laser desorption setting, i.e., ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) at 20% laser power, MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) at 20% laser power and pure ethyl acetate (EtOAc) at 30% laser power. The ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) solution gave significantly higher ( $P < 0.05$ ) peak area intensities with RSD under 15%, for four out of the eight selected steroid hormones and therefore was the preferred solution used for analyte deposition into the well cavity for the rest of the experiments. The optimal laser power was determined to be 20% (**Figure 2-2** and Supporting Information **Figure 2S-2**) for ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) as a deposition solvent in both PI and NI mode according to statistically higher ( $P < 0.05$ ) peak intensity associated with low signal variability (RSD < 15%). The only exceptions were EE2 and E1 in NI mode (Supporting Information **Figure 2S-2**) where both 15% and 20% were statistically alike, but 20% was chosen to have a single method for all steroid hormones in NI mode. Working above the optimal laser power resulted in ion suppression by thermal fragmentation of the neutral species due to elevated desorption temperature whereas at under 20% the desorption temperature was not sufficient to completely volatilize the steroid hormones.

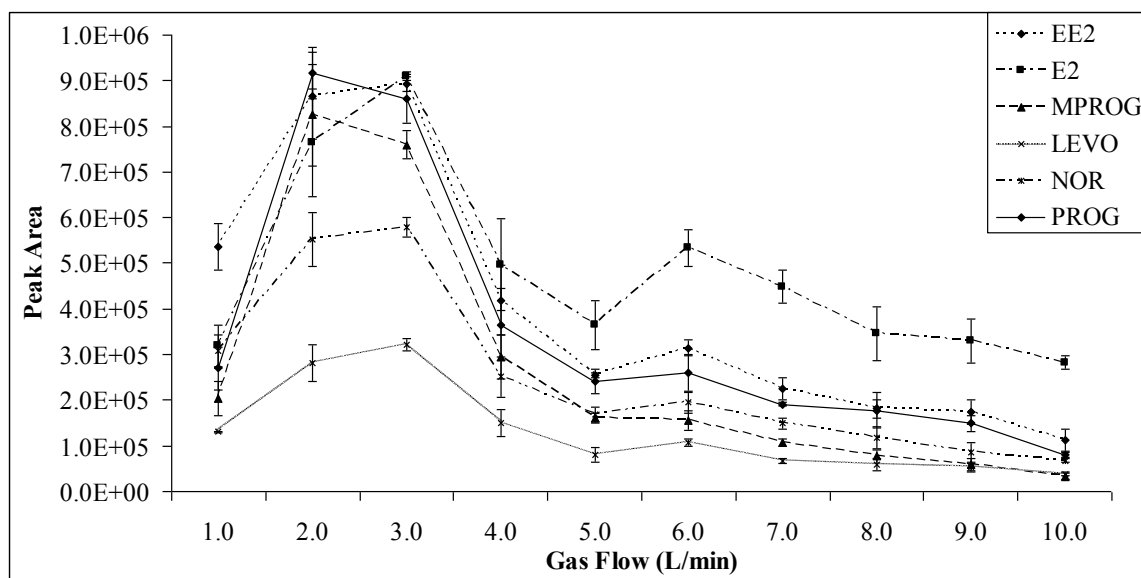


**Figure 2-1** LDTD/APCI optimization of three different solvent solutions with their corresponding respective optimum laser power, ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) and MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) both at 20% laser power and pure EtOAc at 30% laser power, used for analyte deposition in plate well. The concentration used was 2 mg/L. ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) was determined to be the solvent of choice with four out of the eight hormone steroids having a significantly higher ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) peak area intensity represented by a star symbol (\*) than with MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1 v/v) or pure EtOAc in both PI and NI mode.



**Figure 2-2** Positive ionization mode (PI) maximum peak intensity for a concentration of 2 mg/L was observed at a maximum 20% laser power for all selected steroid hormones and was significantly different from other laser power ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ).

Carrier gas flow was optimal between 2 and 3 L/min (**Figure 2-3** and Supporting Information **Figure 2S-3**) and gave significantly higher peak area response ( $P < 0.05$ ) in both PI and NI mode. However, a gas flow of 3 L/min provided the best signal-to-noise ratio combined with small signal variability (RSD  $< 10\%$ ) than to 2 L/min. The only exception was E3 in NI (Supporting Information **Figure 2S-3**), a more polar steroid than the others, for which we used a gas flow of 2 L/min.

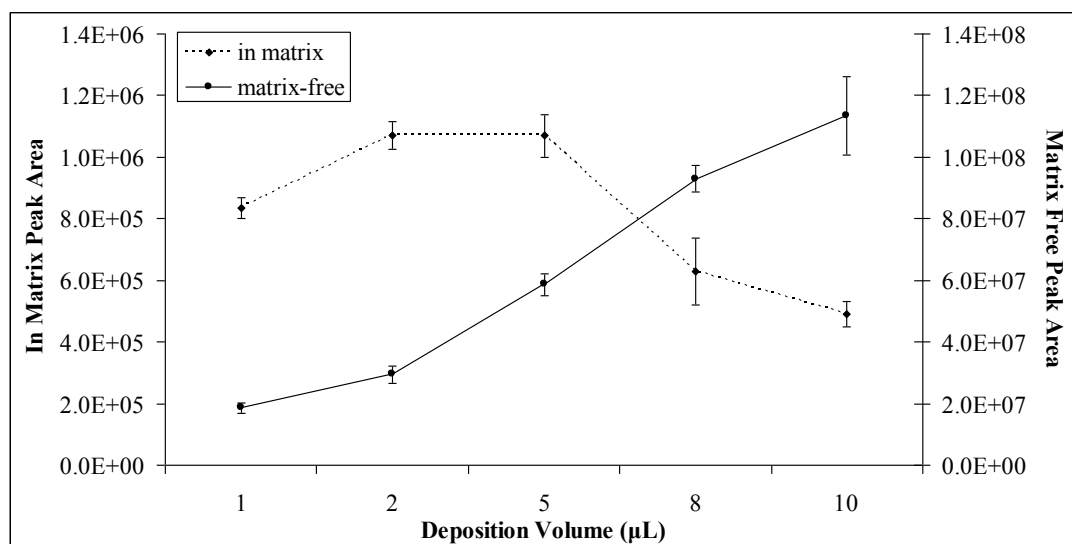


**Figure 2-3** Carrier gas flow was optimal between 2 and 3 L/min and gave significantly higher peak area response ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) in PI mode. A gas flow of 3 L/min provided the best signal-to-noise ratio combined with small signal variability (RSD  $< 10\%$ ;  $n = 3$ ).

The deposition volume will influence the amount of material loaded into the sample well and could affect the effectiveness of the APCI by either ionic suppression by proton affinity competitiveness or by trapping the compounds into nonvolatile matrix products, thus limiting the signal intensity. Indeed, one way of increasing sensitivity and improve the MDL is to enhance the signal by adding more sample, therefore more analyte, into the sample well cavities. **Figure 2-4** demonstrates the effect of deposition volume on peak area intensities for PROG in PI mode and illustrates ionic suppression as seen for the remaining selected steroid hormones. As expected, the peak areas of PROG progressively increase with increasing deposition volume when no matrix (effluent wastewater) is added to the samples, whereas a

lower peak area response is observed for a deposition volume superior to 5  $\mu\text{L}$  when matrix is introduced with the sample for a given concentration.

The laser pattern programming that gave the maximum peak area intensity with less variability ( $\text{RSD} < 10\%$ ) consisted of a 1 s ramp from 0% to 20% and held for 3 s at 20% before shutting off the laser (Supporting Information **Figure 2S-4**). Increasing holding time past 3 s, up to 9 s, at 20% with the same laser pattern did not improve peak area intensities (results not shown) and would have lengthened the analysis time.



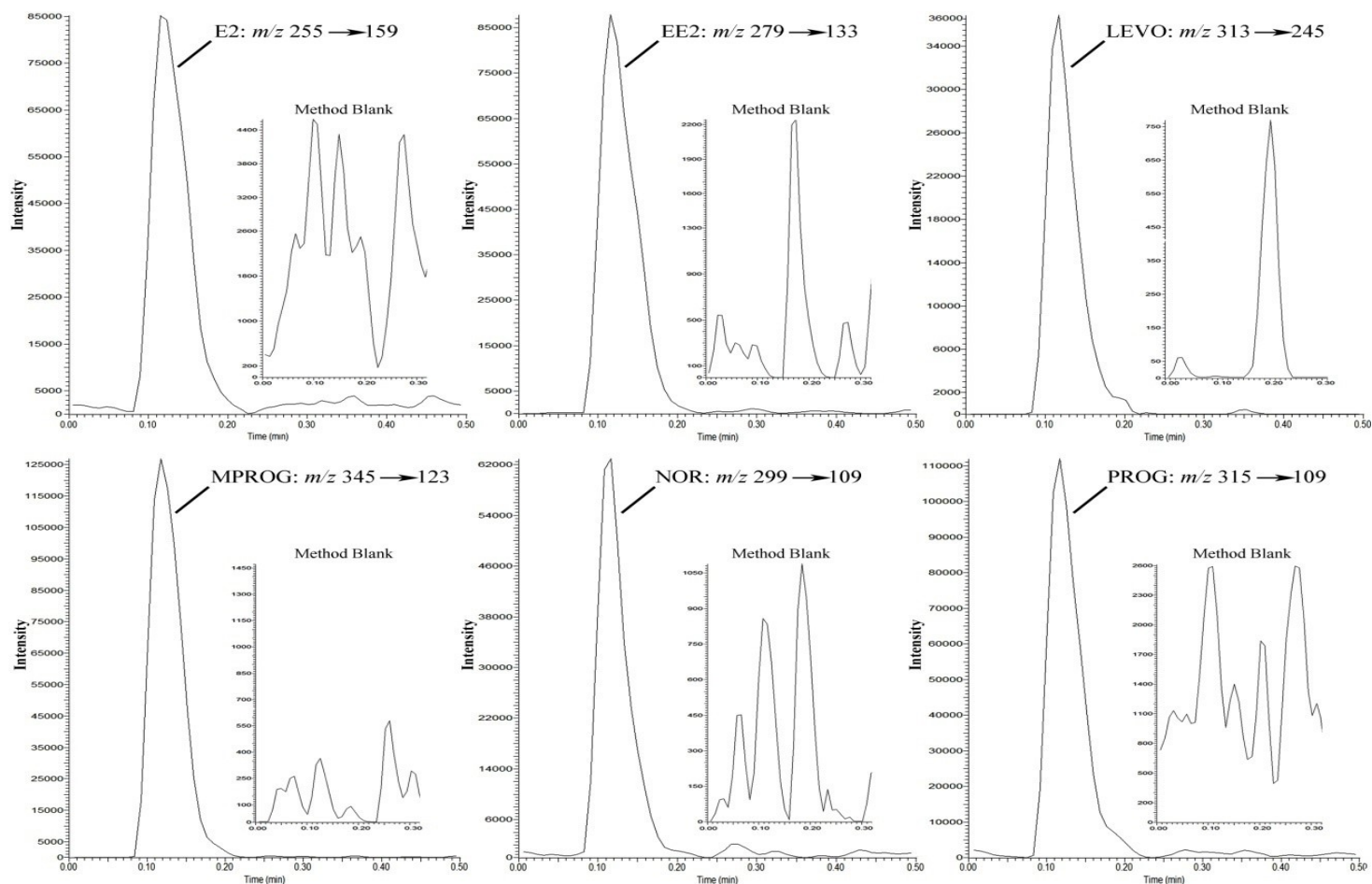
**Figure 2-4** Effect of deposition volume change on method sensitivity and matrix-induced peak area intensity in spiked effluent wastewater matrix compared to intensities in matrix free solvent (ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v)) for PROG in PI mode. In matrix-free solvent, the signal for PROG increases with an increase in deposition volume, while in spiked effluent wastewater matrix, the peak area intensity diminishes significantly for deposition volumes greater than 5  $\mu\text{L}$  at an identical concentration of 2 mg/L.

### 2.3.2 Method Application and Validation.

The LDTD/APCI-MS/MS method with the described optimized physical parameters discussed previously was applied to spiked diluted effluent wastewater at an environmentally relevant concentration of 30 ng/L. The analysis took 15 s per desorption event, with three

desorption events per sample. For a given sample, three plate wells were desorbed, with one well analyzed for six compounds (E2, EE2, LEVO, MPROG, NOR and PROG) in PI mode (**Figure 2-5**), another for three compounds (E1, E2 and EE2) in NI mode, and a third well for the analysis of E3 in NI mode. The third well was analyzed because a lower gas flow rate (2 L/min) was optimal for E3. The total analysis time from well to well was 40 s.





**Figure 2-5** MS/MS spectra of the product ions (SRM) of one desorption event for the lowest concentration calibration point (wastewater, diluted 1:10 v/v in dd-H<sub>2</sub>O and spiked at 30 ng/L) used in the standard addition calibration curves for E2, EE2, LEVO, NOR, MPROG and PROG in PI mode. The method blank mass spectra (inset), representing non-spiked diluted wastewater (1:10 v/v) samples, are also shown to confirm the absence of any peak contribution from non-spiked wastewater and to evaluate the average background noise.

The samples were concentrated using SPE and gave good extraction recoveries for a concentration of 50 ng/L (Supporting Information **Figure 2S-5**) ranging from 84% to 111% in matrix-free (pure water) samples and from 77% to 121% in spiked effluent wastewater (in matrix) samples for all selected steroid hormones with RSD inferior to 20% in all cases.

Adequate calibration curves were produced with good linearity (**Tableau 2-1**) even for low concentrations in matrix-free solvent (internal calibration) with a linearity range of 9-915 µg/L and in spiked effluent wastewater (standard addition calibration) with each calibration point analyzed in duplicate and the unknown in triplicate. The coefficients of determination ( $R^2$ ) were excellent with values ranging from 0.9986 to 0.9999 for internal calibration in matrix-free samples and from 0.9950 to 0.9997 for standard addition for sample containing wastewater effluent. Instrumental limits of detection and method detection limits calculated from the calibration curves were from 6 to 24 µg/L and 13 to 42 ng/L, respectively (**Tableau 2-1**). The resulting MDL are comparable to several other analytical methods applied to steroid hormones, including online SPE coupled to LC-MS/MS [253, 300] and off-line SPE methods using GC/MS [301].

**Tableau 2-1** Linearity (Coefficient of Determination), Sensitivity, Instrumental Limits of Detection (IDL) and Method Detection Limits (MDL) of the LDTD/APCI-MS/MS Method for the Selected Steroid Hormones in Negative (NI) and Positive (PI) Ionization Modes.

Compound	Ionisation Mode	Matrix-free				In matrix		
		Linearity range (µg/L)	Sensitivity	$R^2$	ILD (µg/L)	Sensitivity	$R^2$	MDL (ng/L)
E1	NI	9 - 684	0.0421	0.9999	9	0.0129	0.9984	30
E2	NI	18 - 588	0.0084	0.9998	10	0.0030	0.9972	36
	PI	18 - 588	0.0384	0.9995	5	0.0035	0.9997	13
E3	NI	80 - 749	0.0038	0.9986	24	0.0016	0.9977	30
EE2	NI	39 - 915	0.0062	0.9993	17	0.0019	0.9946	42
	PI	57 - 915	0.0178	0.9990	8	0.0024	0.9988	14
LEVO	PI	47 - 780	0.0128	0.9990	11	0.0025	0.9965	20
MPROG	PI	35 - 677	0.0630	0.9990	6	0.0098	0.9964	30
NOR	PI	41 - 634	0.0144	0.9989	9	0.0031	0.9950	25
PROG	PI	21 - 670	0.0320	0.9995	6	0.0080	0.9971	18

Precision measurements were acquired for each compound and were satisfactory (**Tableau 2-2**). The intraday precision was better than 14% for all the analytes (n = 10)

whereas the interday precision was better than 15% for all the analytes except for EE2 in NI mode which was at 17% (n = 10). The impact of cross-contribution from the isotopic patterns of steroid hormones with a two mass unit difference, i.e., E2 with E1 in NI mode, LEVO with PROG in PI mode and E2 or EE2 with their isotopically-labeled counterparts (surrogate and IS), was considered insignificant (less than 5% in all cases) and did not affect accuracy (% bias, **Tableau 2-2**).

Method applicability to concentrations naturally found in environmental matrices has been demonstrated. The complete procedure, SPE followed by LDTD/APCI-MS/MS, was tested with success (**Tableau 2-2**) to the spiked wastewater effluents aliquots at 30 ng L<sup>-1</sup> with bias under 20% for all selected steroid hormones except for E1 in NI mode and LEVO in PI mode at 21% and 23%, respectively. Nonspiked wastewater effluent aliquots (n = 3) were also analyzed as method blanks (**Figure 2-5**) to confirm the absence of any peak contribution from non-spiked wastewater diluted 1:10 v/v in dd-H<sub>2</sub>O.

**Tableau 2-2** LDTD/APCI-MS/MS Analysis of Known Amounts of Selected Steroid Hormones Spiked Diluted Wastewater Effluent Samples with Associated Bias Values along with Method Intraday and Interday Precision in Negative (NI) and Positive Ionization Modesa.

Compound	Ionisation mode	Method application in matrix			Precision	
		Amount added (ng/L)	Amount found (ng/L)	Bias (%)	intra-day RSD (%)	inter-day RSD (%)
E1	NI	31.5	38 ± 4	21	9	14
E2	NI	33.5	37 ± 2	9	13	15
	PI	33.5	31 ± 2	7	6	7
E3	NI	34.2	35 ± 4	1	9	14
EE2	NI	33.9	39 ± 8	15	14	17
	PI	33.9	29 ± 2	15	4	5
EE2-13C <sub>2</sub>	NI	30.0	35 ± 5	17	n.a	n.a
	PI	30.0	28 ± 2	8	n.a	n.a
LEVO	PI	38.5	30 ± 2	23	9	13
MPROG	PI	32.4	27 ± 2	17	7	10
NOR	PI	35.3	28 ± 3	20	5	15
PROG	PI	32.2	30 ± 3	7	7	10

<sup>a</sup>Means values of triplicate analysis given with standard deviations for the amounts found

## 2.4 Conclusion

We have demonstrated the different optimization and operation parameters for the LDTD/APCI-MS/MS, a simple, sensitive, rapid and reliable method which allows for high-throughput sample analysis and quicker data generation. These parameters included optimal solvent used for analyte deposition into the sample well cavities determined to be a solution of ACN/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v), desorption laser power which was set at 20%, and carrier gas flow set from 2 to 3 L/min, and maximum deposition volume (5 µL) which will be dependent on matrix complexity and cleanup procedures. The determination of eight steroid hormones, spiked at 30 ng/L in diluted effluent wastewater, was done to confirm the applicability of the method in real environmental samples, with simple sample preparation (SPE using Strata-X) with recoveries ranging from 77% to 112% with RSD under 20%, followed by quantification using the LDTD/APCI-MS/MS system. Calibration curves were linear, with  $R^2 > 0.99$  for all steroid hormones in both PI and NI mode and the resulting precision variation (intraday and interday) was less than 20%. Method detection limits ranged from 13 to 42 ng/L and were in agreement with several published methods on steroid hormones. The analysis time is achieved in only 40 s from sample to sample compared to minutes for traditional LC-MS/MS methods by eliminating the chromatography step and therefore also reducing the cost and environmental impact related to column and solvent consumption.

## 2.5 Acknowledgments

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

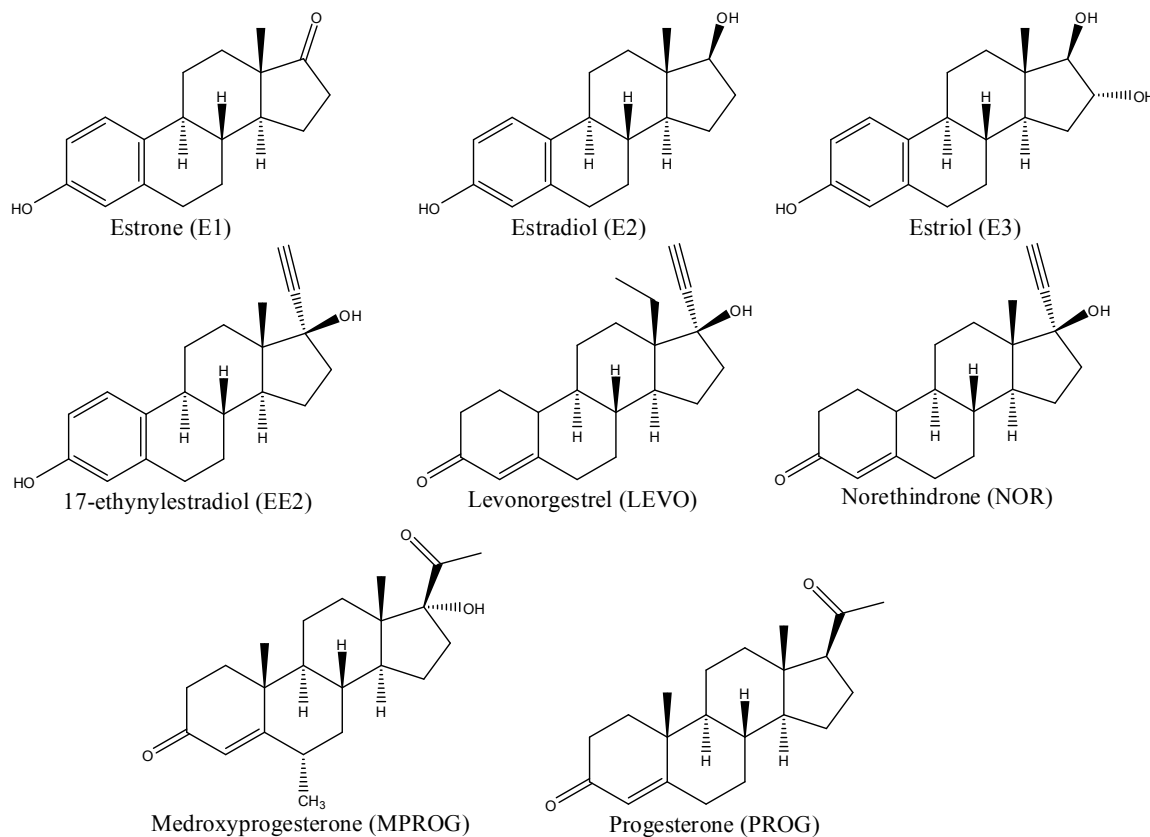
## **2.6 Supplementary material**

## 2.6.1 Principles of the LDTD/APCI Source

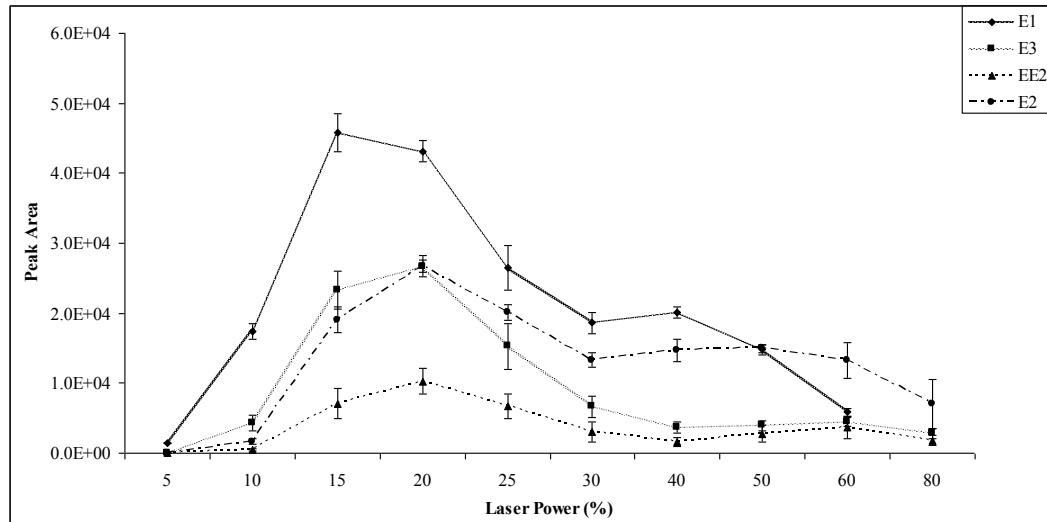
The Arrhenius plots comparing the logarithm of the kinetic rates of the temperature dependencies of vaporization (dissociation of intermolecular bonds) and molecular decomposition (dissociation of intramolecular bonds) against the inverse temperature ( $1/T$ ) would identify an intersection point at some value of  $1/T$ , above which the vaporization of the uncharged molecular species would be favored and below which decomposition would be observed [288, 289, 302]. The heating rate of the LDTD laser is  $3000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  which allows the samples to be quickly heated at high temperatures, minimizing the time spent in the decomposition region and favoring vaporization which generates a greater amount of the uncharged molecular species.

The characterization of the thermal desorption processes associated with rapid sample heating and thin film deposition for the LDTD/APCI source have been shown on prednisone, a corticosteroid steroid hormone, that decomposed at a temperature of  $234^{\circ}\text{C}$  but was fully analyzed by LDTD/APCI-MS/MS at a desorption temperature of  $170^{\circ}\text{C}$ . Also sulfadiazine, a sulfonamide antibiotic, shows a desorption temperature observed between  $95^{\circ}\text{C}$  and  $140^{\circ}\text{C}$  though its bulk melting point is  $252\text{-}256^{\circ}\text{C}$  [283]. Unlike traditional LC/APCI, the LDTD/APCI ionization is performed in the absence of solvent reacting molecules as no liquid phase is introduced into the corona discharge region. Similarly to classical chemical ionization, the species present in the APCI region of the LDTD originate from gas-phase reactions involving proton transfer, governed by proton affinity in positive mode (PI) and gas-phase acidity in negative mode (NI), as well as charge exchange [303]. The solvent used for analyte deposition in LDTD/APCI will not induce signal suppression due to competition for protonation as can be the case in classical LC/APCI mobile-phase components [270, 304, 305]. In the absence of any mobile phase, it is the water traces in the carrier gas that will generate ionization in LDTD/APCI, since proton transfer in the PI mode mostly occurs between water cluster,  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$  where  $n = 0\text{-}4$  [306], and more basic analytes (higher proton affinity). Higher efficiency protonation in LDTD/APCI is accomplished in the presence of the smallest hydronium species because of their low proton affinity, i.e.  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $(\text{H}_2\text{O})\text{H}_3\text{O}^+$ . Larger water clusters will form when the humidity (water saturation) in the

ionization region is increased and negatively impact the analyte ionization process [307]. The larger hydronium cluster, with higher proton affinity, will affect sensitivity towards low proton affinity molecules and decrease their fragmentation because of an excess of energy in protonation reactions [308]. The main advantage of using APCI with the LDTD is that it is less susceptible to matrix effects and ionization suppression than with electrospray ionization [309].

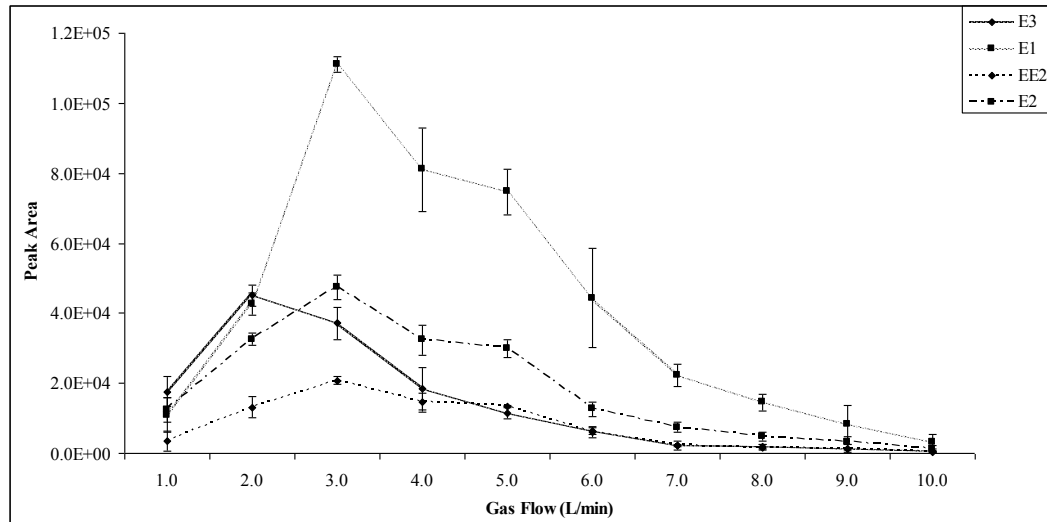


**Figure 2S- 1** Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms.

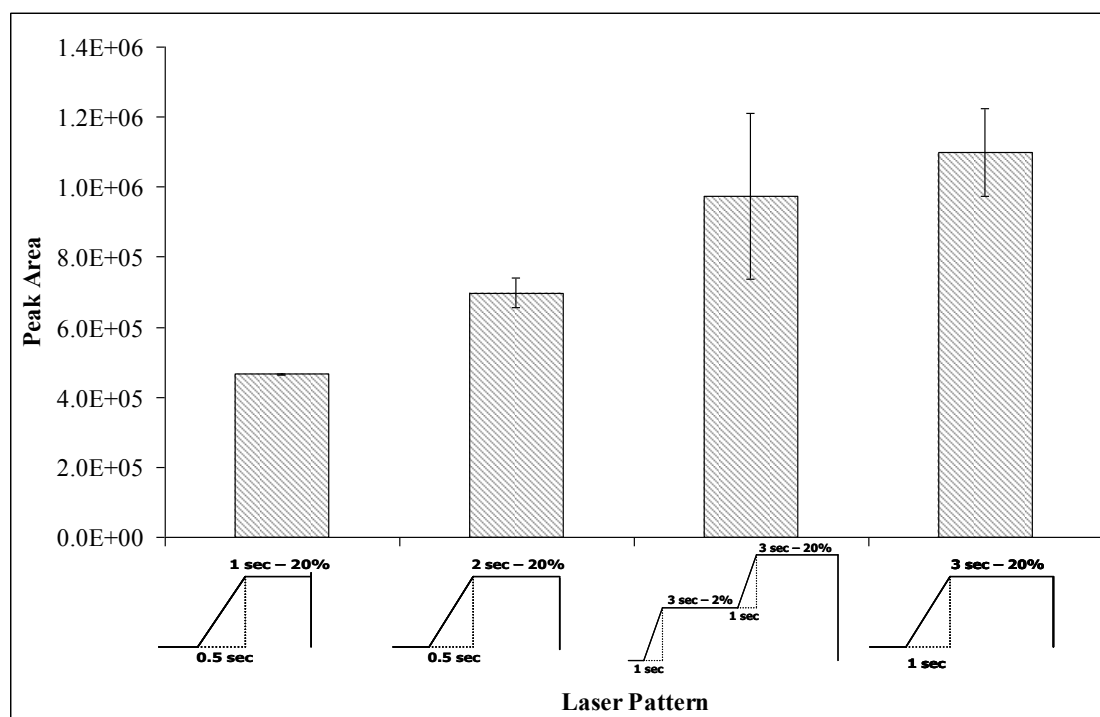


**Figure 2S- 2** Negative ionization mode (NI) maximum peak intensity for a concentration of 2 mg/L was observed at a maximum 20% laser power for steroid hormones EE2 and E2 and was significantly different from other laser power ( $n = 3$ ;  $P < 0.5$ ). The optimum laser power for E1 was 20% and 25%, whereas for E3 it was 15% and 20%, which were not statistically different from each other in both cases ( $n = 3$ ;  $P > 0.5$ ). A laser power of 20% was chosen in NI mode, in order to have a single method applicable to all selected compounds and because it was common to all four selected steroid hormones.

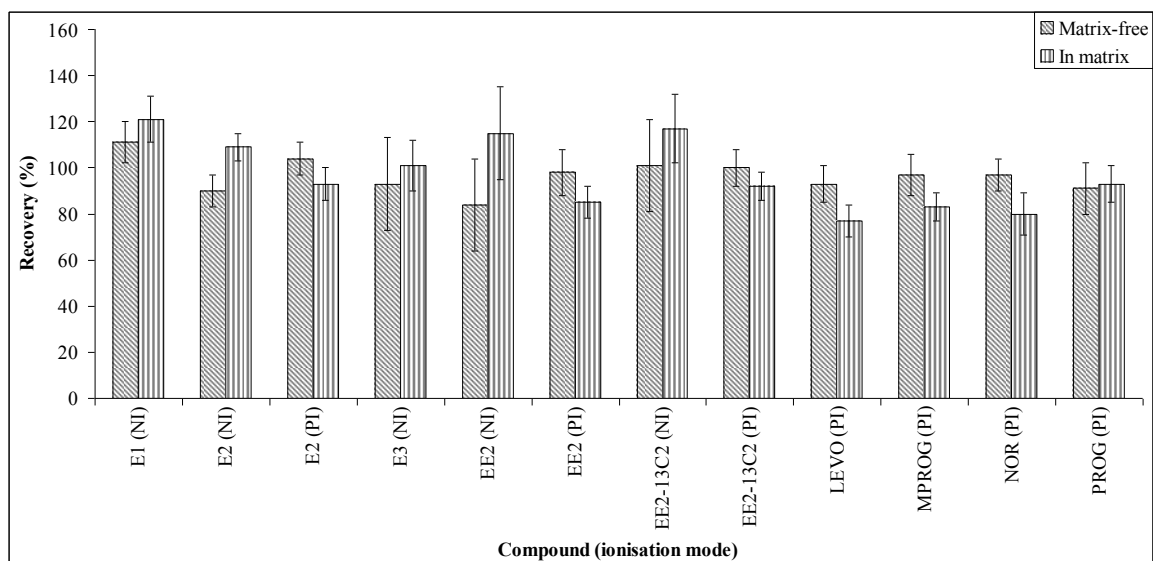




**Figure 2S- 3** Carrier gas flow was optimal between 2 to 3 L/min and gave significantly higher peak area response ( $n = 3$ ;  $P < 0.5$ ) in NI mode. A gas flow of 3 L/min provided the best signal-to-noise ratio combined with small signal variability ( $RSD < 10\%$ ;  $n = 3$ ). Estriol (E3) was the only exception with an optimal gas flow of 2 L/min.



**Figure 2S- 4** Four different laser patterns ( $n = 3$ ) were used and compared for PROG in PI mode. The optimal conditions giving the maximum peak area intensity and good variability ( $RSD < 10\%$ ) for desorption laser power and patter consisted of a 1 s initial ramp from 0 to 20% and held for 3 s at 20% before shutting off.



**Figure 2S- 5** Recovery values ( $n = 3$ ) for matrix-free (pure water) and in matrix (spiked effluent wastewater) samples at 50 ng/L in both NI and PI modes using Strata-X SPE cartridges for all selected steroid hormones including IS and surrogate.

**Tableau 2S - 1** MS/MS Parameters for the Analysis of Selected Steroid Hormones Analytes in Both Negative (NI) and Positive (PI) Ionization Mode.

Compound	Ionisation mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Relative intensity ratio <sup>a</sup> (%)	TL (V)	CE (eV)
E1	NI	269 [M-H] <sup>-</sup>	143	45 ± 6	-84	57
			145	100	-84	41
E2	NI	271 [M-H] <sup>-</sup>	143	51 ± 13	-74	47
			145	66 ± 20	-74	37
			183	100	-74	49
	PI	255 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	31 ± 3	68	18
			144	21 ± 3	68	40
			159	100	68	19
E2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	NI	273 [M-H] <sup>-</sup>	145	57 ± 9	-67	61
			147	82 ± 12	-67	43
			185	100	-67	47
	PI	257 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	135	52 ± 5	65	17
			146	22 ± 1	65	37
			161	100	65	16
E3	NI	287 [M-H] <sup>-</sup>	143	67 ± 12	-97	54
			171	100	-97	40
EE2	NI	295 [M-H] <sup>-</sup>	143	63 ± 12	-82	70
			145	100	-82	45
			183	58 ± 13	-82	44
	PI	279 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	100	46	16
			159	69 ± 11	46	20
EE2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	NI	297 [M-H] <sup>-</sup>	143	72 ± 15	-74	43
			145	100	-74	43
	PI	281 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	100	48	23
			159	22 ± 6	48	22
LEVO	PI	313 [M+H] <sup>+</sup>	109	83 ± 19	64	27
			185	45 ± 8	64	20
			245	100	64	18
MPROG	PI	345 [M+H] <sup>+</sup>	97	26 ± 4	74	23
			123	100	74	25
NOR	PI	299 [M+H] <sup>+</sup>	91	85 ± 16	69	35
			109	100	69	26
PROG	PI	315 [M+H] <sup>+</sup>	97	98 ± 17	65	20
			109	100	65	24

<sup>a</sup> The most abundant product ion was used for quantification whereas the other product ions were used for to confirm the presence of the steroid hormones.

## **Chapitre 3 Méthode automatisé de pré-concentration couplée à la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse d'hormones stéroïdiennes dans les eaux usées urbaines**

---

On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters

Paul B. Fayad, Michèle Prévost and Sébastien Sauvé, 2013

*Talanta* 2013, 115 : 349-360.

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche: J'ai effectué les expériences, réalisé les analyses et l'interprétation des données.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires des Profs. Prévost et Sauvé, mes directeurs de thèse.

## Abstract

An analytical method based on on-line SPE-LC-APCI-MS/MS has been developed for the detection and quantification of eight selected estrogenic and progestagenic steroid hormones; estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), levonorgestrel (LEVO), medroxyprogesterone (MEDRO), norethindrone (NORE) and progesterone (PROG) in wastewater matrices. The injection volume could range from 1 to 10-mL according to the expected concentration of steroid hormones in matrix. The method characteristics are: analysis time per sample (< 15 min), acceptable recovery values (71-95%), good precision (RSD $\leq$ 10%) and limits of detection at the low-nanogram per liter levels in affluent and effluent wastewaters (8-60 ng L<sup>-1</sup>). In particular, a detailed discussion of optimization parameters impacting overall performance of the method has been presented (sample collection, filtration and storage). All optimization and validation experiments for the on-line SPE method and chromatographic separation were performed in environmentally-relevant wastewater matrices. This method represents a compromise between analysis time, higher sample throughput capabilities, sample volume and simplicity for the analysis of both progestagenic and estrogenic steroid hormones in a single run, with LODs and LOQs sufficiently low to detect and quantify them in environmental wastewater matrices. Thus, the applicability of the method was tested on affluent and effluent wastewaters from two wastewater treatment facilities using different processes (biological and physico-chemical) to evaluate their removal efficiency for the detected steroid hormones.

**Keywords:** Endocrine disrupting compounds; On-line SPE; Liquid chromatography; Mass spectrometry

### 3.1 Introduction

The monitoring of endocrine disrupting compounds (EDCs), such as steroid hormones, in the aquatic environment is progressively becoming a priority for government agencies, regulatory agencies as well as the general public. They originate from naturally-occurring (e.g. normal urine excretion from mammals) and synthetic sources (e.g. oral contraceptives and hormone replacement therapy). Given their strong endocrine-disrupting potency and their occurrence, selected estrogens, progestagens and androgens have been targeted and detected in wastewater, surface water and drinking water [184, 294, 310-312]. With growing populations and increased discharges from wastewater treatment plants (WWTPs), the presence of steroid hormones in surface waters could be cause for concern since conventional treatment methods have proven to be inadequate to sufficiently eliminate them. There is strong evidence that impacts on the reproductive physiology of wildlife populations occur at very low concentrations, i.e. from 0.1 to 1.0 ng L<sup>-1</sup> [84, 85, 313, 314]. Several studies conducted in numerous countries [184, 315](Besse and Garric 3485-94;Auriol et al. 525-39), have shown that WWTP effluents and receiving water bodies contain sufficient amounts of estrogenic and progestagenic compounds to induce harmful effects on fish, with their concentrations varying from sub-ng L<sup>-1</sup> levels to hundreds of ng L<sup>-1</sup> in wastewater samples [315-317]. Therefore, the development of analytical methods able to detect and quantify these steroid hormones is of critical importance.

To date, numerous analytical procedures have been developed to identify and quantitate steroid estrogenic hormones in water matrixes and often include the use of chromatography (liquid or gas) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) [312, 318]. However, gas chromatographic (GC) methods often require labor and time-consuming steps that improve sensitivity, given the low-molecular weight and low volatility of steroid hormones, but these manipulations could induce some loss of analyte. The necessary sample preparation could include complex hydrolysis as well as derivatization reactions [294, 319]. This has led to the development of liquid chromatographic (LC) methods that do not necessitate the use of such sample chemical pre-treatment methods for steroid hormones before sample detection, since analyte volatility and thermolability are not limiting factors. Indeed, a review of the literature (from 1981 to the present, i.e. 64 articles) on steroid hormones [294, 312, 318, 320] shows

that of the methods developed, 70% used LC, 25% use GC while the remaining 5 % used an immunoassay analysis procedure. Pre-concentration and purifying processes, such as solid-phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) are necessary because of matrix complexity and the low-nanogram per liter levels at which steroid hormones have been reported in the aquatic environment [294]. More than half (56%) of all LC methods developed used an off-line SPE sample enrichment process that necessitates the use of 100 to 2000 mL of sample volume, making it a slow, tedious and labor-intensive practice. As a result, the identification and quantification of steroid hormones can be time consuming, costly and often result in slow turnover and parsimonious environmental sampling strategies. The concept of on-line SPE where all the steps (conditioning, sample enrichment, wash and elution) involved in the off-line method are integrated into an automated procedure was first introduced in the mid 1990s [321]. This on-line SPE approach, is quicker, allows for reduced sample size, handling and preparation, improved reproducibility, higher sample throughput as well as less waste and solvent consumption.

Only two articles [98, 252] have developed an on-line method by LC-MS/MS that include both estrogens and progestagens in the same analytical run, with the use of a 1 to 5 mL injection method with limits of detection (LODs) ranging from 0.3 to 50 ng L<sup>-1</sup>. The others [300, 320, 322-325] have focused on estrogens (including androgens and other analytes of interests) using injection volumes between 1 and 500 mL with LODs between 0.01 and 6.8 ng L<sup>-1</sup>. Analysis time varies significantly for the proposed methods, with the longest between 25 and 65 min and the others ranging from 10 to 17 min. Also, method validation parameters have not always been clearly defined. Indeed in one study [252], the LODs and limits of quantifications (LOQs) were determined in Milli-Q water with the measured concentrations in wastewater samples for estrogens being lower than the reported linearity range. In another work [98], the LODs were determined in river water while the calculated concentrations were reported in wastewater or surface matrices and the LOQ values were not reported for the steroid hormones analyzed. Finally, sample collection, storage and pre-treatment are not discussed in the majority of the methods and could have a significant impact on the reported results.

Our objectives in this study is to optimize and apply an on-line tandem SPE-LC-MS/MS method for the determination of eight selected hormones in water, i.e. estrogens (estriol,



estradiol, estrone and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol) and progestagens (progesterone, levonorgestrel, medroxyprogesterone and norethindrone). We aim to validate the method starting with sample collection, filtration and storage, up to the on-line pre-concentration followed by LC-MS/MS detection. A proposed method for the determination of LODs and LOQs according to the product ions will be used in order to consider both SRM transitions for the quantification and detection of selected steroid hormones. Their determination at low-nanogram per liter levels in affluent and effluent wastewater was done to confirm the applicability of the method in real environmental samples.

## 3.2 Experimental

### 3.2.1 Chemicals, reagents and stock solutions

All selected steroid hormone standards (purity  $\geq 97\%$ ); estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), levonorgestrel (LEVO), medroxyprogesterone (MEDRO), norethindrone (NORE) and progesterone (PROG) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) and are illustrated in **Figure 4S -1**. Isotopically-labeled estradiol, [ $^{13}\text{C}_2$ ]-E2 was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) and used as internal standard (IS). Individual stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1000 mg L $^{-1}$  and kept at -20°C for a maximum of six months. A primary mix of steroid hormone working solution was prepared weekly at a concentration of 50 mg L $^{-1}$  by dilution in MeOH of individual stock solutions aliquots. Subsequent working solutions were prepared daily in water to give solutions of desired concentration. All organic solvents and water used for dilutions were of HPLC grade purity from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada).

Analyte-free effluent wastewater samples were generated by maintaining previously collected samples in the laboratory under conditions to favorable to degradation (exposed to light and keep at room temperature) for long periods of time, until the targeted analytes were no longer detectable.

### 3.2.2 Instrumental conditions

The pre-concentration of selected steroid hormone water samples was performed using the Equan<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) system. It consists of a sample delivery system, a dual switching-column array and an LC-MS/MS system. The delivery system comprised an HTC thermopal autosampler manufactured by CTC analytics AG (Zwingen, Switzerland) used for in-loop sample injection and a quaternary pump Accela 600 (Thermo Finnigan, San Jose, CA) used to load the SPE column with the contents of the sample loop. The column switching system was composed of two-position six-port and ten-port valves (VICI<sup>®</sup> Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX) and a quaternary pump Accela 1200 (Thermo Finnigan, San Jose, CA) used for sample elution from the SPE column and separation on the analytical column. The on-line SPE was achieved using two Hypersil Gold aQ (20 mmx2 mm, 12  $\mu\text{m}$  particle size) columns in tandem and chromatographic separation was done with a Hypersil Gold (100 mmx2.1mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particle size) column kept at 55  $^{\circ}\text{C}$ ). All columns were manufactured by Thermo Fisher Scientific (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Ionization of steroid hormones was achieved using the Ion Max API Source mounted on a Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) operated in selected reaction monitoring (SRM) mode for quantification and detection.

#### 3.2.2.1 On-line solid phase extraction and chromatographic conditions

In order to improve signal intensities and method detection limits (MDLs) we tested multiple injection volumes of a 150  $\text{ng L}^{-1}$  mix steroid hormone solution in HPLC water and affluent wastewater, using a 20-mL injection loop. This allowed us to establish the maximum injectable volume without loss of analyte. According to the optimized procedure, a sample loading volume (using a 5-mL syringe) ranging between 1 and 10 mL is possible and adjustable depending on the expected steroid hormone concentrations in the sample matrix. The sample transfer rate (loading speed) from the injection loop to the SPE column was tested between 1.0 and 5.0  $\text{mL min}^{-1}$ , for a concentration of spiked steroid hormones (500  $\text{ng L}^{-1}$ ) in analyte-free affluent wastewater, in order to reduce total analysis time. The maximum sample loading flow rate from the sample loop (10 mL) to the SPE columns was 1.5  $\text{mL min}^{-1}$ .

<sup>1</sup> from the loading pump using water with 0.1% formic acid (FA). Following the sample loading step, the pre-concentration columns were back-flushed and the eluting analytes were transferred using the analytical pump gradient directly through the analytical column using the solvent (MeOH and water with the addition of 0.1% FA – 3.1 min). The on-line SPE and elution gradients are shown in **Tableau 4-1**. To eliminate carryover effects, the 5-mL syringe and the six-port sample loop injection valve were cleaned twice between each injection, during the chromatographic separation step. Initially with a strong cleaning mixture of solvents, i.e. acetonitrile:methanol:isopropanol (1:1:1, v/v/v), and then with HPLC grade water with 0.1% FA. The sampling step, the SPE column conditioning, loading and elution steps as well as the LC-MS/MS analysis are all automated. This configuration allowed for a short total analysis time, i.e. 15 min per sample, using a 10-mL injection loop.

**Tableau 3-1** Valve program, on-line SPE (loading pump) and LC (analytical pump) gradient elution conditions used for the pre-concentration and separation of selected steroid hormones.

	Loading pump (to six-port valve)				Analytical pump (to ten-port valve)				
	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	
on-line SPE loading step	0.00	0	100	1500	0.00	40	60	550	column re-equilibration
loop wash	6.96	0	100	1500	6.96	40	60	550	elution and chromatographic separation
	6.97	100	0	3000	8.45	55	45	550	
SPE column and loop conditioning	10.00	100	0	3000	10.00	75	25	550	column re-equilibration
	10.01	0	100	3000	11.54	85	15	550	
	14.00	0	100	3000	11.55	40	60	550	
					12.00	40	60	550	

### 3.2.2.2 Mass spectrometry

Ionization of steroid hormones was achieved with an APCI source in positive (PI) mode. The initial compound-dependent (tube lens and collision energy) parameters for MS and MS/MS optimization conditions in PI mode were performed by infusion of the standard steroid hormones and the IS at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> with a mobile phase of MeOH (A) and water (B) (50:50, v/v with 0.1% FA) and are presented in **Tableau 4-2**. Once the chromatographic separation was optimized, source-dependent parameters were re-evaluated for the steroid hormones as a function of mobile phase composition at their respective retention times on column. The resulting APCI parameters used to maximize signal intensity

were as follows: capillary temperature (350 °C), vaporizer temperature (490 °C), sheath gas pressure (50 arbitrary units), aux gas pressure (15 arbitrary units), ion sweep gas pressure (0 arbitrary units) and discharge current (5  $\mu$ A). The scan time was adjusted to 0.015 s, giving a minimum of 20 points per peak, the first and third quadrupole (Q1 and Q3) were operated at unit resolution (0.7 Da FWHM), with the second quadrupole (Q2) collision gas pressure set at 1.5 mTorr.

**Tableau 3-2** MS/MS optimized parameters for the analysis of selected steroid hormone analytes in positive (PI) ionization mode.

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Intensity ratio (%)	TL (V)	CE (eV)
E1	271	157	100	91	22
	[M+H] <sup>+</sup>	133	93 $\pm$ 6	91	22
E2	255	159	100	100	16
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	29 $\pm$ 2	100	17
E3	271	157	100	91	22
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	91 $\pm$ 9	91	22
EE2	279	133	100	87	15
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	159	80 $\pm$ 7	87	18
LEVO	313	245	100	103	17
	[M+H] <sup>+</sup>	91	87 $\pm$ 7	103	26
MEDRO	345	123	100	127	22
	[M+H] <sup>+</sup>	97	24 $\pm$ 2	127	18
NORE	299	109	100	114	22
	[M+H] <sup>+</sup>	91	90 $\pm$ 10	114	37
PROG	315	109	100	100	26
	[M+H] <sup>+</sup>	97	98 $\pm$ 5	100	17

### 3.2.3 Data analysis and method validation

All optimization and validation experiments for the on-line SPE method and chromatographic separation were performed in HPLC grade water and analyte-free composite wastewater affluent collected from several wastewater treatment plants (WWTPs)

to mimic environmentally-relevant conditions. The positive identification of target analytes was confirmed by matching chromatographic retention times within  $\pm 2\%$  of those from standard spiked in analyte-free matrix and using a minimum of two selected reaction monitoring transitions (SRM) as well as the relative intensities of their ratios. The most abundant product ion was used for quantification whereas the second most abundant was used for confirmation. In accordance with the European Commission [299], the SRM ratios were acceptable if for relative intensities greater than 50%, the error was within  $\pm 20\%$  and within  $\pm 50\%$  for relative intensities inferior to 10%. Data acquisition was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Resulting MS/MS peaks were integrated using the ICIS algorithm of the Xcalibur 1.2 software from Thermo Fisher Scientific. The instrument response was determined as the ratio of the analyte area to that of the isotopically-labeled IS.

The stability of sampled wastewater was evaluated to determine the maximum acceptable period from sample collection to sample analysis. Analyte-free affluent, effluent and HPLC grade waters were spiked with selected steroid hormones ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and kept in amber glass bottles. The bottles were repeatedly shaken and left to equilibrate for 1-h at room temperature, as it was previously illustrated that sorption was maximal within that time for steroid hormones [107]. The compared working conditions were temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$  versus  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), filtration (non-filtered versus filtered) and time (from 0 to 48 h). The IS was added to the sampled aliquots from each bottle prior to analysis ( $n=2$ ) and their peak area ratios were calculated to evaluate the impact of sample storage conditions and maximum time allowed before sample degradation.

To evaluate the impact of filter material on the retention of the selected steroid hormones in the initial filtration step, several types of filters were tested (all  $0.22 \mu\text{m}$  with a 25 mm diameter except for glass fiber at  $0.3 \mu\text{m}$  with a 47 mm diameter), i.e. cellulose acetate (CA), mixed cellulose ester (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC), polyethersulfone (PES) and glass fiber (GF) obtained from Sterlitech (Sterlitech Corporation, Kent, WA). The solutions were spiked with the selected steroid hormones ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in HPLC grade water and analyte-free filtered affluent wastewater samples that were left to equilibrate overnight at  $4^\circ\text{C}$ , prior to filtration. The resulting filtrate aliquots, with added IS, were analyzed ( $n=4$ ) and their peak area ratios were compared to those of the non-filtered solutions (centrifugation was used for

the non-filtered affluent) of equal concentration to determine recovery values. Recovery values were reported as percentages.

The recovery values and matrix effects for the on-line SPE method were evaluated at two concentration levels, i.e. 100 and 500 ng L<sup>-1</sup>, in spiked HPLC water and analyte-free affluent wastewater. Extraction recoveries were determined in two ways. The mean peak areas (n=5, 100 ng L<sup>-1</sup>) of the selected steroid hormones of, (i) a direct chromatographic injection (25 µL) and, (ii) an on-line small injection (100 µL, with a 100-µL loop) were compared with those of the on-line high volume injection (10 mL) used for the standard sample analysis. The same mass of analyte was injected in all cases. Matrix effects were calculated by comparing peak areas of spiked affluent wastewater to the peak areas found in HPLC water according to a 10-mL injection volume. Recoveries and matrix effect values were reported as percentages.

The limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), linearity, precision and accuracy were determined using a six to eight point calibration curve, analyzed in duplicate, in HPLC water as well as analyte-free effluent and affluent wastewater. These values were evaluated using the complete, optimized, on-line SPE-LC-MS/MS method and therefore represent the validation parameters for the entire analytical process. Method blank samples for each matrix were also added following the highest calibration point to evaluate carryover. For the calibration curve, the back-calculated concentrations (**Tableau 4S-2**) of calibrant standards were acceptable if within 15% of the nominal value, except for the determined LOQ for which a 20% error was deemed satisfactory. The linear calibration range used was tested for homoscedasticity (**Tableau 4S-2**, Breusch-Pagan test, *P* value of 0.05) to confirm the application of the linear least-squares method (constant variance).

The LOQ was measured using the calibration curve corresponding to the most abundant product ion; whereas the LOD was determined using the calibration curve associated with the second most abundant product ion. Both LOD and LOQ were calculated by multiplying by 3.3 and 10 the error on the *y*-intercept and dividing by the slope of the regression line equations, respectively. Once calculated, a test sample was prepared at the LOQ concentration and injected to confirm the expected linearity range.

Precision and accuracy were determined at two concentration levels (QC1 and QC2,  $n=5$ ) of steroid hormones spiked in HPLC water and in analyte-free affluent wastewater. They were calculated as the relative standard deviation (RSD) in percentage of the steroid hormone to IS peak area ratio from the replicates.

The validation process was performed using the criteria from the International Conferences of Harmonization (ICH), more specifically the Q2(R1) guidelines [326]. We used the Statistical Package for Social Science (SPSS 16.0, Chicago, IL), for a Tukey's *b* post hoc ANOVA test to compare the optimization parameters of the method. Statistical significance was reported for *P* value of  $<0.05$  or  $<0.01$  according to number of samples tested.

### 3.2.4 Sample collection, preparation and quantification

Affluent and effluent wastewater samples were collected, in pre-cleaned 1-L amber bottles, from two WWTP facilities in the Greater Montreal Area (Quebec, Canada) using different treatment processes, i.e. WWTP-A and WWTP-B. The WWTP-A uses a physico-chemical treatment approach, whereas the WWTP-B applies a bio-filtration and ultraviolet disinfection process for contaminant removal. A time-proportional sampling mode was chosen, with wastewater samples collected hourly or every half hour between 7:30 am and 11:30 am for each treatment plant. All samples, prior to analysis, were passed through a 0.3- $\mu\text{m}$  pore size glass fiber filter (Sterlitech Corporation, Kent, WA) to eliminate particulate material and stored at 4°C, to avoid microbial growth. Once filtered, the samples could be stored for 48 h before analysis without affecting sample integrity according to our results. No prior treatment of sample matrix was necessary before applying the on-line SPE procedure.

In order to correct for matrix effect, the selected steroid hormones were quantified using four to five point standard addition calibration curves (**Figure 4S-9**), with each calibration point injected twice and the unknown analyzed in triplicate ( $n=3$ ). A least-square linear regression model was applied, with coefficients of determination ( $R^2$ ) required to be greater

than 0.9950 for all analytes, with IS added to all calibration levels, blanks and unknowns prior to analysis.

A summary of the analytical steps, described here in this section and used during method development and validation is presented in **Figure 4S-10**.

### 3.3 Results and discussion

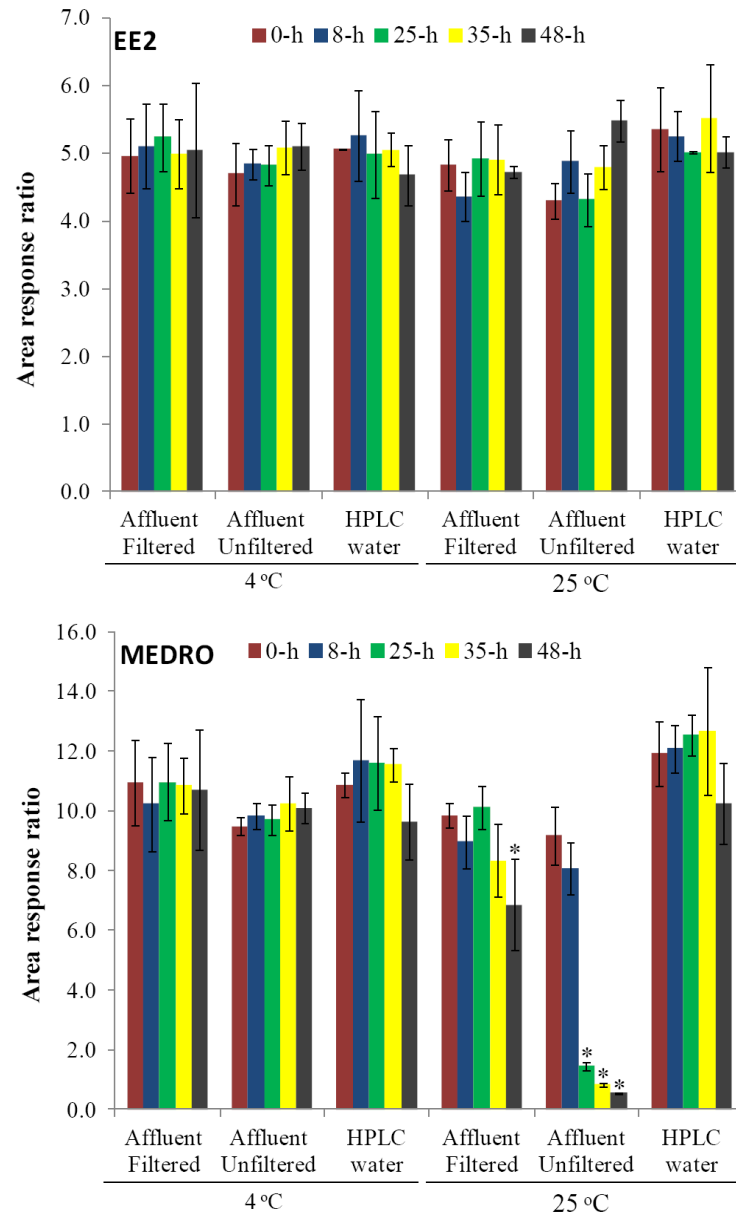
#### 3.3.1 Sample storage and filtration conditions

The stability of the selected steroid hormones in three different water matrices (HPLC grade, effluent and affluent wastewater) was evaluated according to temperature (22 °C versus 4 °C) and filtration conditions (**Figures 4-1 and 4S-2 to 4S-4**). These tests are necessary to guaranty both sample integrity and accuracy of reported concentrations and to provide important information on the permissible delay from the collection of a sample to its analysis. In earlier studies [139, 327-329](Baronti et al. 5059-66;Aboulfadl et al. 10;Vanderford et al. 6265-74;Havens et al. 2481-90)the integrity of steroid hormones in the collected wastewater and river samples relied on the addition of preservation agents, i.e. formaldehyde (1%, v/v), acidic preservatives (sulfuric acid, sodium azide or hydrochloric acid) and solvent addition (MeOH, 2.5% v/v). The addition of preservatives can, however, lead to unwanted secondary reactions, such as the cleavage of conjugated steroid hormones by the addition of acids or desorption from the particulate phase when solvents are used. This could lead to the overestimation of free steroids hormones. Thus, it was necessary to evaluate the recovery values for the selected steroid hormones without the addition of any conservation agents to avoid modifying the nature of the collected samples. The steroid hormones EE2 and MEDRO were chosen to represent both estrogens and progestagens, respectively, as a function of their stability during short term storage (**Figure 4-1**), while the results for the remaining steroid hormones are shown in **Figures 4S-2 to 4S-4**. It was shown that for E3, EE2, LEVO and NORE, there was no statistically-significant differences between the initial (0-h) and the remaining time scheduled samples analyzed in a period of 48 h as a function of: temperature, filtration or water type (n=2;  $P < 0.01$ , with 98 % of all  $RSD \leq 20\%$ ).



At a temperature of 25 °C , only filtered effluent wastewater samples were unchanged as a function of time, for all tested analytes.

The selected steroid hormones were stable for a period of 48 h at 4 °C with no significant differences between filtered and unfiltered samples or the nature of the water, with the exception of PROG at the 8-h mark in unfiltered effluent wastewater at 4 °C (**Figure 4S-3**). Poor recoveries from unfiltered and filtered affluent and effluent water samples were seen for PROG, MEDRO and E2 at 25 °C. These results are in agreement with a previous study [202] for the stability of progesterone in surface and drinking matrices under similar conditions. These losses are attributed to their strong hydrophobic character, with a log  $K_{ow}$  ranging from 3.50 (PROG) to 4.01 (E2) (**Tableau 4S-1**), making them susceptible to interact with suspended and dissolved natural organic matter as well as particulates in solution, with these exchanges being favored at room temperature. Therefore, with these results, sample integrity was not compromised with the addition of preservation agents and it was decided to filter the samples and keep them refrigerated prior to analysis within 48 h of collection.



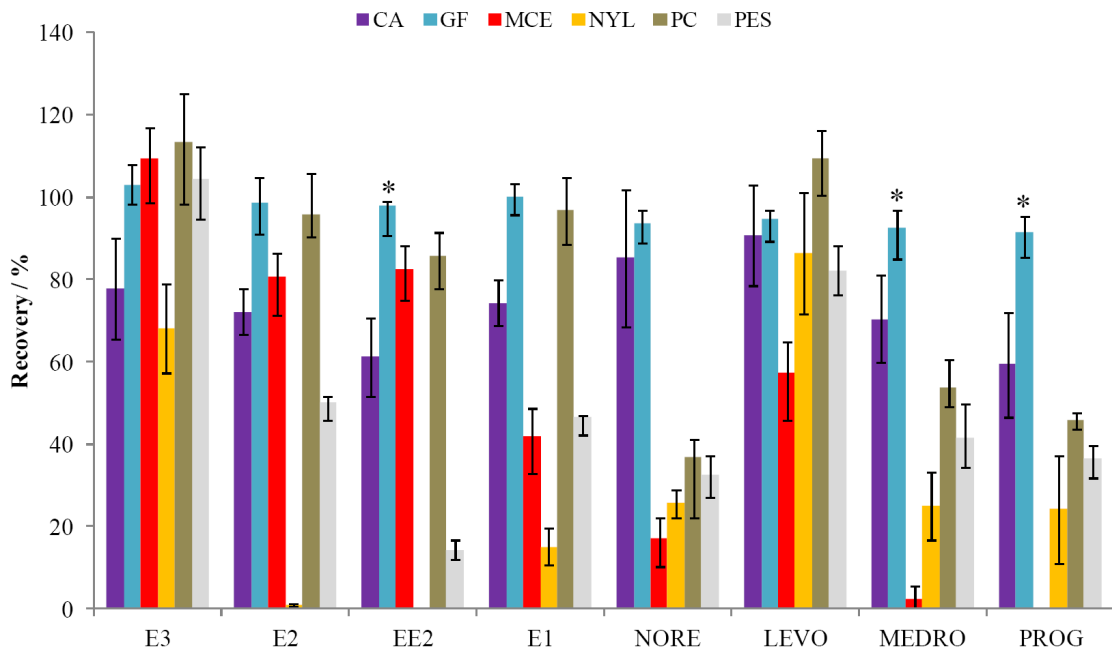
**Figure 3-1** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water and affluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions (mean±SD, n=2, 2 µg L<sup>-1</sup>) during storage. As examples, EE2 and MEDRO were chosen to represent estrogens and progestagens, respectively. The symbols (\*) represent statistically significant (P<0.01) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample.

Although sometimes overlooked, the filtration step involved prior to sample pre-treatment for analysis can have an impact on adsorption and loss of analytes due to

undesirable interactions between the filter material and the analytes of interest. This has been discussed in detail for membrane technology applied to estrogenic steroid hormone removal in wastewater treatment processes [202, 330] and should be investigated when filtration is applied in the analysis of steroid hormones in water matrices (or any trace contaminant for that matter). One study has evaluated the impact of several microfiltration membrane filters on estrone solution following photocatalytic degradation treatment processes in water [330](Han et al. 197-208). Several filter materials have been used to isolate the unbound water-soluble fraction of steroid hormones from the particular phase in water analysis, such as nylon [174, 320, 331], mixed cellulose ester [98, 332], cellulose acetate [122, 333], polytetrafluoroethylene (PTFE) [334], and glass fiber [139, 322, 335], while others do not mention the nature of the filter material or the use of a filtration step [252, 323, 325]. The retention of steroid hormones on the filter material needs to be evaluated since it could result in the underestimation of reported concentration or generate false negative results.

The impact of filter material on the retention of the selected steroid hormones in the initial filtration step was tested on several filter types in spiked HPLC grade water as well as analyte-free filtered affluent wastewater and is presented in **Figures 4-2 and 4S-5**. In both cases, three (EE2, MEDRO and PROG) of the eight selected steroid hormones gave statistically significant higher recovery values with GF filters ( $n=4$ ;  $P<0.05$ ). Mean recovery values ranged from 92 to 103% when GF was used (with  $SD<8\%$  in all cases), 57 to 106% for CA, 6 to 91% for MCE, 1 to 96% for NYL, 37 to 113% for PC and 14 to 104% for PES, for all compounds in both water matrices. This made GF the most reliable filter material for the elimination of suspended material for the selected steroid hormones while minimizing losses of dissolved analyte due to sorption onto the filter. Progesterone (PROG) was the only compound (**Figure 4S-5**) for which the recovery values were significantly ( $n=4$ ;  $P < 0.05$ ) lower in affluent wastewater than in HPLC grade water. This result could be attributed to its interaction with the natural dissolved organic matter present in the affluent matrix, given the hydrophobicity of PROG ( $\log K_{ow}=3.87$ , **Tableau 4S-1**). The nature of the sorption and interaction mechanisms involved between the steroid hormones and the selected filter material are complex and are not completely understood. These mechanisms include hydrophobic interactions, hydrogen bonding and  $\pi$ - $\pi$  stacking, all of which are dependent on the nature of the analytes and the physico-chemical characteristics of the filter material. The

emphasis of this paper was to evaluate the impact of filter material on the retention of the selected steroid hormones prior to chromatographic analysis, a more detailed discussion on the sorption mechanisms can be found elsewhere [122, 202, 330].



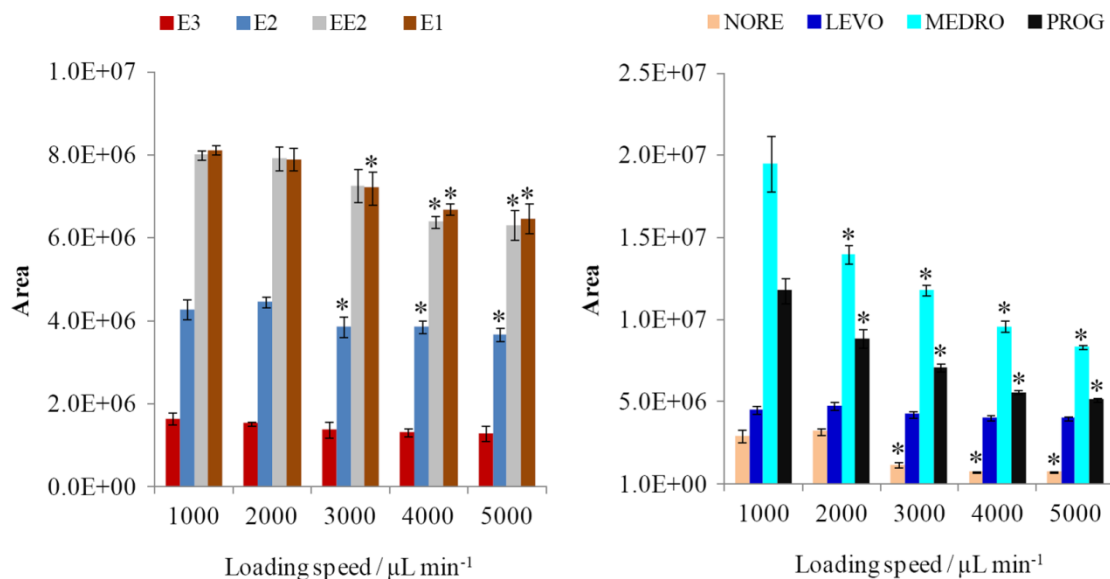
**Figure 3-2** Comparison of recovery values (mean $\pm$ SD, n=4) on different filter materials, cellulose acetate (CA), glass fiber (GF), mixed cellulose ester (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC) and polyethersulfone (PES), for selected steroid hormones. Tests were done in spiked (5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) analyte-free filtered affluent wastewater. The GF filters gave significantly higher recovery values for three out of the eight steroid hormones (\*, P<0.05).

A recent review [336] demonstrates the importance and the need for such studies (storage conditions and filter material) to measure the depletion levels of several analytes, such as pharmaceutical compounds as well as certain hormones, as a function of storage conditions. They mention the lack of standardized protocols for the collection and storage of environmental waters which would undoubtedly help in improving the results (accuracy) and confidence for the reported concentration levels in environmental samples.

### 3.3.2 Optimization of the on-line SPE procedure

#### 3.3.2.1 SPE loading speed and breakthrough volume

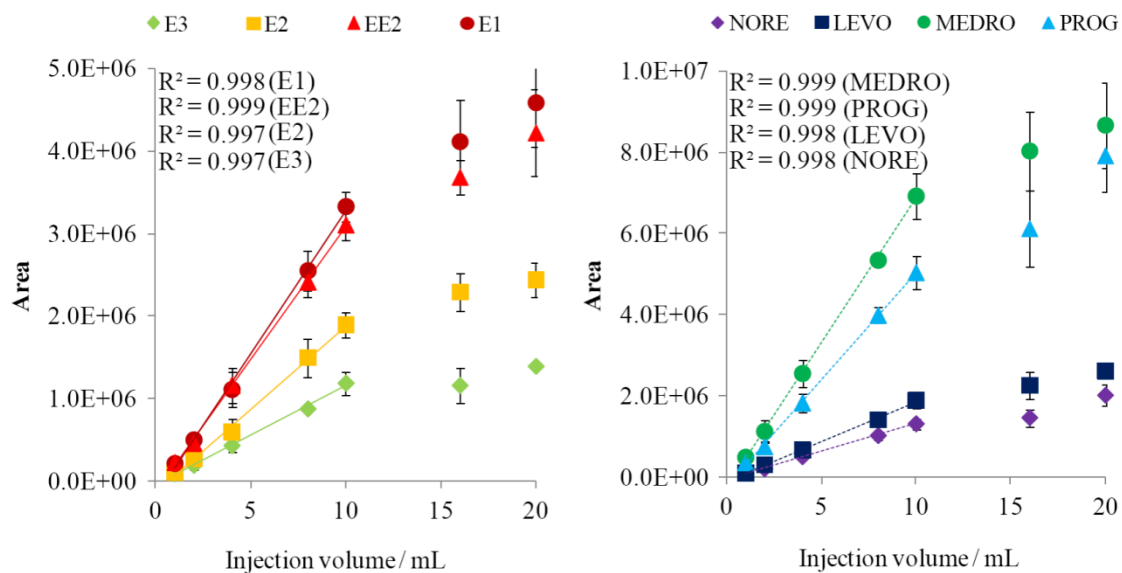
The time limiting factor in on-line SPE is the sample transfer time from the injection loop to the SPE column in the sample enrichment step. The more rapidly the loading speed from the injection loop to the SPE column, the less time is spent on each sample, increasing sample throughput. This parameter must be optimized so as not to generate sample loss from diminished sample contact time with sorbent phase at higher loading flow rates or, inversely, increased retention behavior from the sorbent phase due to lower flow rates which subsequently affects elution strength. Also, since the breakthrough volume could be a flow rate dependent step [337], the loading speed should be tested in the conditions used for sample analysis. The optimum loading speed values, in terms of both extraction efficiency and speed, were evaluated on a spiked steroid hormone solution ( $n=3$ ,  $500 \text{ ng L}^{-1}$ ) in analyte-free affluent wastewater, using a 10-mL injection sample loop (**Figure 4-3**). As shown in **Figure 4-3**, for the loading speeds of the selected steroid hormones, with the exception of MEDRO and PROG, there is no significant differences ( $n=3$ ;  $P<0.05$ ) between 1000 and 2000  $\mu\text{L min}^{-1}$ , such flow rates yielding the highest analyte peak area responses. Therefore, a flow rate of 1500  $\mu\text{L min}^{-1}$  was selected as a compromise in order to decrease sample loading time while not affecting analyte response for six of the eight analyzed compounds. The negative impact of peak area response for MEDRO and PROG was considered acceptable (<25%), since they are the two most sensitive compounds and have the lowest LODs and LOQs.



**Figure 3-3** Effect of loading speed (1000 to 5000  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) for spiked steroid hormones (mean $\pm$ SD,  $n=3$ , 500 ng L<sup>-1</sup>) peak areas from sample loop (10-mL) to on-line SPE column in analyte-free affluent wastewater. The symbols (\*) represent significantly ( $P < 0.05$ ,  $n=3$  with  $\text{RSD} \leq 15$  in all cases) smaller peak areas than observed at the lowest loading speed (1000  $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

The overloading of the SPE columns is considered to be a function of the retention capacity of the sorbent material towards analyte concentration or interfering matrix compounds. The impact of these two factors has been considered negligible when working with trace level contaminants and with the nature of the matrix in environmental water samples [337-339]. Previous on-line SPE breakthrough volume experiments for steroid hormones were performed in HPLC grade or Milli-Q water in the absence of wastewater of surface water matrix, according to analyte peak area or recovery [253, 320, 332]. The breakthrough volume is important in that it is directly related to the pre-concentration factor, thus influencing the LOD and the LOQ which are both related to the signal-to-noise ratio (S/N), as well as the sensitivity. This would suggest that looking for a peak area increase or recovery value to determine breakthrough volume should be accompanied by an evaluation of the S/N response, since a larger volume of sample could also cause an increase in unwanted interfering compounds. The breakthrough volume for the selected steroid hormones was established by injecting variable volumes (1 to 20-mL) of a sample (constant concentration)

spiked with steroid hormones ( $n=3$ ,  $150 \text{ ng L}^{-1}$ ) in analyte-free affluent wastewater, using a 20-mL injection loop (**Figures 4-4 and 4S-6**). Both peak areas and S/N were monitored as a function of injection volumes. Linear regression lines were plotted against the experimental data points to determine the maximum injection volume. Linearity ( $R^2 \geq 0.997$ ) was observed for all selected steroid hormones between 1 and 10-mL (**Figure 4-4**) when peak areas were used, whereas five of the compounds showed an acceptable linear increase ( $R^2 \geq 0.983$ ) between 1 and 10-mL when looking at S/N (**Figure 4S-6**). Indeed, for LEVO, MEDRO and NORE a linear increase was achieved between 1 and 4-mL and then a plateau was observed for the following injection volumes (**Figure 4S-6**). A maximum injection volume of 10-mL was chosen, even if S/N was not improved for three progestagenic hormones, since it did have a positive impact for the remaining compounds and because the progestagens show higher S/N ratios than the estrogens.



**Figure 3-4** Determination of breakthrough volumes (1 to 20-mL) of a mix steroid hormone solution ( $n=3$ ,  $150 \text{ ng L}^{-1}$ ) in analyte-free affluent wastewater, using a 20-mL injection loop. The maximum injectable volume is represented by the last point of the linear regression line of analyte peak area. A sample loading volume between 1 and 10 mL, without loss of analyte, is possible in affluent wastewater ( $R^2 \geq 0.997$ ).

### 3.3.2.2 SPE matrix effect and recovery

The nature of the composition of the sample matrix can have a negative (ion suppression) or positive (ion enhancement) impact on analyte signal and will influence the reproducibility, linearity, accuracy and ion-ratio of a method as well as produce false positives. Although APCI is less susceptible to matrix effect than ESI [309, 340], it should still be evaluated, since it is matrix dependent, unpredictable and can affect the reliability of a method [341, 342]. The matrix effects for the on-line SPE method were evaluated at two concentration levels, i.e. 100 and 500 ng L<sup>-1</sup>, in spiked HPLC water and a mixture of several analyte-free affluent wastewaters (**Figure 4S-7**). Matrix effect was calculated by comparing peak areas of spiked affluent wastewater to the peak areas found in HPLC water according to a 10-mL injection volume. Multiple affluent wastewater samples were pooled prior to being spiked, to evaluate a modified relative matrix effect [309] in a more representative matrix. This will affect both precision and accuracy measurements of the method, whereas the majority of methods employ an absolute matrix effect calculation method [98, 320], that only affects accuracy. The results in **Figure 4S-7** show that for all the analytes of interest there was a signal suppression, with matrix effect varying from 63 to 86% for both concentrations (100 and 500 ng L<sup>-1</sup>). To compensate for these matrix effects, a standard addition calibration method using a single IS was chosen for the quantification and detection of the selected steroid hormones in wastewater samples. This alternative was previously investigated and compared with external and matrix-matched calibration methods, using one or multiple IS, to overcome matrix effects in the analysis of phytoestrogens by LC-MS/MS [343]. While traditional off-line standard addition methods remain laborious and time consuming, the automation of the SPE procedure using on-line SPE-LC-APCI-MS/MS method makes this approach feasible and not so labour-intensive, while giving the most reliable results.

Extraction recoveries have an impact on the LODs and LOQs and were determined in two ways, *i*) a direct chromatographic injection (25 µL) and *ii*) an on-line small volume injection (100 µL, with a 100-µL loop) and compared with those of the on-line high volume injection (10-mL) used for sample analysis in affluent wastewater (**Figure 4S-8**). The on-line small injection volume method [98] has the advantage of using the same instrumental setup and is based on the complete retention of analytes on the SPE column due to small injection loop volume (100-µL versus 10-mL in this case) and reduced sample transfer times.



As illustrated in **Figure 4S-8**, the two methods are not statistically ( $n=5$ ;  $P<0.05$ ) equivalent. Indeed, for only two of the selected steroid hormones (EE2 and NORE) both methods were statistically similar. In addition, when the signal intensities for the off-line small injection volume and the on-line small injection were compared (results not shown) the averages were also significantly different for six of the eight selected hormones. The recoveries for the on-line small injection method ranged from 64 to 101%, while for the off-line small injection method, they ranged from 71 to 95%. This would imply that the differences in recovery values are not simply due to matrix effect as would be expected, but rather a combination of matrix effect and other factors, such as the instrumental setup or retention mechanism on the sorbent mass for smaller volumes. As expected, E3 gave the lowest recovery values, being the least hydrophobic of the studied steroid hormones ( $\log K_{ow}=2.45$ , **Tableau 4S-1**), whereas the more hydrophobic progestagenic steroid hormones (NORE, PROG, MEDRO and LEVO) had higher recovery values. Given that the recovery values could not be determined with matrix-matched solutions, the process efficiency [309, 344] was also calculated to take into account both matrix affects and recovery values (**Tableau 4-3**). Process efficiencies ranged from 54 to 79 %, which represents satisfactory values since the least hydrophobic steroid hormones, i.e. E1, E3 and NORE (**Tableau 4S-1**), did not permit an effective wash step without loss of analyte.

**Tableau 3-3** Calculated process efficiency (PE) for the selected steroid hormones for the on-line SPE-LC-APCI-MS/MS method.

Compound	Process efficiency <sup>a</sup> (%)
E1	54
E2	72
E3	67
EE2	55
NOR	60
LEVO	79
MPROG	65
PROG	73

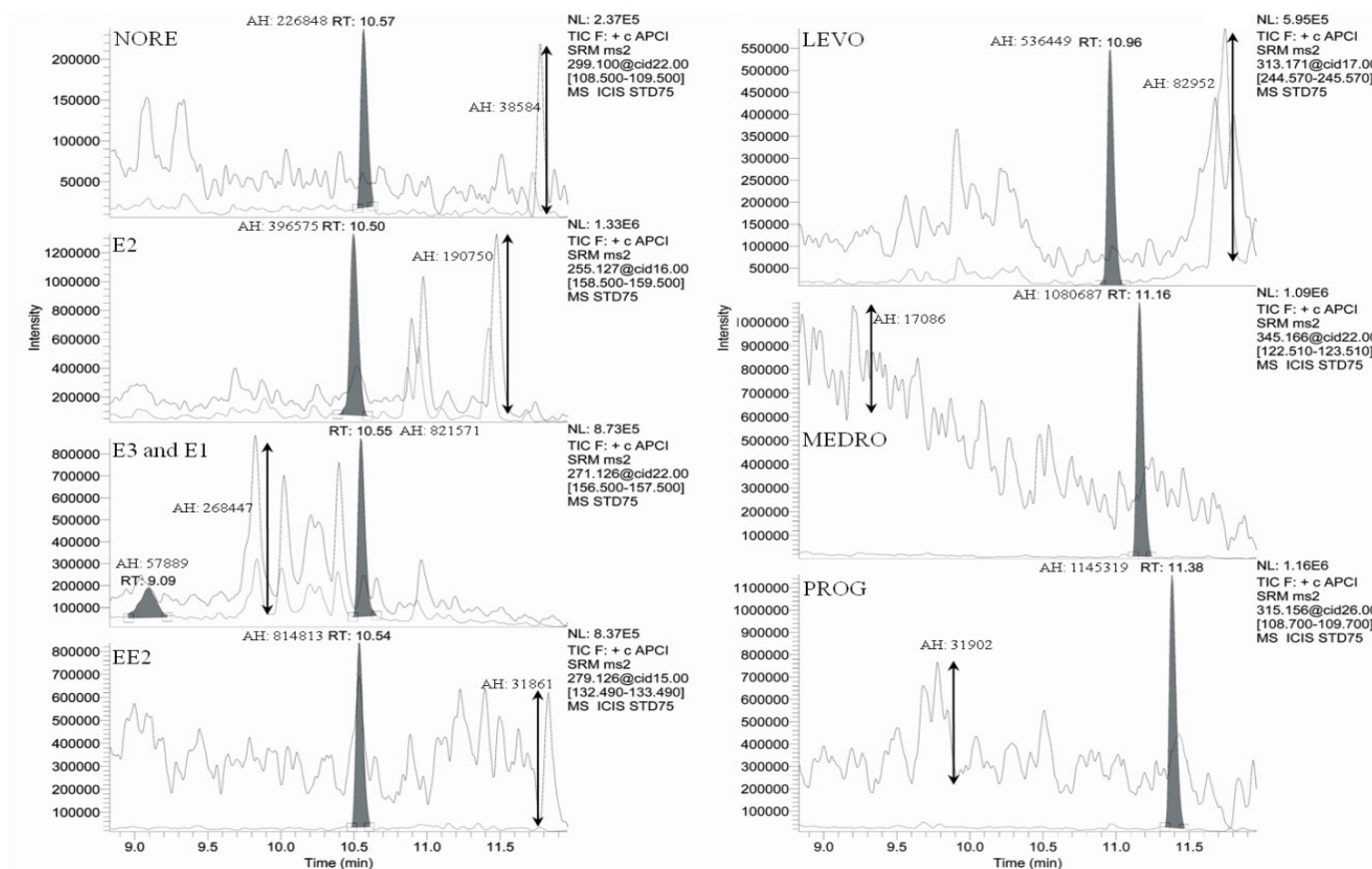
<sup>a</sup> Calculated using matrix effect (ME) and recovery values (RE) according to the off-line small injection method (25  $\mu$ L):  
 $PE = (ME \times RE) / 100$ . Equation taken from ref. [340]

### 3.3.3 Chromatographic and MS/MS conditions

The complete method was validated following the previously described on-line SPE optimization results for the selected steroid hormones. The chromatography was the first challenge, with the adjustment of the elution gradient conditions. A minimum of 40% MeOH in the initial elution step (**Tableau 4-1**) was needed to simultaneously elute all the steroid hormones from the SPE column prior to reaching the analytical column, thus significantly reducing peak tailing and broadening. With this amount of organic modifier, the un-retained polar and less hydrophobic compounds are quickly eluted in the solvent front and could cause matrix effects. The gradient was adjusted in real matrix, affluent wastewater, so as to shift the retention times of the selected steroid hormones away from the time windows of interfering compounds to avoid their co-elution (**Figure 4-5**). Given the short analysis time and their structural similarities, the steroid hormones E1, E2, EE2 and NORE (**Figure 4-5**) were poorly resolved with the applied gradient. This was also the case in other studies [98, 252, 320], where these compounds were investigated in short run times using reversed phase analytical columns. A limited number of papers [253, 323] show proper separation for these steroid hormones and require long analysis times, between 20 min and 55 min and the use of dansyl chloride derivatization in one case. Although it can reduce matrix effect and improves detectability, complete separation is not required for the selective MS/MS detection, especially since E1, E2, EE2 and NORE do not have the same precursor ions (**Tableau 4-2**). The chromatographic run was 2.28 min and column re-equilibration was performed during the sample transfer step from the sample loop to the SPE column. The positive identification of target steroid hormones in real samples was confirmed by matching chromatographic retention times within  $\pm 2\%$  of those observed in standards spiked in analyte-free matrix.

The internal standard was an isotopically-labeled E2 steroid hormone and was mainly used to compensate for the signal irreproducibility and variations within runs more than for matrix effect, since a standard addition calibration method was applied for quantification. As previously reported [290], the impact of cross-contribution from the isotopic pattern of steroid hormones with a two mass unit difference, i.e. E2 and its isotopically-labeled counterpart (IS, [ $^{13}\text{C}_2$ ]-E2), was considered insignificant (less than 5 %) and did not affect accuracy (% bias, **Tableau 4-3**). A minimum of two selected reaction monitoring transitions

(SRM) as well as the relative intensities of their ratios (**Tableau 4-2**) were used for positive analyte identification in real samples.



**Figure 3-5** Representative superimposed chromatograms of a blank and spiked (75 ng L<sup>-1</sup>) wastewater affluent sample. The blank is represented by the non-integrated chromatograms, whereas the spiked sample is represented by the integrated peaks with corresponding retention times (RT) for each steroid hormone. The ordinates are given in intensities for the spiked sample only, therefore absolute peak height (AH) for both spiked samples and maximum peak blank values (black arrows) are also reported.

### 3.3.4 On-line SPE-LC-APCI-MS/MS method validation

Method validation was done by evaluating linearity, precision (inter-day), accuracy, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for HPLC grade water as well as in analyte-free effluent and affluent wastewater (**Tableau 4-4** and **Tableau 4-5**).

The calibration curves of the spiked selected steroid hormones showed good linearity in all water matrices, with  $R^2 \geq 0.9962$  (**Tableau 4-4**). The precision and accuracy (% bias) of the method was determined at two concentration levels (QC 1 and QC 2) by analyzing replicates of spiked HPLC water and affluent wastewater samples (n=5, **Tableau 4-5**). The precision for all eight analytes in both waters for both QCs ranged between 6 and 23% while the accuracy, as % bias from the expected concentration, was between 0.8 and 21%, with the exception of NORE at 25% for the lowest QC level (QC 1, **Tableau 4-5**). The LODs and LOQs were matrix dependent with values ranging from 5 to 22 ng L<sup>-1</sup> and 11 to 36 ng L<sup>-1</sup> in HPLC grade water, from 8 to 34 ng L<sup>-1</sup> and 21 to 60 ng L<sup>-1</sup> in effluent wastewater and 20 to 60 ng L<sup>-1</sup> and 24 to 98 ng L<sup>-1</sup> in affluent wastewater, respectively (**Tableau 4-5**).

**Tableau 3-4** Method validation results for linearity (R<sup>2</sup>), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for HPLC grade water, effluent (Effl) wastewater and affluent (Affl) wastewater.

Steroids	R <sup>2a</sup>			LOD <sup>b</sup>			LOQ <sup>c</sup>			Highest calibration point <sup>d</sup>		
				(ng L <sup>-1</sup> )			(ng L <sup>-1</sup> )			(ng L <sup>-1</sup> )		
	HPLC water	Efl	Afl	HPLC water	Efl	Afl	HPLC water	Efl	Afl	HPLC water	Efl	Afl
E3	0.9998	0.9967	0.9981	17	30	60	35	49	98	1525	697	3041
E2	0.9998	0.9993	0.9996	5	21	24	13	36	44	1014	689	3029
E1	0.9996	0.9976	0.9987	9	16	23	27	30	44	1030	686	3077
EE2	0.9998	0.9964	0.9989	13	18	21	18	33	24	1030	680	3077
NORE	0.9990	0.9962	0.9986	22	34	53	23	35	61	1542	704	3121
LEVO	0.9991	0.9977	0.9962	13	18	30	36	50	58	1531	689	3053
MEDRO	0.9989	0.9973	0.9987	20	32	42	21	38	53	1543	680	3122
PROG	0.9994	0.9990	0.9994	6	8	20	11	21	24	1579	697	3184

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> determined by internal standard calibration for spiked solution of analyte free wastewater (n=2, with six to eight point calibration standards).

<sup>b</sup> The LOD,  $(3.3 \times SD_{y-intercept})/m$ , was determined using the calibration curve of the second most abundant product ion.

<sup>c</sup> The LOQ,  $(10 \times SD_{y-intercept})/m$ , was determined using the calibration curve of the most abundant product ion.

<sup>d</sup> This value was not determined until saturation of signal (ULOQ), but was evaluated according to the maximum expected concentration in the environment or to confirm linearity for the optimization parameters of the method.

**Tableau 3-5** Retention times and method validation for precision (inter-day) and accuracy (bias) for two concentration levels (QC 1 and QC 2) for the selected steroid hormonesa.

Steroids	RT (min)	QC #1		QC #2		Bias (%)			
		(ng L <sup>-1</sup> ) amount		(ng L <sup>-1</sup> ) amount		QC #1		QC #2	
		HPLC water	Afl	HPLC water	Afl	HPLC water	Afl	HPLC water	Afl
E3	9.09 (0.03)	112 (5)	342 (20)	852 (3)	817 (12)	0.8	20	4	4.3
E2	10.50 (0.03)	109 (6)	317 (12)	862 (4)	855 (13)	1.6	21	6	6
E1	10.55 (0.02)	104 (5)	346 (6)	877 (5)	874 (10)	6	14	1.8	8
EE2	10.54 (0.02)	105 (6)	342 (12)	876 (7)	887 (8)	6	15	2.3	5
NORE	10.57 (0.02)	106 (10)	312 (7)	906 (4)	832 (10)	3	25	5	0.2
LEVO	10.96 (0.03)	99 (9)	338 (8)	858 (3)	864 (9)	9	16	0.2	3.2
MEDRO	11.16 (0.02)	112 (6)	316 (23)	826 (4)	852 (8)	17	20	5	1.5
PROG	11.38 (0.02)	108 (7)	330 (22)	905 (4)	697 (16)	2.7	13	1.5	7

<sup>a</sup>Values in parenthesis represent standard deviations from the mean (n=5).

In all the reported methods using MS/MS, none rely on the use of both SRM transitions to determine the LODs and LOQs (**Tableau 4-6**). The use of the most abundant ion product will lead to lower values of LODs, but the obtained concentration could result in the absence of analytical signal from the background noise for the second, less abundant, monitored

product ion. This is why the second most abundant SRM (**Tableau 4-6**) was chosen to measure the reported LODs in the herein method, since its presence is mandatory for proper compound confirmation in real samples. This approach, referred to as limits of determination or limits of confirmation, has been applied in previous studies [345, 346] and will generally result in superior, although more reliable, values.

**Tableau 4-6** summarizes the LODs and LOQs found in the other on-line SPE-LC-MS/MS methods developed for measuring steroid hormones in water matrices. In some cases, LODs and limits of quantifications (LOQs) were determined in Milli-Q water, when calculated concentrations were given in wastewater or surface water matrices while one study did not report any LOQ values for analyzed steroid hormones (**Tableau 4-6**). In others, the measured concentrations in wastewater samples for estrogens were lower than the determined linearity range [252, 323]. Given the number of different methods used to determine the LODs and LOQs as well as the nature of the matrix in which they are determined (**Tableau 4-6**), a direct comparison among them is not necessarily justified [347, 348](Long and Winefordner 712A-24A;Glaser et al. 1426-35)The LODs values in this study are higher than the previous studies, with a relatively low sample volume (10-mL), but could be improved by using higher injection volumes for the pre-concentration (loading) step given the use of a higher bed mass for the SPE columns, permitting larger breakthrough volumes. Of the methods reported, four have used lower injection volume (1, 2.5 and 5-mL) and obtained better LODs (**Tableau 4-6**). In two of them, an ESI method in NI mode was used [252, 320] which will produce better S/N values and lower matrix effect than in PI mode, but is not suitable for the analysis of progestagens. In another, an atmospheric pressure ionization (APPI) interface was used and showed better signal intensities and sensitivity for the steroid hormones when compared to ESI and APCI [98]. The last one, used a derivatization step (dansyl chloride) followed by an ESI method in PI mode [325], which is more time consuming and necessitates more complex instrumentation. The remaining methods (**Tableau 4-6**) used very large sample volumes (50 to 500-mL) to achieve low LODs, causing longer analysis times (25 to 60 min) and reducing sample throughput. The herein method represents a compromise between analysis time, higher sample throughput capabilities, sample volume and simplicity for the analysis of both progestagenic and estrogenic steroid hormones in a single run, with LODs and LOQs sufficiently low to detect and quantify them in environmental wastewater matrices, as shown in **Section 4.5**.

**Tableau 3-6** Analytical performance of the described herein method compared to previously reported on-line SPE-LC-MS/MS methods for the detection of steroid hormones.

Compounds studied <sup>a</sup>	Injection volume (mL)	Analysis time (min)	Water matrix <sup>b</sup>		LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Method	Ref.
			sample	validation				
E1, E2, E3, EE2, DES, BLD, NDL, ADD, TTR	50	30	Affluent Effluent River	Affluent Effluent River Milli-Q	0.1-5.0 SRM 1	1.0-10.0	LOD: S/N = 3 LOQ: S/N = 10	(322)
E1, E2, E3, EE2, LEVO, MEDRO, NORE, PROG	1	15	Affluent Effluent River	River	3-50 SRM 1	n.a.	LOD: 3.707×S.D. <sup>d</sup>	(98)
E1, E2, EE2 (dansylated)	1	17	Affluent Effluent	Pure water	0.4-0.7 SRM 1	1	LOD: S/N = 3 LOQ: n.a.	(325)
E1, E2, E3, EE2, TTR, NORE, DES, LEVO	5	9	Wastewater	Milli-Q	0.3-2.1 SRM 1	1.0-7.0	LOD: S/N = 3 LOQ: S/N = 10	(252)
E1, (α-β)E2, E3, EE2	2.5	10	Wastewater Freshwater	Milli-Q	0.15-0.95 SRM 1	0.25-2.0	LOD: S/N > 3 LOQ: S/N > 5	(320)
E1, E2, E3, E3-16G, E2-3S, E1-3G, E2-3G, E3-3S, E3-3G, E1-3S (free estrogens dansylated)	500	25	River	River	0.04-6.8 SRM 1	0.2-2	LOD: 2.821×S.D. <sup>e</sup> LOQ: n.a.	(323)
E1, E2, E3, EE2, E2-17G, E1-3S, E2-17A, DES	250	60	River Drinking	Ground	0.01-0.38 SRM 1	0.02-1.02	LOD: S/N = 3 LOQ: S/N = 8	(324)
E1, E2, E3, EE2, LEVO, MEDRO, NORE, PROG	10	15	Affluent Effluent	Affluent Effluent Milli-Q	5-60 SRM 1	11-98 SRM 2	(3.3×S.D. <sub>y-int</sub> )/m (10×S.D. <sub>y-int</sub> )/m	Our study

<sup>a</sup> DES: diethylstilbestrol, NDL: nandrolone, ADD: androstenedione, TTR: testosterone, BLD: boldenone, E3-16G: estriol-16-glucuronide, E1-3S: estrone-3-sulfate, E2-3S: estradiol-3-sulfate, E1-3G: estrone-3-glucuronide, E2-3G: estradiol-3-glucuronide, E3-3S: estriol-3-sulfate, E3-3G: estriol-3-glucuronide, E2-17A: estradiol-17-acetate, E2-17G: estradiol-17-glucuronide.

<sup>b</sup> The water matrix sample corresponds to the analysis of real samples for the detection and quantification of the compounds, whereas the validation water matrix is the one used to calculate the respective LODs and LOQs.

<sup>c</sup> n.a., not available.

<sup>d</sup> S.D., standard deviation of 7 replicates of spiked river samples at concentrations of 2 to 5 times the estimated LOD.

<sup>e</sup> S.D., standard deviation of calculated concentrations from 10 spiked river samples.

### 3.3.5 Method application to environmental samples

The optimized and validated on-line SPE-LC-APCI-MS/MS method was applied to analyze the selected steroid hormones in affluent and effluent wastewaters. Two wastewater treatment plants (WWTPs) were chosen, WWTP-A using a physico-chemical treatment approach and WWTP-B using a bio-filtration as well as an ultraviolet disinfection process



for contaminant removal. In order to evaluate the removal efficiency of each WWTP in the most representative fashion, a time-proportional sampling mode was chosen. Wastewater affluent samples were collected hourly or every half hour between 7:30 am and 11:30 am for each treatment plant. Effluent samples were collected as a function of the retention times (hours) and flow rates ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ ) of the WWTPs studied so that the outflow samples corresponded to the inflow (affluent) samples. This sampling method allowed us to evaluate the removal efficiency performance of the WWTPs as a function of incoming wastewater peak flow hours (morning) and non-peak flow hours (early morning and noon) [349]. The results for the selected steroid hormones found in wastewater matrices are presented in **Tableau 4-7**, with the four natural steroid hormones (E1, E2, E3 and PROG) detectable and quantifiable. The synthetic steroid hormones (EE2, LEVO, NORE and MEDRO) were not detected in any of the analyzed samples. Removal efficiencies from both WWTPs were calculated (**Tableau 4-7**) and the percent removals for WWTP-B were stable as a function of time, with an average of  $31 \pm 8$  for E3,  $48 \pm 6$  for E2 and  $90 \pm 2$  for E1. This suggests that the WWTP-B consistently removed these estrogens with the same efficiency independently of peak flow times. This could not be determined for the WWTP-A, since insufficient data was obtained for both affluent and effluent at the different times for this facility. Of the estrogens (E1, E2 and E3) quantified in WWTP-A, the removal efficiencies were low with values ranging from 6 to 57% (**Tableau 4-7**). This could result from their less hydrophobic character among the steroid hormones which does not favor their elimination by sorption mechanisms to suspended solids by the physico-chemical treatment. The bio-filtration process of WWTP-B effectively removed ( $90 \pm 2\%$ ) of E1, while having less impact on E3 ( $31 \pm 8\%$ ) and E2 ( $48 \pm 6\%$ ). Overall, the bio-filtration process does remove the observed steroid hormones more successfully than the physico-chemical approach, but the resulting effluent concentrations (ranging from 25 to  $175 \text{ ng L}^{-1}$ , **Tableau 4-7**) remain high. Indeed, although the dilution factor will be significant, these levels are more than sufficient to induce severe estrogenic activity in the receiving waters [84, 85, 313, 314]. The concentrations found in this work for the natural hormones are similar to those previously reported for wastewater samples [98, 135, 167]. The synthetic hormones have not been detected for the present samples, but the presence of steroid hormone in environmental waters is associated with consumption rates as well as transformation rates from their conjugated to the un-conjugated compounds.

**Tableau 3-7** Concentration of detected selected steroid hormones in WWTP-A and WWTP-B according to sampling times<sup>a,b</sup>.

<i>WWTP-A</i>	Time 1				Time 2				Time 3			
	E3	E2	E1	PROG	E3	E2	E1	PROG	E3	E2	E1	PROG
Affl (ng L <sup>-1</sup> )	92 (7)	< LOQ	n.d.	< LOQ	117 (10)	31 (7)	< LOQ	< LOQ	74 (6)	32 (5)	< LOQ	< LOQ
Efl (ng L <sup>-1</sup> )	46 (8)	< LOQ	25 (6)	< LOQ	50 (10)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	82 (8)	< LOQ	33 (3)	< LOQ
Removal (%)	50				57				n.a.			
<i>WWTP-B</i>												
Affl (ng L <sup>-1</sup> )	155 (30)	70 (1)	284 (14)	25 (2)	148 (5)	66 (5)	275 (6)	< LOQ	234 (7)	68 (4)	376 (36)	30 (8)
Efl (ng L <sup>-1</sup> )	120 (12)	33 (5)	28 (2)	n.d.	88 (13)	36 (4)	29 (2)	n.d.	144 (19)	37 (6)	30 (2)	n.d.
Removal (%)	23	53	90	n.a.	40	40	89		38	46	92	n.a.
<i>WWTP-A</i>	Time 4				Time 5				Time 6			
	E3	E2	E1	PROG	E3	E2	E1	PROG	E3	E2	E1	PROG
Affl (ng L <sup>-1</sup> )	143 (9)	47 (3)	< LOQ	< LOQ	111 (4)	55 (11)	47 (9)	29 (1)				
Efl (ng L <sup>-1</sup> )	117 (2)	51 (2)	< LOQ	< LOQ	104 (20)	39 (7)	35 (6)	30 (7)	not sampled			
Removal (%)	18	n.a.			6	30	26	n.a.				
<i>WWTP-B</i>												
Affl (ng L <sup>-1</sup> )	206 (6)	74 (2)	336 (11)	< LOQ	176 (10)	70 (1)	313 (25)	< LOQ	156 (37)	68 (5)	313 (11)	44 (9)
Efl (ng L <sup>-1</sup> )	175 (10)	34 (2)	25 (3)	n.d.	138 (11)	38 (4)	31 (3)	n.d.	82 (8)	40 (8)	42 (5)	n.d.
Removal (%)	15	54	93		22	51	90		47	41	87	n.a.

<sup>a</sup> WWTP-A time schedule ranged from 7:30 am (Time 1) to 11:30 am (Time 5) with sampling done hourly. The corresponding effluent samples were collected from 10:00 am (Time 1) to 1:55 pm (Time 5); WWTP-B time schedule ranged from 9:00 am (Time 1) to 11:30 am (Time 6) for the affluent with sampling done every half-hour. The corresponding effluent samples were collected from 11:15 am (Time 1) to 1:45 pm (Time 6).

<sup>b</sup> n.a.: not available; n.d.: not detected (< LOD). Values in parentheses represents standard deviations (SD) from de mean.

### **3.4 Conclusion**

An analytical method based on on-line SPE-LC-APCI-MS/MS has been developed for the detection and quantification of eight selected steroid hormones in wastewater matrices in a single analytical run. A detailed discussion on optimization parameters often overlooked and that have an impact on the overall performance of the method (sample collection, filtration and storage) has been presented as a function of water matrix. Indeed, only glass fiber was the most reliable filter material for the elimination of suspended material for the selected steroid hormones while minimizing losses of dissolved analytes due to sorption (92 to 103% recovery). Real samples, free of conservation agents, once filtered and kept at 4 °C could be analyzed within a 48 h period without affecting the integrity of the analytes. All optimization and validation experiments for the on-line SPE method and chromatographic separation were performed in environmentally relevant water matrices. The sensitivity and limits of detection in this study could be improved by using higher injection volumes than the proposed 1 to 10-mL, although this would lead to increased analysis time and should be adjusted depending on the expected steroid hormone concentrations in the matrix of interest. The proposed method is simple and provides a high throughput approach (15 min per injection) for the determination, at low-nanogram per liter levels, of steroid hormones in affluent and effluent wastewaters.

The applicability of the method was demonstrated on affluent and effluent samples from two wastewater treatment plants using different treatment processes. The results revealed that the treatment plants were not successful in removing the detected steroid hormones and ultimately released them into their receiving waters with concentrations sufficiently high to induce estrogenic activity in aquatic species.

### **3.5 Novelty statement**

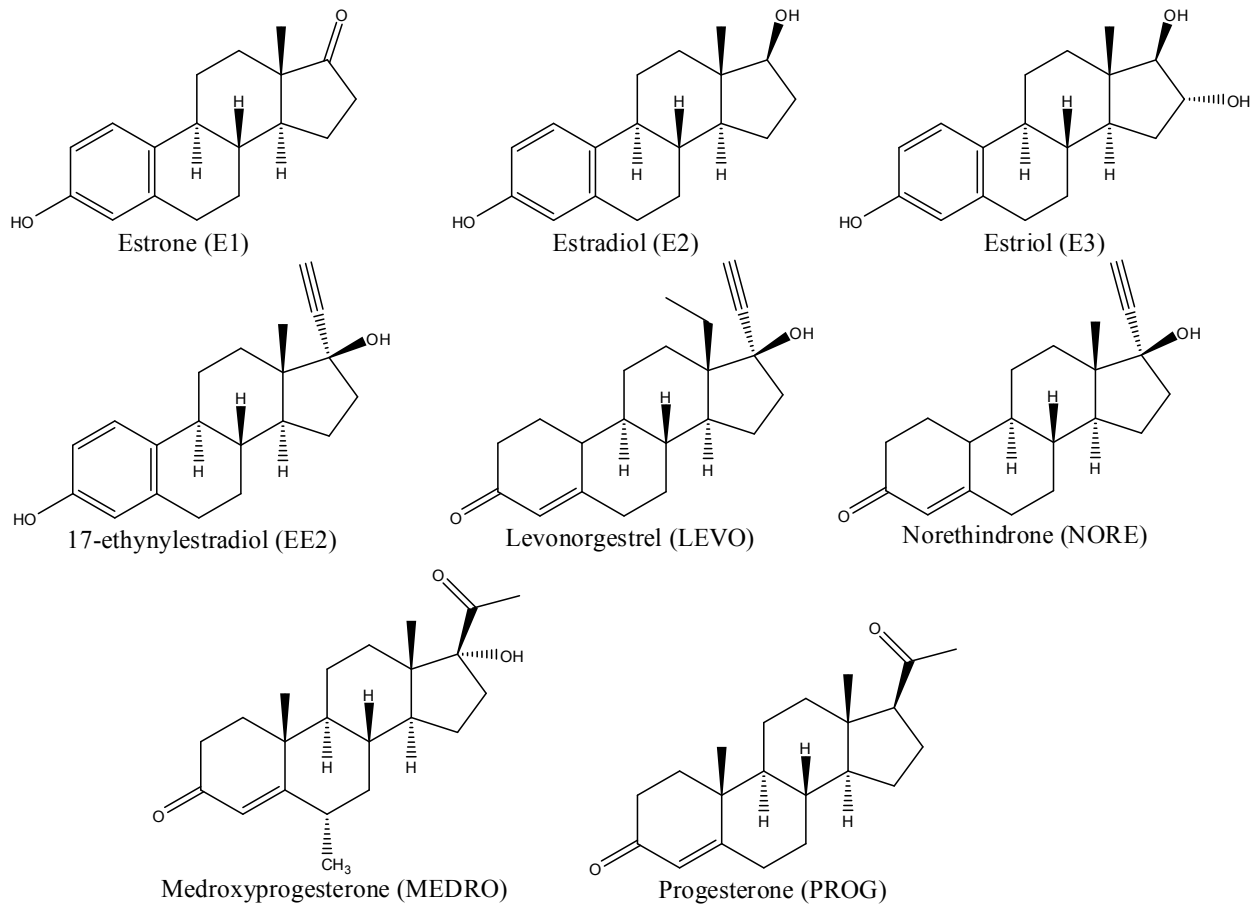
An on-line SPE-LC-MS/MS method for the analysis of both estrogens and progestagens in wastewater in a single run is proposed. We evaluated sample storage over time at different temperature and filtration protocol including various different filtration materials. The

method was validated in real environmental matrices including in wastewater effluents.

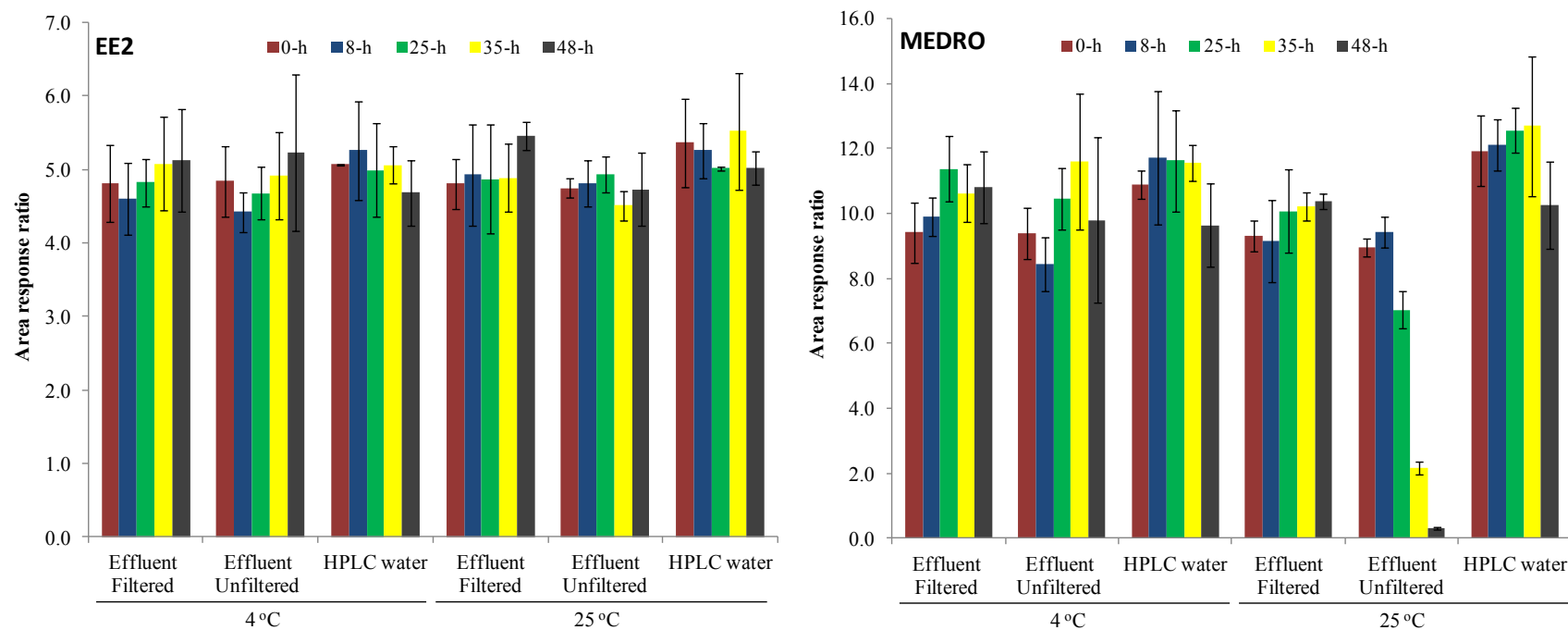
### **3.6 Acknowledgments**

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

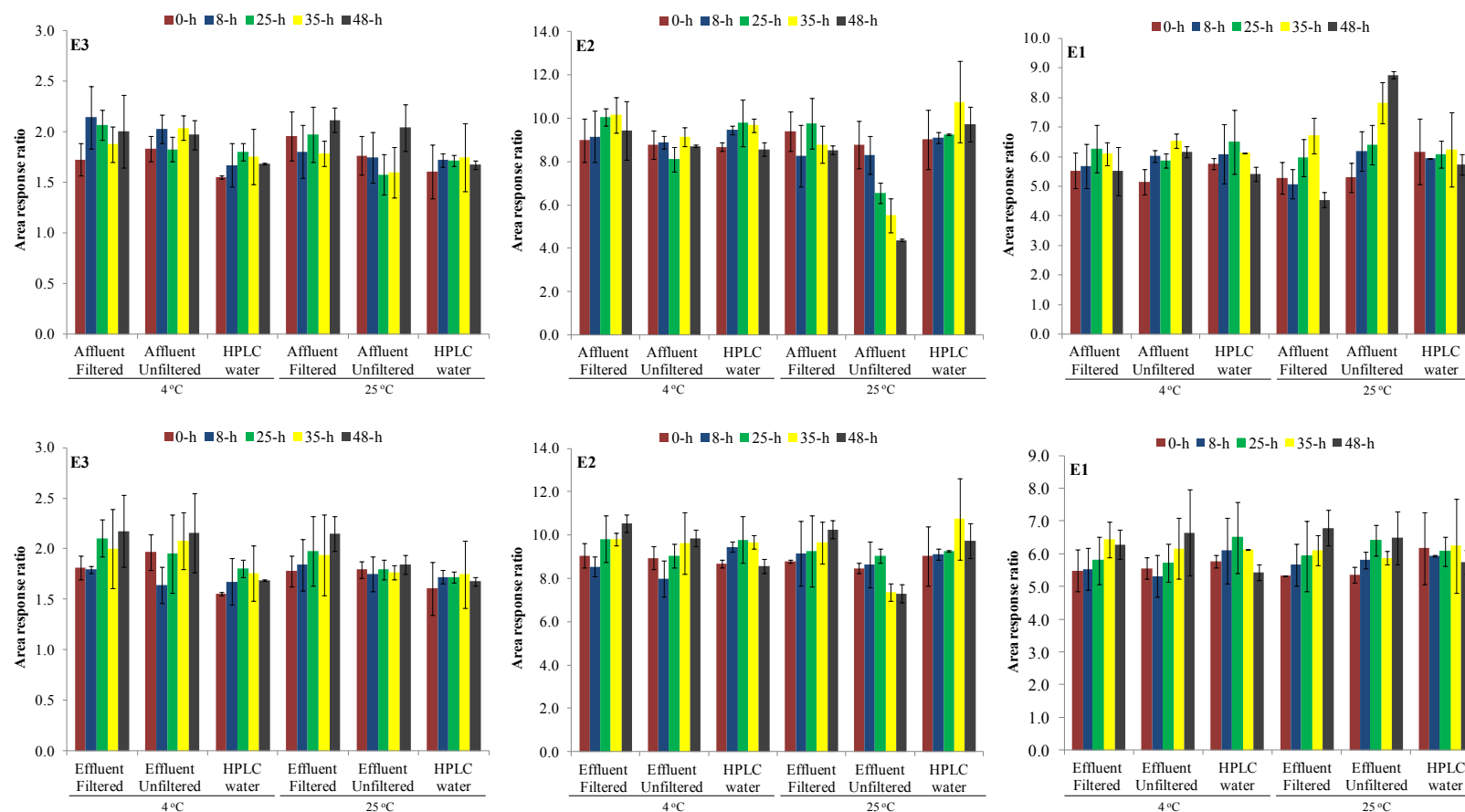
### **3.7 Supplementary material**



**Figure 4S - 1** Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms

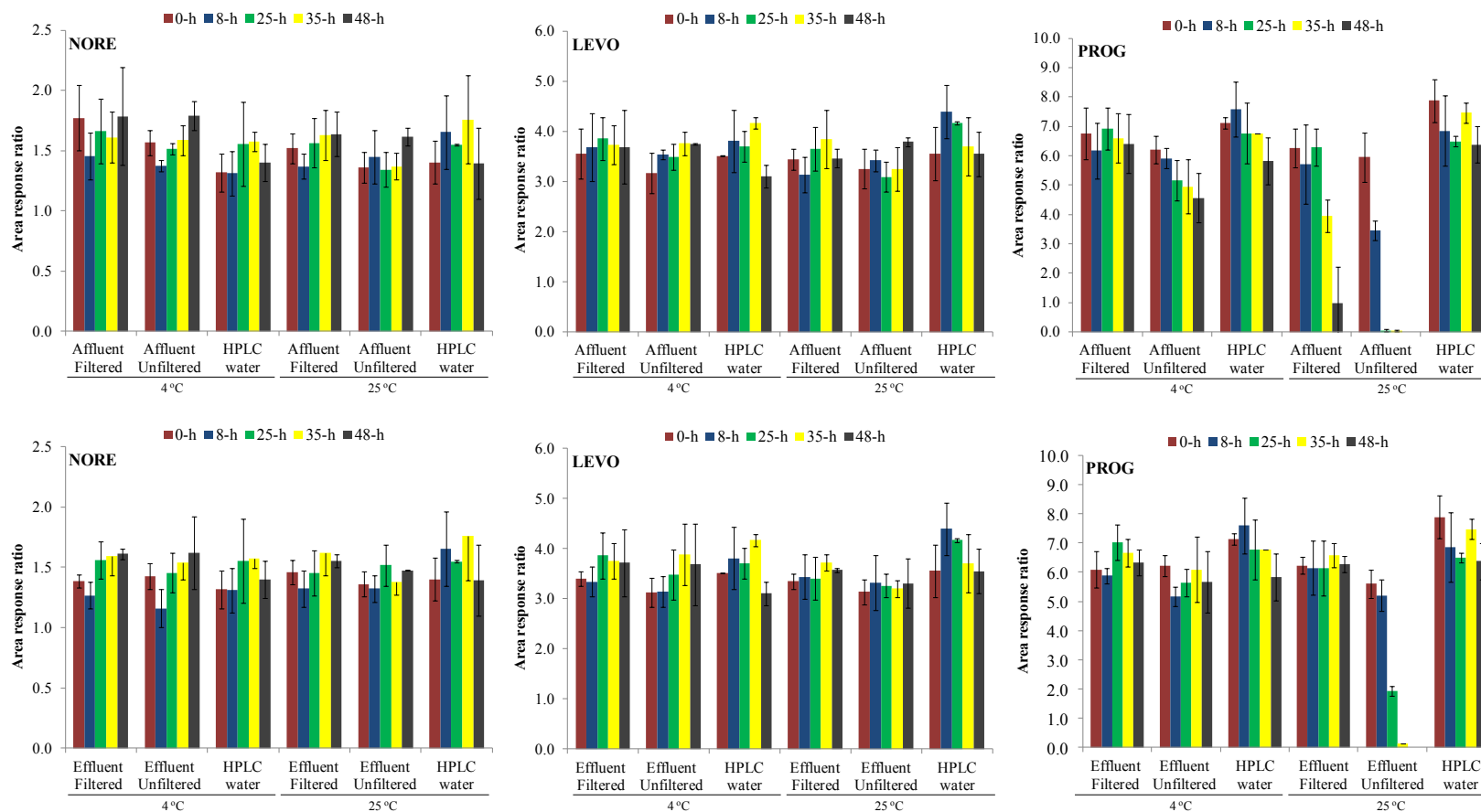


**Figure 4S - 2** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ ,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) during storage. As examples, EE2 and MEDRO were chosen to represent estrogens and progestagens, respectively. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P < 0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample.

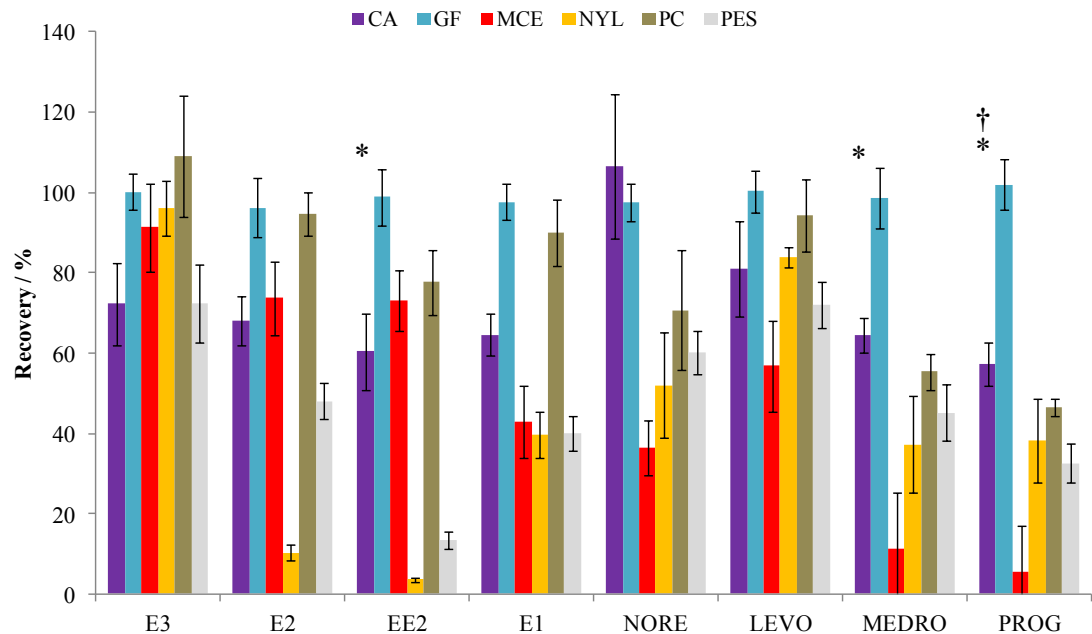


**Figure 4S - 3** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water, affluent and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ ,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) during storage for estrogens. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P < 0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample.

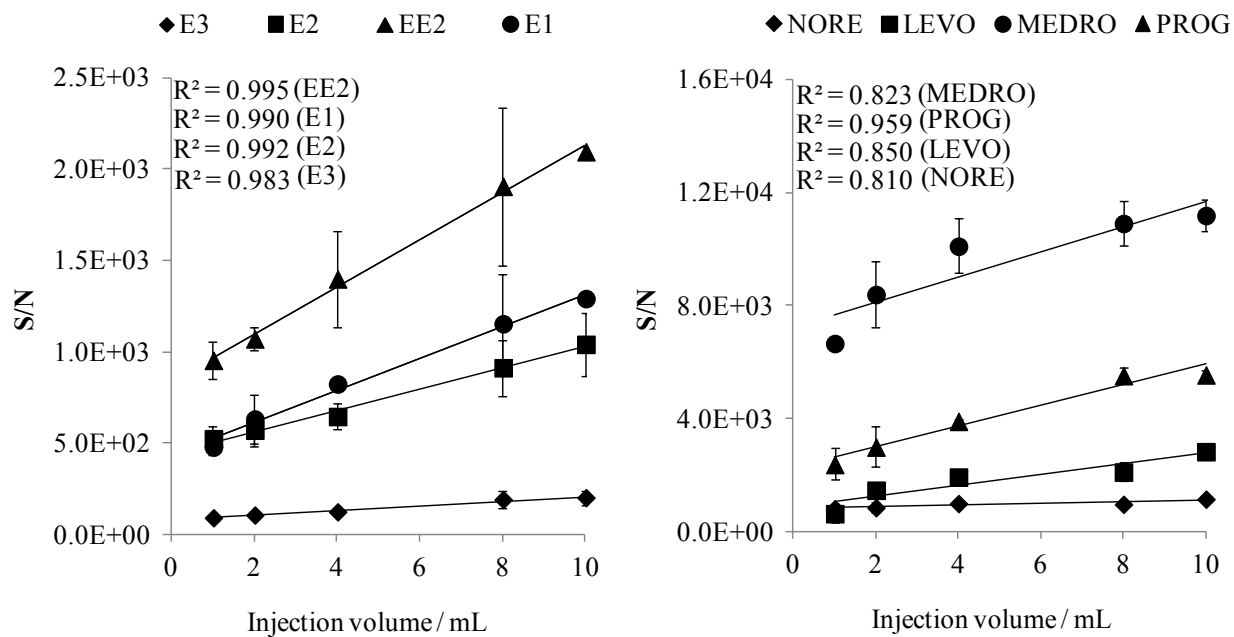




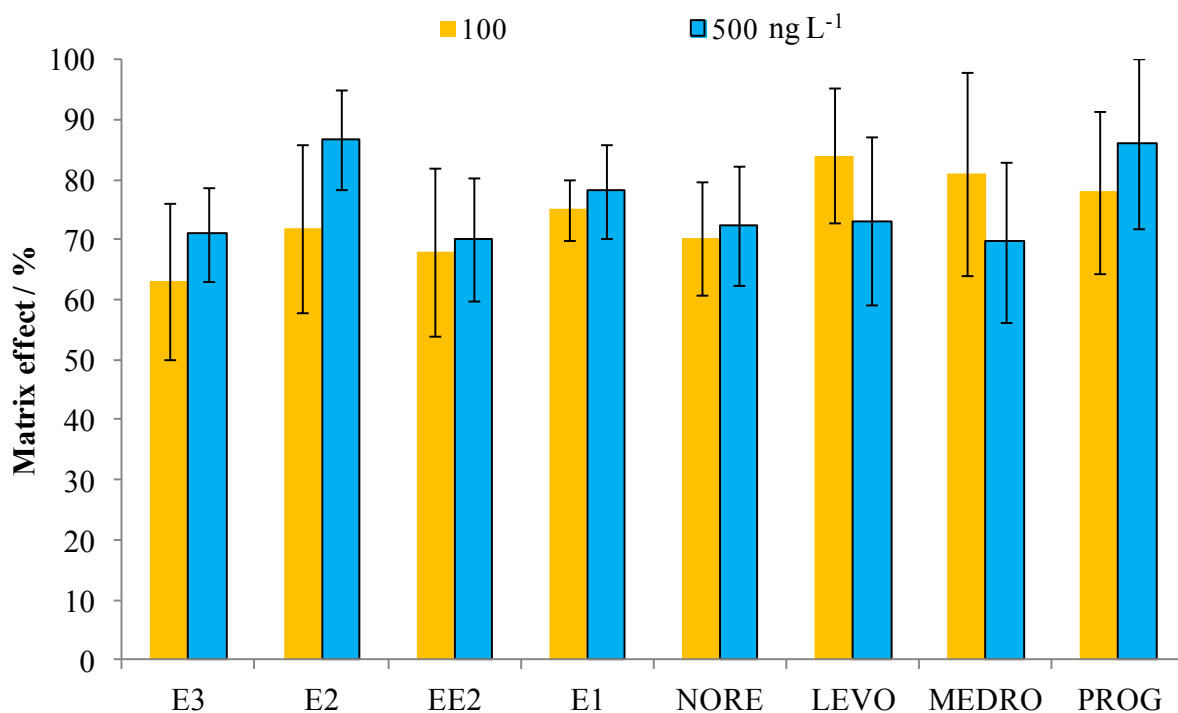
**Figure 4S - 4** Influence of temperature (4°C and 25°C), suspended material (filtered versus unfiltered), water type (HPLC grade water, affluent and effluent wastewater) and time (0-h to 48-h) on the degradation of spiked steroid hormone solutions ( $n=2$ ,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) during storage for progestagens. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P < 0.01$ ) differences between the initial 0-h and the subsequent area response ratios as a function of time within a sample.



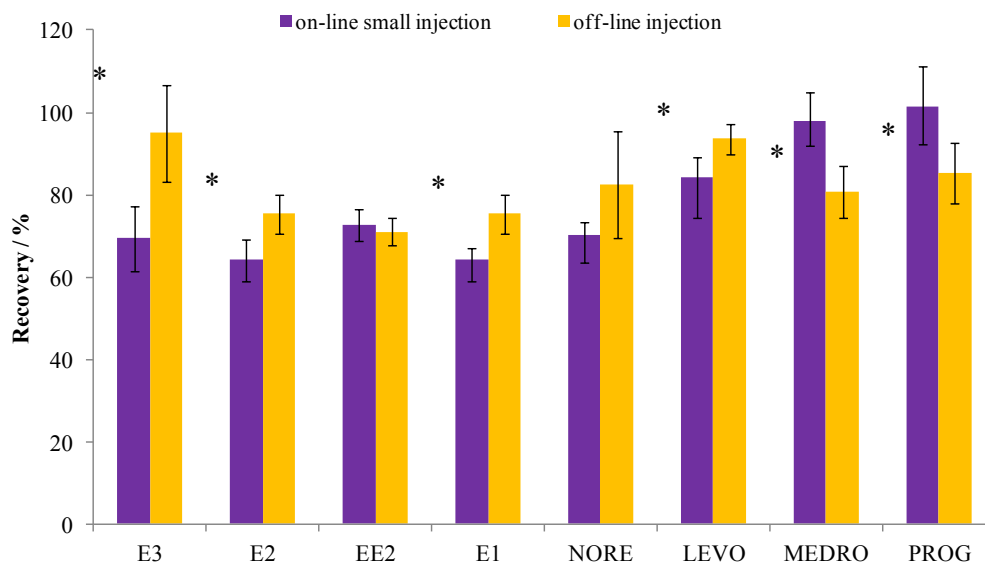
**Figure 4S - 5** Comparison of recovery values (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ) on different filter materials, cellulose acetate (CA), glass fiber (GF), mixed cellulose ester (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC) and polyethersulfone (PES), for selected steroid hormones. Tests were done in spiked ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) HPLC grade water (A). GF, for three out of the eight steroid hormones, gave significantly higher (\*,  $P < 0.05$ ) recovery values. Recovery values for PROG in HPLC grade water (A) were significantly higher ( $\dagger$ ,  $P < 0.05$ ) than in affluent wastewater.



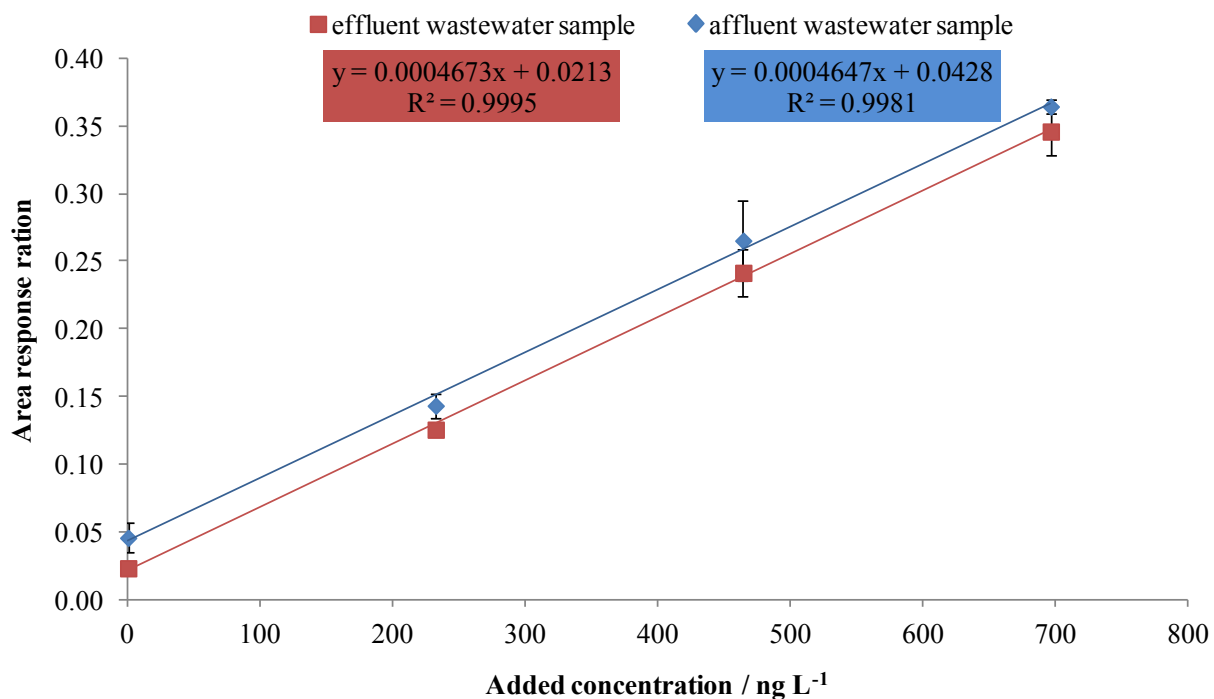
**Figure 4S - 6** Signal to noise (S/N) ratios as a function of injection volumes (1 and 10-mL) for a mix steroid hormone solution ( $200 \text{ ng L}^{-1}$ ) in analyte free affluent wastewater. The maximum injectable volume is represented by the last point of the linear regression lines. A sample loading volume between 1 and 10 mL, without loss of analyte and linearly higher S/N values, is possible in affluent wastewater.



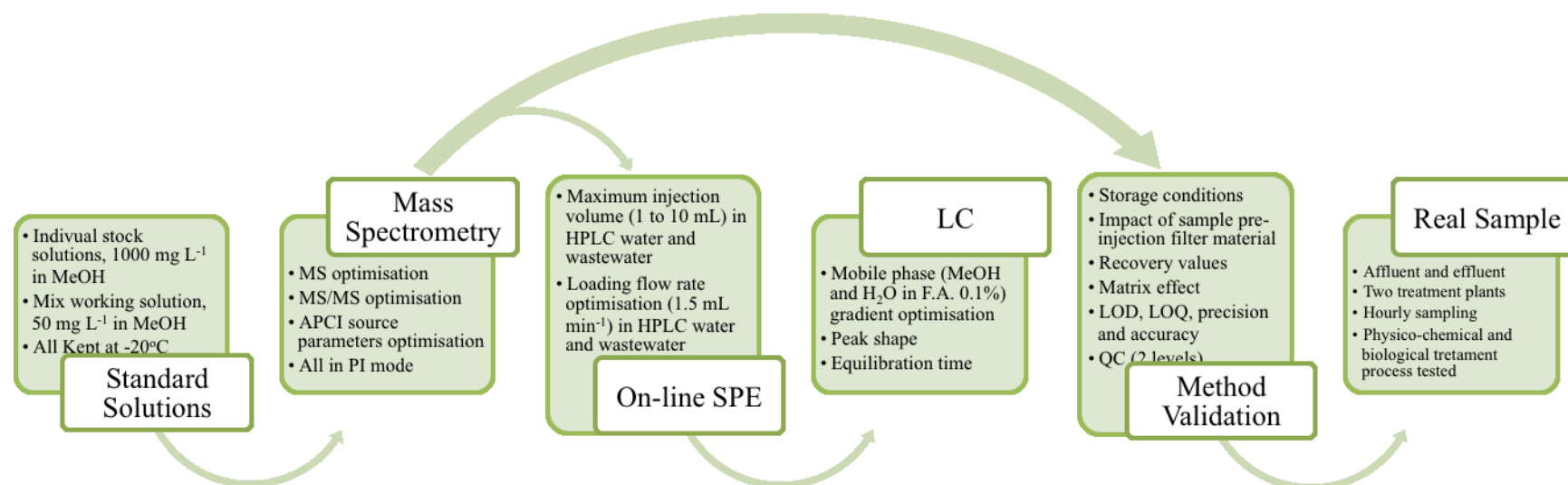
**Figure 4S - 7** Matrix effect (mean $\pm$ SD, n=7), expressed as percentages, determined by comparing peak areas of spiked steroid hormone free affluent wastewater to the ones found in HPLC water according to a 10-mL injection volume at 100 ng L<sup>-1</sup> and 500 ng L<sup>-1</sup>.



**Figure 4S - 8** Recovery values (mean  $\pm$  SD) were evaluated for the on-line SPE method. The mean peak areas ( $n=5$ ,  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ) of the selected steroid hormones of, *i*) a direct chromatographic injection ( $25 \mu\text{L}$ , off-line injection) and *ii*) an on-line small injection ( $100 \mu\text{L}$ , with a  $100 \mu\text{L}$  loop) were compared with those of the on-line high volume injection ( $10 \text{ mL}$ ) used for sample analysis. The symbols (\*) represent statistically significant ( $P < 0.05$ , with  $\text{SD} \leq 15\%$  in all cases) different recovery values between methods.



**Figure 4S - 9** Examples of the standard addition curves for WWTP-A at time one (Time 1, **Tableau 4-7** in main text) in affluent and effluent wastewater samples for estrinol (E3). Solid lines represent the linear regressions of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) and linear regression equations given.



**Figure 4S - 10** Flow chart summarizing the analytical step used during method development.

**Tableau 4S - 1** Physico-chemical Properties of Selected Steroid Hormones.

Steroid Hormones	MW <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	Water solubility <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> at 20°C)	Vapor pressure <sup>a</sup> (mm Hg)	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>b</sup>
Estrone (E1)	270.4	30	$1.4 \times 10^{-7}$	3.13	10.3
Estradiol (E2)	272.4	3.6	$1.3 \times 10^{-8}$	4.01	10.5
Ethinylestradiol (EE2)	296.4	11.3	$2.7 \times 10^{-9}$	3.67	10.4
Estriol (E3)	288.4	441	$1.9 \times 10^{-10}$	2.45	----
Progesterone (PROG)	314.5	8.8	$1.3 \times 10^{-6}$	3.87	----
Levonorgestrel (LEVO)	312.5	2.1	$3.9 \times 10^{-10}$	3.48	19.3
Norethindrone (NORE)	298.4	7.0	$7.3 \times 10^{-9}$	2.97	19.3
Medroxyprogesterone (MEDRO)	344.5	2.9	$1.9 \times 10^{-10}$	3.50	17.6

<sup>a</sup> The data was collected from the SRC PhysProp database. <http://www.syrres.com> [350]

<sup>b</sup> The pK<sub>a</sub> values for E1, E2 and EE2 are experimental and taken from the literature [351] whereas the values for LEVO, NORE and MEDRO are predicted values listed according to the drug bank database. <http://www.drugbank.ca>



**Tableau 4S - 2** Method validation results for linearity ( $R^2$ ), %-error and homo/heteroscedasticity test (Breusch-Pagan) for the calibration curve in HPLC grade water and affluent (Affl) wastewater.

Steroids	N <sup>a</sup>		R <sup>2b</sup>		Highest calibration point <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )		%-error <sup>d</sup> (back calculation of STD)				Homo/Heteroscedasticity <sup>e</sup> (Breusch-Pagan test p-value = 0.05)	
	HPLC water	Affl	HPLC water	Affl	HPLC water	Affl	HPLC water		Affl		HPLC water	Affl
					highest	lowest	highest	lowest	highest	lowest		
E3	8	6	0.9998	0.9981	1525	3041	12	1.0	18	0.9	0.057	0.650
E2	7	6	0.9998	0.9996	1014	3029	17	0.1	12	0.3	0.969	0.746
E1	6	6	0.9996	0.9987	1030	3077	15	0.4	17	0.4	0.695	0.298
EE2	7	6	0.9998	0.9989	1030	3077	19	0.1	17	0.8	0.096	0.084
NORE	7	6	0.9990	0.9986	1542	3121	16	1.3	10	0.1	0.054	0.315
LEVO	6	6	0.9991	0.9962	1531	3053	19	0.3	14	0.2	0.320	0.193
MEDRO	7	6	0.9989	0.9987	1543	3122	15	1.2	11	0.9	0.376	0.716
PROG	7	6	0.9994	0.9994	1579	3184	14	0.1	11	1.8	0.642	0.252

<sup>a</sup> Number (N) of calibration standards (STDs) used to build the calibration curves.

<sup>b</sup>  $R^2$  determined by internal standard calibration for spiked solution of analyte free wastewater (n=2, with six to eight point calibration standards).

<sup>c</sup> This value was not determined until saturation of signal (ULOQ), but was evaluated according to the maximum expected concentration in the environment or to confirm linearity for the optimization parameters of the method.

<sup>d</sup> %-error is calculated by using the following equation:  $\% \text{-error} = (\text{measured}_{\text{concentration}} - \text{expected}_{\text{concentration}} / \text{expected}_{\text{concentration}}) \times 100$ . The expected concentrations are the ones corresponding to the prepared standards (STDs) used to build the calibration curves, whereas the measured concentration is obtained by back calculating the response (area ratio) from the build calibration curve equation. The back-calculated concentrations of calibrant standards were acceptable if within 15 % of the nominal value, except for the determined LOQ for which a 20 % error was deemed satisfactory. The highest %-errors are the ones given by the LOQ.

<sup>e</sup> Homo/heteroscedasticity test using the Breusch-Pagan test with a  $P$  value = 0.05. The null hypothesis (constant variance) is rejected if the p-value smaller than 0.05.

## **Chapitre 4 Dégradation oxydative des hormones progestagéniques par le permanganate de potassium dans les eaux potables**

---

Degradation of progestagens by oxidation with potassium permanganate in drinking water

Paul B. Fayad, Arash Zamyadi, Romain Broseus, Michèle Prévost and Sébastien Sauvé,

2013

*Chem Cent J.*, 2013, 7(1) : 84-94.

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche: J'ai effectué les expériences, réalisé les analyses et l'interprétation des données.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires des Profs. Prévost et Sauvé, mes directeurs de thèse.

## Abstract

**Background :** This study investigated the oxidation of selected progestagenic steroid hormones by potassium permanganate at pH 6.0 and 8.0 in ultrapure water and natural waters, using bench-scale assays. Second order rate constants for the reaction of potassium permanganate with progestagens (levonorgestrel, medroxyprogesterone, norethindrone and progesterone) was determined as a function of pH, presence of natural organic matter and temperature. This work also illustrates the advantages of using a novel analytical method, the laser diode thermal desorption (LDTD-APCI) interface coupled to tandem mass spectrometry apparatus, allowing for the quick determination of oxidation rate constants and increasing sample throughput.

**Results :** The second-order rate constants for progestagens with permanganate determined in bench-scale experiments ranged from 23 to 368  $M^{-1} sec^{-1}$  in both natural waters and ultrapure waters with pH values of 6.0 and 8.0. Two pairs of progestagens exhibited similar reaction rate constants, i.e. progesterone and medroxyprogesterone (23 to 80  $M^{-1} sec^{-1}$  in ultrapure water and 26 to 149  $M^{-1} sec^{-1}$  in natural waters, at pH 6.0 and 8.0) and levonorgestrel and norethindrone (179 to 224  $M^{-1} sec^{-1}$  in ultrapure water and 180 to 368  $M^{-1} sec^{-1}$  in natural waters, at pH 6.0 and 8.0). The presence of dissolved natural organic matter and the pH conditions improved the oxidation rate constants for progestagens with potassium permanganate only at alkaline pH. Reaction rates measured in Milli-Q water could therefore be used to provide conservative estimates for the oxidation rates of the four selected progestagens in natural waters when exposed to potassium permanganate. The progestagen removal efficiencies was lower for progesterone and medroxyprogesterone (48 to 87 %) than for levonorgestrel and norethindrone (78 to 97 %) in Milli-Q and natural waters at pH 6.0-8.2 using potassium permanganate dosages of 1 to 5  $mg L^{-1}$  after contact times of 10 to 60 min.

**Conclusion :** This work presents the first results on the permanganate-promoted oxidation of progestagens, as a function of pH, temperature as well as natural organic mater (NOM). Progestagen concentrations used to determine rate constants were analyzed using an ultrafast

laser diode thermal desorption interface coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of water sample for progestagens.

**Keywords**

Oxidation, Potassium Permanganate, Steroid hormones, LDTD-APCI-MSMS, Endocrine disruptors, Kinetic rate constant

## 4.1 Introduction

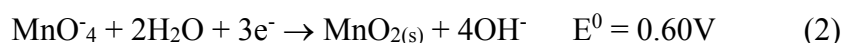
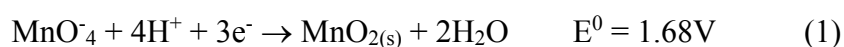
Many endocrine-disrupting compounds (EDCs), such as steroid hormones (SH) have been detected in waste and surface water matrices [135, 151, 293, 352]. They originate from naturally-occurring (e.g. normal urine excretion of estrogens from mammals) and synthetic (e.g. progestagens in oral contraceptives and hormone replacement therapy) sources. There has been growing concerns towards EDCs' effects on the reproductive physiology of wildlife populations at very low concentrations, i.e. from 0.1 to 1.0 ng L<sup>-1</sup> [85, 147, 314]. Given their strong endocrine-disrupting potency and their occurrence, selected estrogens (estradiol, estrone and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol) and progestagens (progesterone, levonorgestrel, medroxyprogesterone and norethindrone) have been targeted and detected in wastewater, surface water and drinking water [98, 163, 184, 294, 310-312].

Although the impact of natural and synthetic estrogens has been well documented, only a limited number of studies have been conducted on the ecotoxicological and environmental risk related to progestagens [353, 354]. Progestagens are steroid hormones that produce effects similar to those of progesterone, a C-21 steroid hormone involved in the female menstrual cycle, pregnancy and the embryogenesis of humans and other species [315]. Several synthetic progestagens have been developed, given that natural progesterone is very rapidly inactivated in the human body. Synthetic progestagens can have various hormonal activities, such as estrogenic, anti-androgenic and androgenic [354]. Their presence in wastewater treatment plant (WWTP) effluents can pose a risk for the aquatic environment given their potential for impact on the reproductive success and the chemoreception of fish [168, 355]. Synthetic progestagens were first developed and used in the 1960s as an effective method for contraception [356]. In Europe and America, the consumption rates of synthetic progestagens ranks as the first among all contraception methods, i.e. 33 % in the United States and as high as 58 % in some European countries[353]. In the United Kingdom, the estimated yearly usage of progestagens from oral contraception (~1723 kg/year) is higher than that of estrogens and androgens combined (~706 kg/year) [357]. In addition, the environmental amounts of progestagens and androgens excreted via urine is estimated to be 100 to 1000 times higher than that of estrogens in humans [358]. Therefore, progestagenic

steroid hormones will be discharged into environmental waters from WWTP effluents and such releases should be better documented.

Several studies conducted in numerous countries [98, 184, 315], have shown that WWTP effluents and receiving water bodies contain sufficient amounts of progestagenic compounds to induce harmful effects on fish, with their concentrations varying from 0.2 to 205 ng L<sup>-1</sup> for progestagens in wastewater samples [98, 315, 316]. With growing populations and increased discharge from WWTPs, the presence of progestagens in surface waters could be a cause for concern for drinking water treatment plants and therefore improved removal methods should be explored since conventional treatment methods have proven to be inadequate.

Permanganate [Mn(VII); KMnO<sub>4</sub>] is a relatively inexpensive and versatile oxidation agent with multiple applications in the degradation of multiples classes of contaminants, including phenolic and non-phenolic EDCs (dichlorvos, 4-t-butylphenol, estrone, triclosan and bisphenol-A) and various pharmaceuticals [243, 359-361]. Permanganate may oxidize organic compounds through several reaction pathways, including electron exchange, hydrogen abstraction or direct donation of oxygen [249]. In acidic conditions, permanganate will decompose according to reaction (1), whereas in strong basic medium, reaction (2) will occur [362]:



In contrast to other oxidants such as chlorine and ferrate (VI), permanganate is effective over a wide pH range and can control the formation of trihalomethanes and other disinfection by-products [244, 362]. In addition, permanganate will generate an insoluble environmentally benign reduction product (MnO<sub>2(s)</sub>), which can enhance coagulation and simultaneously adsorb trace metals before their removal by sedimentation/filtration [243, 245, 363]. Previous work has established oxidation rate constants for selected estrogens (estradiol, estriol and estrone) using potassium permanganate, with values ranging from 16 to 38 300 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at pH 5.0 to 12 [361, 364]. Currently, no published information for the removal of progestagens by potassium permanganate is available. Progestagens should have

different reactivity towards permanganate due to the absence of a phenolic moiety in their structures as compared to the estrogens.

Based on geology, climate, human influence and the surrounding watershed, different water sources will contain variable amounts of natural organic matter (NOM) with different characteristics, such as high and low molar mass organic material [365-367]. During the past 20 years, a significant increase in NOM concentrations has been observed in several surface water sources worldwide [368-371]. Permanganate has been shown to react with NOM compounds and should be considered when evaluating reaction rate constants [360, 361]. The operation of water treatment facilities will therefore be influenced by NOM, since it can interfere with the oxidation removal of other contaminants by competitive consumption [372]. The impact of temperature (an especially relevant parameter for water utilities spanning their operation over four distinct seasons) and the dissolved fraction of NOM on kinetic rates have not yet been studied for the oxidation of progestagens with potassium permanganate.

To date, analytical procedures used to determine oxidation rate constants for EDCs and steroid hormones have included the use of chromatography (liquid or gas) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS), ultraviolet or diode array detection [203]. Fayad *et al.* [290] developed a sensitive method enabling high-throughput sample analysis of eight selected steroid hormones using a novel sample introduction method, LDTD-APCI coupled to MS/MS. The analysis time is achieved in seconds (<10 sec) compared to several minutes using the more traditional chromatography methods. As a result, the identification and quantification of the studied compounds will be much faster, the total analysis cost will be reduced and sample throughput will be significantly increased.

The objectives of this study were to: *i*) determine the rate constants for the reaction of potassium permanganate with progestagens (levonorgestrel, medroxyprogesterone, norethindrone and progesterone) in pure water and drinking water using laboratory bench-scale assays, *ii*) evaluate the influence of operating conditions, i.e. pH, presence of NOM and temperature, on permanganate rate constants, *iii*) assess the validity of the determined rate constants when permanganate oxidation is applied to natural waters. Furthermore, this work illustrates the advantages of using a novel analytical method, the LDTD-APCI-MS/MS

apparatus, which is an alternative approach to chromatographic methods. This analytical approach facilitates the implementation of large experimental designs that require the evaluation of many different conditions and various time intervals. This method has allowed us to realize a quick determination of oxidation rate constants, while lowering analysis cost (no chromatography system is necessary) and increasing sample throughput. To the best of our knowledge, this paper presents the first results on the permanganate-promoted oxidation of steroid hormones without aromatic moieties, i.e. progestagens, as a function of pH, temperature as well as NOM levels.

## 4.2 Experimental

### 4.2.1 Chemicals

The selected steroid hormones (levonorgestrel (LEVO), medroxyprogesterone (MEDRO), norethindrone (NORE) and progesterone (PROG)) used for this study are listed in Additional file 1: **Tableau 5S-1** with their molecular structures presented in **Figure 5S-1**. All progestagen standards (purity  $\geq 97$  %) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Isotopically-labeled  $17\alpha$ -ethinylestradiol, [ $^{13}\text{C}_2$ ]-EE2, was used as an internal standard (IS) and obtained from ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada). Other chemicals, including potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ), potassium phosphate (monobasic and dibasic) and ascorbic acid were of analytical grade and used without further purification. All solvents used were of HPLC grade purity from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and ultrapure water (18 M $\Omega$  cm) used was produced with a Milli-Q (Millipore, USA) apparatus.

Individual steroid hormone stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1000 mg L $^{-1}$  and kept at  $-20^\circ\text{C}$  in amber vials for a maximum of three months. A mixed steroid hormone working solution was prepared prior to the experiments at a concentration of 200 mg L $^{-1}$  by dilution in MeOH of individual stock solutions aliquots for spiking solutions at the desired concentrations. Phosphate buffers of pH 6 and 8 (final concentrations: 50 mM) were prepared by dissolution of the commercial compounds in water. Potassium permanganate working solution (5.638 mmol L $^{-1}$ ), ascorbic acid working solution



(65.68 mmol L<sup>-1</sup>) and other reagents were also freshly prepared in Milli-Q water prior to the experiments and stored in amber bottles at 4°C.

#### 4.2.2 Water quality characterization

For the laboratory bench-scale experiments, filtered surface water samples were taken from drinking water treatment plants (DWTPs) in the province of Quebec, Canada. The first DWTP (DWTP A) takes its source in the St-Lawrence River (Quebec, Canada) and produces filtered water with a DOC of 2.3 mg C L<sup>-1</sup>, an alkalinity of 80 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, UV absorbance (at 254 nm) of 0.027 cm<sup>-1</sup>, and a pH of 8.24. The second DWTP (DWTP B) draws from the Des Prairies River (Quebec, Canada) and produces water with a DOC of 1.89 mg C L<sup>-1</sup>, an alkalinity of 27 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, UV absorbance (at 254 nm) of 0.047 cm<sup>-1</sup>, and a pH of 6.30. Natural water samples were not adjusted for pH and oxidation was carried out at ambient pH. The water samples were not analyzed for steroid hormones prior to oxidation experiments since their concentrations are orders of magnitude lower than the concentration spiked during the bench-scale experiments, as previously documented [373]. The water samples were collected in 10 L polypropylene carboys washed and rinsed successively with distilled and ultrapure water (Milli-Q). Natural water samples were filtered (0.45 µm polyethersulfone) and kept at 4°C prior to the oxidation experiments. Prior to DOC analyses, samples were passed through pre-rinsed (1 L ultrapure water) 0.45 µm cellulose nitrate Supor-450 membrane filters (PALL Life Sciences, USA). DOC measurements were made using a 5310C total organic carbon analyzer (Sievers Instruments Inc., USA).

#### 4.2.3 Analytical methods

The validation and optimization parameters of the LDTD-APCI-MS/MS method used for the detection and quantification of the selected steroids were previously described [290]. Briefly, water samples recuperated from the bench-scale oxidation experiments were first spotted (2 µL) into the LazWell 96-well polypropylene plate cavities and then left to dry (in a forced air oven at 30°C). Upon operation, a glass transfer tube is inserted into a well by an air-powered piston to avoid any sample loss. An infrared (IR) laser diode (980 nm, 20 W,

continuous) is then focalized to impact the back of the metal inserts, thermally desorbing the dried sample which is vaporized into the gas phase. The uncharged analyte molecules travel along the transfer tube by a carrier gas to eventually reach the corona region for ionization by APCI and then be transferred to the MS inlet [290]. The MS/MS parameters for the selected steroid hormones are presented in Additional file 1: **Tableau 5S-2**. Further details of the theory and principles behind the LDTD (Phytronix Technologies, Quebec, QC, Canada) are provided in the SI (Text S1).

In the kinetic experiments, permanganate was analyzed at 515 nm with a spectrophotometer (Varian-Cary 100, Victoria, Australia) in a 1-cm quartz cell, by the *N, N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) colorimetric method [374].

#### **4.2.4 Laboratory bench-scale experiments**

Oxidation experiments with potassium permanganate were conducted in 500 mL amber bottles (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada). All reactor assays were performed in duplicates. For ultrapure water (Milli-Q) samples, the pH was adjusted to 6.0 and 8.0 using the appropriate buffered phosphate solutions prior to the oxidation tests. It has been reported that phosphate buffers can enhance oxidation by permanganate of a certain number of phenolic compounds (i.e. triclosan, phenol, 2,4-dichlorophenol [375, 376]). This is in contrast with several other studies performed on non-phenolic and phenolic compounds alike (e.g. chlorinated ethylenes, microcystins and carbamazepine) where phosphate buffer had no reported impact on oxidation mechanisms using permanganate [243, 362, 377]. There are no reported studies in the literature that would suggest that progestogenic-like steroid hormones (non-phenolic) would be influenced by the addition of phosphate buffer for permanganate oxidation. For DWTP A and DWTP B effluents samples, buffered solutions were not necessary since their natural pH values were 8.24 and 6.30, respectively. Phosphate buffers were only used for the assays using ultrapure water. The pH values in the reactors were constant throughout the oxidation tests with changes between the initial and final pH not exceeding 0.2.

In order to perform the oxidation experiments at different temperatures (from  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  to  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), the reactors were placed in a temperature-controlled water bath. The initial concentrations of steroid hormones spiked in the reactors ranged from 0.883 to 9.76  $\mu\text{M}$ , with 17 to 53  $\mu\text{M}$  of permanganate added for the oxidation tests. Aliquots of 1.8 mL were collected at specific time intervals into a 2 mL amber vial containing a stoichiometric ratio of ascorbic acid to immediately quench the residual permanganate. It was previously established that ascorbic acid was suitable to quench oxidant residuals during sampling, while not affecting the stability of the studied ECDs [373]. Samples were then analyzed by LDTD-APCI-MS/MS to determine the residual concentration of steroid hormones.

The solvent used for the dissolution of the steroid hormones spiked in the reactors was MeOH. Initial tests were performed with acetonitrile and MeOH to assess their impact on permanganate decay rates in reactors with ultrapure water (without steroid hormones). Using MeOH showed that there was no decrease of initial permanganate concentration for up to 60 min contact times (Additional file 1: **Figure 5S-3**). Reactor blank experiments (no steroid hormones added) for both natural waters with the addition of permanganate were also conducted. All rate constants were determined under pseudo-first-order conditions, with permanganate in excess, in a batch reactor in ultrapure and natural waters at pH 6.0-8.2.

#### 4.2.5 Determination of rate constants for the reaction potassium permanganate

The kinetics of the reactions of permanganate with organic and inorganic compounds is typically second order, i.e. first order with respect to the oxidizing agents (OAs) and the contaminant concentrations [232]. The degradation of steroid hormones by permanganate can be described with the following equation:

$$-\frac{d[\text{TC}]}{dt} = k_{\text{OA}} [\text{OA}] [\text{TC}] \quad (3)$$

Where TC = target compounds and  $k_{\text{OA}}$  = reaction rate constant for the applied oxidant. The rate constant is obtained from the integration of Eq. (3):

$$\ln \left( \frac{[\text{TC}]_t}{[\text{TC}]_0} \right) = -k_{\text{OA}} \int_0^t [\text{OA}] dt \quad (4)$$

where  $\int_0^t [\text{OA}] dt$  is the time-integrated oxidant concentration. The value of the second-order rate constant can be found from the gradient of a plot of  $\ln$  removal of the target compound against the time-integrated oxidant concentration. The latter defines an oxidant exposure (CT). In this study, CT values ( $\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were performed using the integrated CT concept [378], for which the effective CT at time  $t$  (min) is equal to the area under the decay curve at that time. CT values were calculated using the oxidant concentration profiles (Eq. (4)) and assuming a simple first-order decay:

$$\text{CT}_{\text{effective}} = \int C(t) dt = \frac{C_0}{k'} [1 - \exp(-k' \cdot t)] \quad (5)$$

where  $C$  = oxidant residual ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $C_0$  = initial oxidant residual ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) determined from the exponential fit of the relation between the oxidant residual and the time (min);  $k'$  = oxidant first-order decay constant ( $\text{min}^{-1}$ ).

## 4.3 Results and Discussion

### 4.3.1 Permanganate decay in ultrapure and drinking water

Experimental decay data fit the first-order decay rates of permanganate ( $R^2 \geq 0.90$ ) in ultrapure and effluent waters (Additional file 1: **Figure 5S-3**). The values of apparent first-order rate constants for permanganate ( $k_{\text{OA}}$ ,  $\text{sec}^{-1}$ ), with and without the addition of steroid hormones (SH) were calculated by linear regression and resulting apparent rate constants are summarized in **Tableau 5-1**, in drinking waters at ambient pH 6.3 for DWTP B and pH of 8.2 for DWTP A. The rate constants increased slightly in the presence of SHs ( $1.2$  and  $1.13 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ) compared to natural waters without the addition of SHs ( $0.57$  and  $0.44 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ), and were not influenced by pH (**Tableau 5-1**). The decay rates with  $\text{KMnO}_4$  were

similar in ultrapure water and natural waters in the presence of SHs at pH 6.3 and 8.2 ( $1.0\text{--}1.2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ). This suggests that the influence of NOM did not further contribute to permanganate decay when compared to the presence of SHs.

**Tableau 4-1** First-order apparent rate constants ( $k$ ,  $\text{sec}^{-1}$ ) for permanganate decay with and without progestagens in drinking waters at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  for pH 6.3 (DWTP B, DOC  $1.89 \text{ mg C L}^{-1}$ ) and 8.2 (DWTP A, COD  $2.3 \text{ mg C L}^{-1}$ )<sup>a</sup>

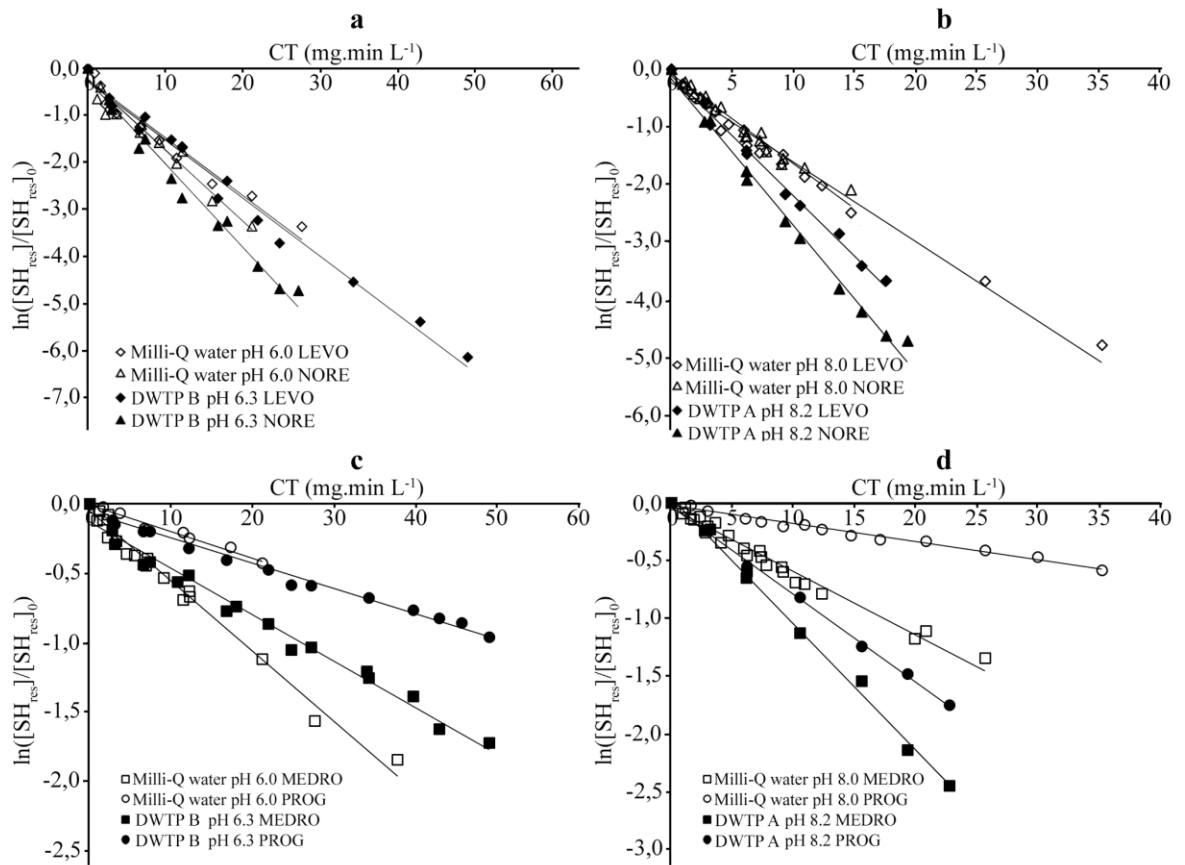
	$k_{\text{KMnO}_4} (\times 10^{-3} \text{ sec}^{-1})$	
	Progestagens	
<i>Natural waters</i>	<i>pH 6.3</i>	<i>pH 8.2</i>
without SH	$0.57 \pm 0.02$ (0.99)	$0.44 \pm 0.06$ (0.99)
with SH	$1.2 \pm 0.1$ (0.94)	$1.13 \pm 0.07$ (0.98)
<i>Milli-Q water</i>	<i>pH 6.0</i>	<i>pH 8.0</i>
with SH	$1.1 \pm 0.2$ (0.90)	$1.0 \pm 0.2$ (0.93)

<sup>a</sup> Values in parentheses represent coefficients of determination ( $R^2$ ) and uncertainties on  $k$  values represent calculated standard deviation (SD) given from the linear regression equation.

### 4.3.2 Oxidation of steroid hormones

Previous studies have investigated the reaction between oxidizing agents (permanganate and chlorine) with estrogenic steroid hormones [232, 361]. They have shown that the reaction followed second-order kinetics overall, first-order with respect to estrogens and oxidation agents (OA). In determining the apparent first-order rate constants, the initial concentration of SH found in natural waters was considered negligible (low  $\text{ng L}^{-1}$ ), about a thousand time lower than the spiked concentration used in batch reactors ( $\sim 0.5$  to  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Additional file 1: **Figure 5S-3** shows that the decay of the four progestagens exposed to permanganate follows the second-order rate law expressed by Eq. (3). The tabulated first-order rate constants (**Tableau 5-1**) were derived from the dissolved permanganate residual decay curves in the presence of SH (Additional file 1: **Figure 5S-4**) from which CT values were calculated using Eq. (5). The second-order rate constants ( $k_{\text{OA-SH}}$ ,  $\text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) were then

measured by linear regression of  $\ln([\text{SH}_{\text{res}}]/[\text{SH}_{\text{res}}]_0)$  as a function of CT ( $\text{mg}\cdot\text{min L}^{-1}$ ), as shown in **Figure 5-1**. The oxidation experiments were conducted at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , and the calculated rate constants obtained from duplicate experiments are presented in **Tableau 5-2**. The standard deviations (SD) remained below 10% in all case with  $R^2 \geq 0.96$  for all kinetic plots. The second order reaction rate constant for progestagens with permanganate varied from 23 (PROG) to 368 (NORE)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in Milli-Q and natural waters at both pH values (6.0 and 8.0). Two pairs of progestagens exhibited similar reaction rate constants, i.e. PROG and MEDRO (23 to 80  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in Milli-Q water and 26 to 149  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in natural waters, at pH 6.0 and 8.0) and LEVO and NORE (179 to 224  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in Milli-Q water and 180 to 368  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in natural waters, at pH 6.0 and 8.0). The different ranges of kinetic decay rates could be related to the differences in their chemical structures and attack sites (Additional file 1: **Figure 5S-1**). This similarity was also observed when ozone was applied to progestagens in Milli-Q water (pH 8.10) at  $20^\circ\text{C}$ , where PROG and MEDRO had rate constants of 601  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  and 558  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ , respectively [373]. Several proposed mechanisms suggest that the potential sites of attack on the four progestagens by permanganate are the double bond between C4-C5, the hydroxyl group on C12 and the double-bonded oxygen on C3 (Additional file 1: **Figure 5S-1**) [245, 249]. The presence of the ethynyl groups on C12 for LEVO and NORE (Additional file 1: **Figure 5S-1**) are reputed to react with permanganate [249] and could explain the higher rate constants we observed relative to PROG and MEDRO (**Tableau 5-2**). The very low rate constants measured for PROG could result from the absence of a hydroxyl function on the C12, lowering the potential attack sites for permanganate.



**Figure 4-1** Second-order rate kinetic plots for the oxidation of progestagenic steroid hormones (SH) by permanganate and the resulting effect of dissolved natural organic matter (NOM) from drinking waters (DWTP A and DWTP B) for progestagens at a) and c) pH 6.0, b) and d) pH 8.0 when compared to Milli-Q water according to progestagens having similar reaction rate constants. Experimental conditions were,  $[KMnO_4]_0$  from 17 to 39  $\mu M$  and  $[progestagens]_0$  from 1.9 to 3.9  $\mu M$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2 \geq 0.96$ ).

**Tableau 4-2** Steroid hormone (SH) oxidation rate constants ( $k$ ,  $M^{-1} sec^{-1}$ ), removal efficiency (%) between 10 and 60 min and half-lives ( $t_{1/2}$ , min) derived from oxidation experiments using permanganate in Milli-Q and drinking waters (DWTP A, pH 8.2, DOC 2.3 mg C L<sup>-1</sup> and DWTP B, pH 6.3, COD 1.89 mg C L<sup>-1</sup>) at  $22 \pm 2^\circ C$  for pH 6.0 and 8.0<sup>a</sup>

Compounds	Milli-Q water						Natural waters					
	$k_{KMnO_4-SH}$ ( $M^{-1} sec^{-1}$ )		Removal (%)		$t_{1/2}$ (min)		$k_{KMnO_4-SH}$ ( $M^{-1} sec^{-1}$ )		Removal (%)		$t_{1/2}$ (min)	
	pH 6.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 8.0	pH 6.3	pH 8.2	pH 6.3	pH 8.2	pH 6.0	pH 8.0
LEVO	179 ± 10 (0.96)	199 ± 6 (0.98)	89 ± 12	89 ± 12	5.6	5.0	180 ± 5 (0.96)	302 ± 9 (0.98)	97 ± 8	90 ± 1	5.6	3.3
MEDRO	73 ± 2 (0.98)	80 ± 2 (0.98)	57 ± 20	58 ± 12	14	12	49 ± 2 (0.98)	159 ± 4 (0.99)	71 ± 1	87 ± 4	2.1	6.3
NORE	219 ± 13 (0.96)	224 ± 8 (0.97)	90 ± 11	78 ± 3	4.6	4.5	257 ± 10 (0.98)	368 ± 11 (0.98)	96 ± 2	92 ± 1	3.9	2.7
PROG	28 ± 2 (0.97)	23 ± 1 (0.98)	48 ± 11	41 ± 5	36	44	26 ± 2 (0.98)	109 ± 4 (0.98)	58 ± 3	80 ± 20	38	9.2

<sup>a</sup> Values in parentheses represent coefficients of determination ( $R^2$ ) and uncertainties on  $k$  values represent calculated standard deviations (SD) given from the linear regression equation. Uncertainties on removal values represent standard deviations (SD) between replicates ( $n = 2$ ).



**Tableau 5-2** also shows that pH did not have an impact on rate constants for progestagens either in ultrapure or drinking water. This was expected since these compounds do not present any acid or basic character with predicted  $pK_a$  values between 17.0 and 19.3 for LEVO, NORE and MEDRO (Additional file 1: **Tableau 5S-1**). The influence of dissolved organic matter was also investigated by using natural waters with different levels of NOM (DWTP A with  $2.3 \text{ mg C L}^{-1}$  and DWTP B with  $1.89 \text{ mg C L}^{-1}$ ) and conducting the oxidation experiments at ambient pH. With aromatic moiety being one of the main predicted sites of attack for permanganate, a competition effect is possible with background components in waters that contain electron rich moieties, such as humic acids [379]. **Figure 5-1a and 5-1c** as well as **Tableau 5-2**, show that at pH 6 the presence of NOM, regardless of the concentration present, did not have a significant effect on the rate constants with permanganate for LEVO, NORE and PROG (e.g.  $179$  to  $180 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  for LEVO, in Milli-Q (pH 6.0) and effluent waters (DWTP B, pH 6.3). On the other hand, oxidation of MEDRO was limited in effluent waters at pH 6.3. At higher pH, the presence of NOM systematically improved the efficiency of the oxidation of progestagens, as illustrated in **Figure 5-1b and 5-1d** as well as in **Tableau 5-2**.

Several ligands such as phosphate buffer, EDTA, and humic acid, have been shown to exert pH-dependent oxidation enhancement of phenolic compounds [375] supporting the hypothesis of a catalytic role produced by the aqueous manganese intermediates ( $\text{Mn}(\text{INT})_{\text{aq}}$ ) which are seemingly stabilized by metal-binding ligands [376]. This was illustrated with an enhancement of the oxidation of phenolic compounds that was also noted for the presence of NOM in river water and wastewaters and attributed to the formation of such unidentified  $\text{Mn}(\text{INT})_{\text{aq}}$  species with a pH dependency of the  $r_{\text{ligand}}$  up to pH 9 [376].

The different trends observed in our data may reflect the fact that the role of ligands in Mn-promoted oxidation is closely related to the structure of the target organic molecules, as proposed by Jiang et al. [376]. A significant improvement of oxidation of phenolic compounds using humic acids of various origins has been reported [375, 376, 380]. One could hypothesize that the presence of NOM in this case also contributes to enhance the oxidation of the progestagens. Hu et al. [243] have attributed the degradation efficiency of the oxidation of carbamazepine in the presence of permanganate to an electrophilic attack, the stabilization of  $\text{Mn}(\text{INT})_{\text{aq}}$  could also help improve this electrophilic attack onto the

molecules of progestagens. In the case of our target compounds, NOM did not enhance oxidation at a pH 6.3 while a significant and consistent enhancement was noted at pH 8. Hu et al. did not observe any enhancement of carbamazepine oxidation at pH 5, 6 and 7 in the presence of 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> of humic acids [243]. Within our dataset, it is difficult to fully dissociate what proportion of the difference in efficiency between pH values of 6 and 8 is attributable an effect due an unknown difference in the chemistry of both natural waters tested. With the presumption that the effect is solely attributable to the pH difference, the nature of the NOM as a function of pH could also partly explain the observed results.

Dissolved humic substances have been known to influence removal of organic compounds from municipal and industrial wastewaters [381, 382] as well as being responsible for capturing and transporting both nonpolar (such as p,p'-DDT, 2,4,5,2',5'-PCB and 2,4,4'-PCB) and polar (pesticides) contaminants [383, 384]. This could be a result of the humic macromolecules that have been shown to be densely coiled at lower pH values, such as that of the DWTP B (pH = 6.3) effluent (**Figure 5-1a and 5-1c**) for progestagens, as depicted by the random coil model [385]. Therefore, *i*) the affinity of NOM to complex and stabilize Mn(INT)<sub>aq</sub> is lowered and the resulting catalytic activity is no longer observed and *ii*) progestagens (log K<sub>ow</sub> ≥ 2.97, Additional file 1: **Tableau 5S-1**) could be complexed by the humic macromolecules in their hydrophobic structural voids cavities [386] making them less available for oxidation by permanganate. Inversely, at more alkaline pH, such as that of the DWTP A (pH = 8.2) effluent (**Figure 5-1b and 5-1d**) for progestagens, there is formation of negatively charged carboxyl groups found in the humic macromolecules. This induces mutual repulsion and expansion of the formerly coiled macromolecules [387], making them more flexible and slightly more polar in nature, thus promoting its reactivity allowing for the formation of more stable Mn(INT)<sub>aq</sub> compounds while reducing the progestagens affinity with the NOM. The impact of the structure of the target compound, the nature of the ligand and the pH dependency of NOM on the kinetics of permanganate oxidation needs to be further investigated.

As the presence of NOM generally had little impact (at pH values around 6) or enhanced oxidation of the four progestagenic compounds tested (at pH values around 8), reaction rates measured in Milli-Q water could therefore be used by operators as a conservative estimate to predict the oxidation of the four selected progestagens in natural source waters when exposed

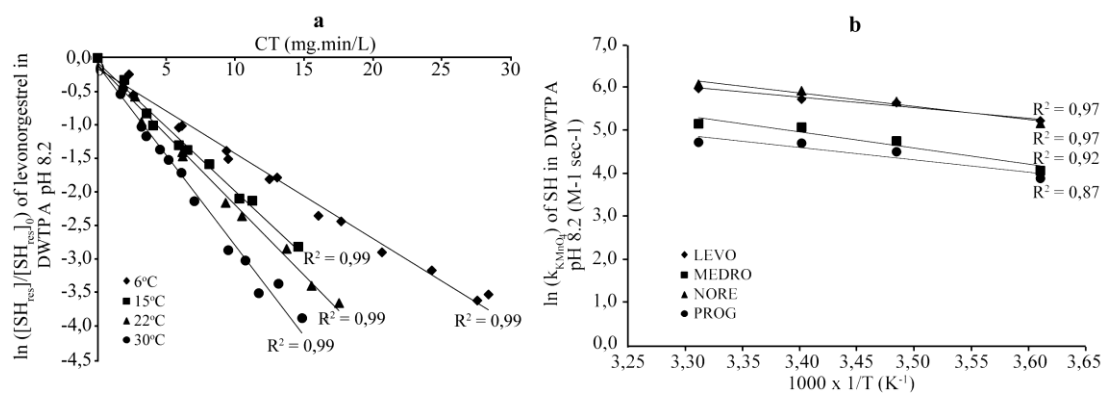
to permanganate. It could be presumed that under favorable conditions (alkaline pH and organic ligands) the oxidation can be enhanced relative to than predicted in pure water.

### 4.3.3 Effect of temperature on kinetic rate constants

Temperature dependence of the reaction between permanganate and progestagens was determined by measuring the rate constants at four different temperatures (6, 15, 22 and 30°C), at pH 8.0 (DWTP A) in drinking water. The effect of temperature on second-order rate constant plots is illustrated for LEVO in **Figure 5-2**, with the reaction rates increasing as a function of temperature. The corresponding second-order rate constants (**Tableau 5-3**) were used to calculate the activation energy by means of the linearized Arrhenius equation (Eq. (6)).

$$\ln(K_{KMnO_4-SH}) = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6)$$

with  $k$  the rate constant,  $E_a$  the experimental energy of activation,  $R$  the gas constant,  $T$  the absolute temperature (K) and  $A$  the frequency factor. After linear regression analysis ( $R^2 \geq 0.87$ ), the apparent activation energies ( $E_a$ ), ranging from 20 to 31  $\text{KJ mol}^{-1}$ , were calculated (**Tableau 5-3**). To the best of our knowledge, there are no published values for temperature dependent rate constants for progestagens. These  $E_a$  are lower than reported earlier for the oxidation of E1 by permanganate (43.07  $\text{KJ mol}^{-1}$ ) [24], while comparable to other organic compounds, such as cyanotoxins (28.8 and 20  $\text{KJ mol}^{-1}$ ) [362, 388] and chloroethylene (24.4 and 39.1  $\text{KJ mol}^{-1}$ ) [389, 390]. According to the activation energy values measured, a temperature increase of 10°C will raise the oxidation rate by a factor between 1.4-1.6. As a result, the impact of temperature could be a relevant parameter for water utilities where oxidation removal potential could be optimized according to weather conditions.



**Figure 4-2** Effect of temperature on the second-order decay of progestagens: a) levonorgestrel and b) its impact on measured rate constants for oxidation of progestagenic steroid hormones (SH) by permanganate. The experimental conditions were,  $[KMnO_4]_0$  from 38 to 53  $\mu M$ ,  $[progestagens]_0$  from 2.1 to 4.1  $\mu M$  in drinking water (DWTP A) at pH 8.2 and temperature ranging from 6 to 30°C. Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) also given.

**Tableau 4-3** Temperature effect on first-order apparent rate constants ( $k$ ,  $sec^{-1}$ ), oxidation rate constants ( $k$ ,  $M^{-1} sec^{-1}$ ) and activation energy ( $E_a$ ,  $KJ mol^{-1}$ ) for permanganate decay with and without progestagens (SH) in drinking water at pH 8.2 (DWTP A)<sup>a</sup>

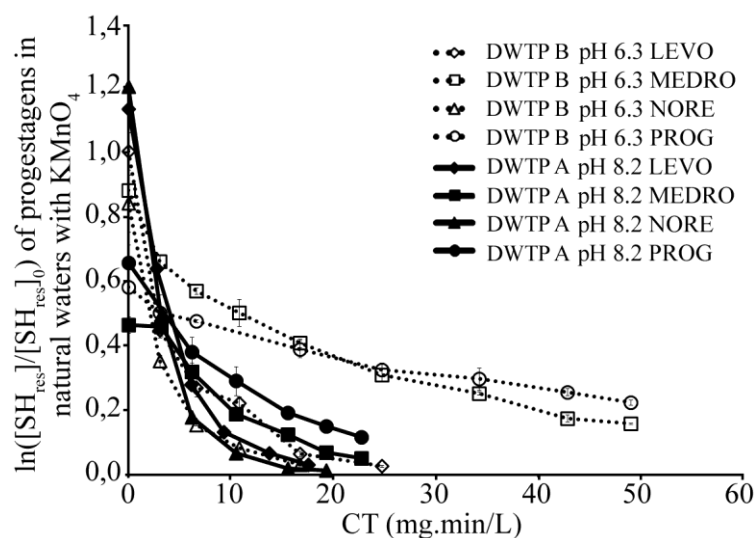
Compounds	Natural water DWTP A (pH 8.2)								$E_a$ ( $KJ mol^{-1}$ )
	$k_{KMnO_4} (\times 10^{-4} sec^{-1})$ without SH				$k_{KMnO_4-SH} (M^{-1} sec^{-1})$				
	5°C	15°C	22°C	30°C	5°C	15°C	22°C	30°C	
LEVO					184 ± 5 (0.99)	278 ± 9 (0.98)	302 ± 9 (0.99)	389 ± 13 (0.98)	20 ± 2
MEDRO					58 ± 1 (0.99)	115 ± 3 (0.99)	159 ± 4 (0.99)	171 ± 5 (0.98)	31 ± 2
	1.9 ± 0.2 (0.98)	1.8 ± 0.8 (0.82)	4.4 ± 0.6 (0.99)	5.4 ± 0.2 (0.94)	172 ± 8 (0.97)	288 ± 12 (0.98)	368 ± 11 (0.99)	429 ± 13 (0.98)	26 ± 2
PROG					48 ± 1 (0.99)	89 ± 2 (0.99)	109 ± 3 (0.93)	112 ± 3 (0.99)	23 ± 7

<sup>a</sup> Values in parentheses represent coefficients of determination ( $R^2$ ) and uncertainties on  $k$  values represent calculated standard deviation (SD) given from the linear regression equation.

#### 4.3.4 Removal efficiencies and half-life

The elimination of SH by permanganate in Milli-Q and in natural waters for pH 6.0 and pH 8.0, was investigated and values of removal percentage and half-life are summarized in **Tableau 5-2**.

Steroid hormone decay curves following oxidation with permanganate in drinking waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) for progestagens are presented in **Figure 5-3**. Removal efficiencies with permanganate were not affected by pH or dissolved NOM, with values from Milli-Q and drinking water being similar (considering standard deviations). The removal of progestagens was lower for both pairs (similar chemical structures) PROG and MEDRO than LEVO and NORE, i.e. 48 to 87% with half-lives between 2.1 and 44 min compared to 78 to 97% with half-lives between 2.7 and 5.6 min, in Milli-Q and natural waters at pH 6.0-8.2, respectively. This could be attributed to the presence of the ethynyl groups on C12 for LEVO and NORE (Additional file 1: **Figure 5S-1**). In the case of PROG and MEDRO, a positive impact of dissolved NOM is observed with lower half-lives and higher degradation rates in natural waters than in Milli-Q water, especially at pH 8.0. This background matrix of natural waters has been shown to accelerate the oxidation of estrogens by permanganate [361]. These values were measured under typically-applied permanganate dosages ( $1$  to  $5$  mg L<sup>-1</sup>) with a minimum contact time of 10 min and maximum of 60 min. A CT value of 25 mg.min L<sup>-1</sup> is needed to reduce concentration by 94 and 99% for LEVO and NORE, between 67 and 94% for MEDRO, whereas for PROG the removal ranged from 59 to 87%, at both pH 6.0 and 8.0 in Milli-Q and natural waters. The results for progestagens show that LEVO, NORE and MEDRO are most susceptible to permanganate attack with even better results in drinking water, especially for MEDRO at pH 8.0. PROG is less affected by permanganate and would require very long contact times for sufficient removal to occur which would not be representative of realistic operating conditions for typical water treatment plants.



**Figure 4-3** Steroid hormone (SH) decay curves following oxidation with permanganate in drinking waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) for progestagens.  $[KMnO_4]_0$  ranged from 17 to 39  $\mu M$ . Solid (DWTP A) and dotted (DWTP B) lines represent the trend of the measured data (symbols).

#### 4.4 Conclusion

Oxidation kinetics of four selected progestagens (progesterone, medroxyprogesterone, norethindrone and levonorgestrel) with permanganate were investigated as a function of pH, NOM and temperature. The second-order rate constants ranged for 23 to 224  $M^{-1} sec^{-1}$  in Milli-Q water and 26 to 368  $M^{-1} sec^{-1}$  in natural waters, at pH 6.0 and 8.0, respectively. It was found that a variation in pH did not significantly influence the rate constant. The impact of NOM at typical ranges found in natural waters was also minimal with a slight enhancement of oxidation at pH values around 8. The removal of progestagens was lower for both progesterone and medroxyprogesterone than for levonorgestrel and norethindrone, i.e. 48 to 87% with half-lives between 2.1 and 44 min compared to 78 to 97% with half-lives between 2.7 and 5.6 min, in Milli-Q and natural waters at pH 6.0-8.2, respectively.

This work demonstrates the potential of permanganate to oxidize progestagens in drinking water within the typical ranges of operational values of pH and NOM. Proper attention should be given to provide adequate CT values in order to ensure the efficient

removal of progestagenic steroid hormones and recalcitrant analogues. Further kinetic studies targeting the identification and environmental impact of possible by-products related to progestagens reaction with permanganate appear warranted.

## 4.5 Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## 4.6 Authors' contributions

PBF performed the main part of the experiments and drafted the manuscript. AZ and RB helped in the analysis of the data obtained, the drafting of the manuscript from oxidation experiments and assisted in performing the oxidation treatment bench-scale assays, respectively. MP and SS helped design the experiment, interpret and evaluate the results as well as revise the manuscript's writing. All the authors read and approved the final manuscript.

## 4.7 Acknowledgements

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

### ERRATUM

**Incorrect wording :** In the Original Contribution entitled “Degradation of progestagens by oxidation with potassium permanganate in wastewater effluents” published in the article of the May 15<sup>th</sup>, 2013, issue of the Chemistry Central Journal (2013; 7:84), there was incorrect

wording used throughout the text. The word wastewaters was replaced by drinking waters or natural waters in the title, the body of the text, Tables and Figures were necessary.



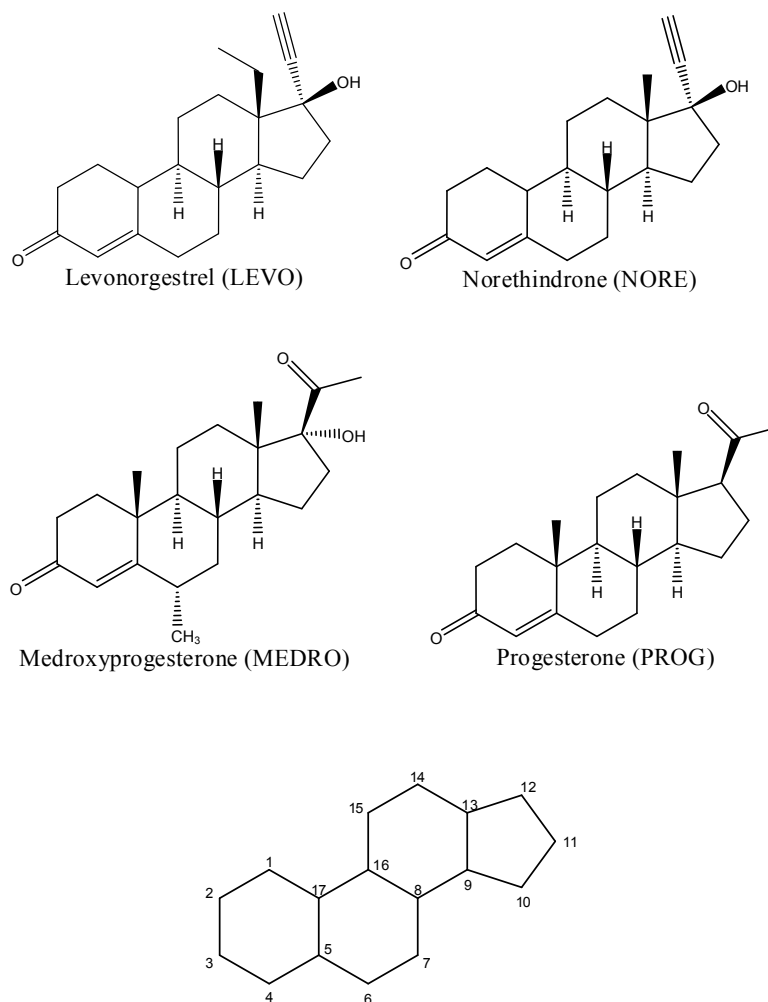
## **4.8 Supplementary material**

### 4.8.1 LDTD-APCI Source Principles

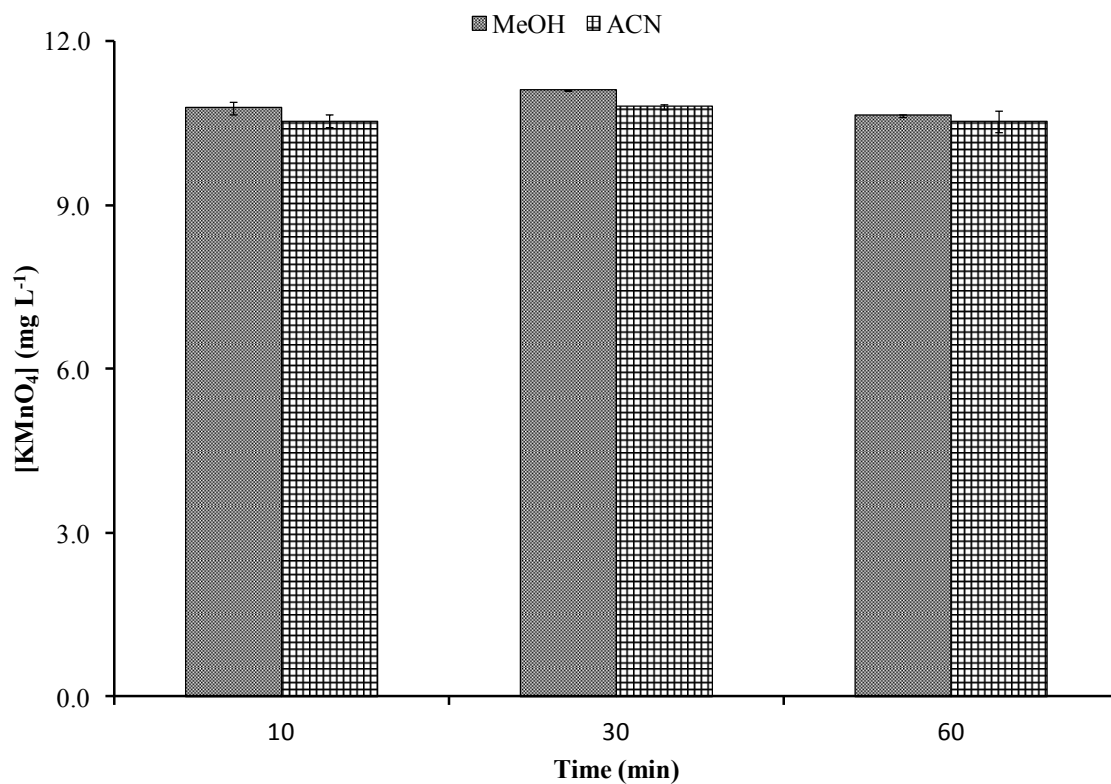
The Arrhenius plots comparing the logarithm of the kinetic rates of the temperature dependencies of vaporization (dissociation of intermolecular bonds) and molecular decomposition (dissociation of intramolecular bonds) against the inverse temperature ( $1/T$ ) would identify an intersection point at some value of  $1/T$ , above which the vaporization of the uncharged molecular species would be favored and below which decomposition would be observed [288, 289]. The heating rate of the LDTD laser is  $3000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  which allows the samples to be quickly heated at high temperatures, minimizing the time spent in the decomposition region and favoring vaporization which generates a greater amount of the uncharged molecular species.

The characterization of the thermal desorption processes associated with rapid sample heating and thin film deposition for the LDTD-APCI source have been shown on prednisone, a corticosteroid steroid hormone, that decomposed at a temperature of  $234^{\circ}\text{C}$  but was fully analyzed by LDTD-APCI-MS/MS at a desorption temperature of  $170^{\circ}\text{C}$ . Also sulfadiazine, a sulfonamide antibiotic, shows a desorption temperature observed between  $95^{\circ}\text{C}$  and  $140^{\circ}\text{C}$  though its bulk melting point is  $252\text{-}256^{\circ}\text{C}$  [283]. Unlike traditional LC-APCI, the LDTD-APCI ionization is performed in the absence of solvent reacting molecules as no liquid phase is introduced into the corona discharge region. Similarly to classical chemical ionization, the species present in the APCI region of the LDTD originate from gas-phase reactions involving proton transfer, governed by proton affinity in positive mode (PI) and gas-phase acidity in negative mode (NI), as well as charge exchange [303]. The solvent used for analyte deposition in LDTD-APCI will not induce signal suppression due to competition for protonation as can be the case in classical LC-APCI mobile-phase components [270, 304, 305]. In the absence of any mobile phase, it is the water traces in the carrier gas that will generate ionization in LDTD-APCI, since proton transfer in the PI mode mostly occurs between water cluster,  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$  where  $n = 0\text{-}4$  [391], and more basic analytes (higher proton affinity). Higher efficiency protonation in LDTD-APCI is accomplished in the presence of the smallest hydronium species because of their low proton affinity, i.e.  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $(\text{H}_2\text{O})\text{H}_3\text{O}^+$ . Larger water clusters will form when the humidity (water

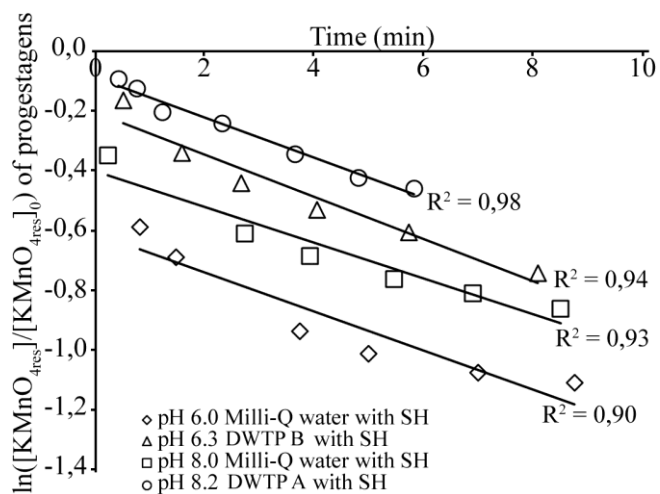
saturation) in the ionization region is increased and negatively impact the analyte ionization process [307]. The larger hydronium cluster, with higher proton affinity, will affect sensitivity towards low proton affinity molecules and decrease their fragmentation because of an excess of energy in protonation reactions [308]. The main advantage of using APCI with the LDTD is that it is less susceptible to matrix effects and ionization suppression than with electrospray ionization [309].



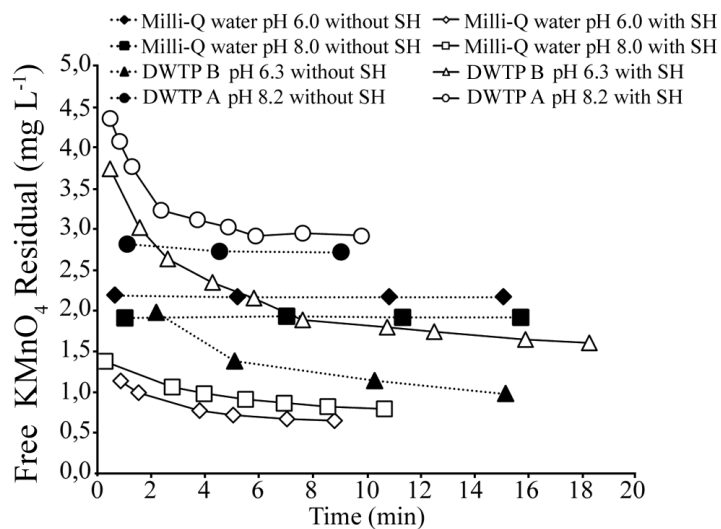
**Figure 5S - 1** Molecular structures of selected steroid hormones and their acronyms, with atom numbering for the base structure of steroid hormones.



**Figure 5S - 2** Impact of solvents (methanol, MeOH and acetonitrile, ACN) on permanganate decay in batch reactor conditions without the addition of steroid hormones. Experimental conditions were,  $[KMnO_4]_0 = 10 \text{ mg/L}$  at pH 8.0 in Milli-Q water with a 0.2% v/v addition of solvent into 500 mL batch reactor. Error bars represent the standard deviation of replicate measurements/batch ( $n = 3$ ).



**Figure 5S - 3** Pseudo-first-order kinetic plots corresponding to decay curves of permanganate with progestagens (LEVO, MEDRO, NORE and PROG) in ultrapure and drinking waters according to pH values (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3). Experimental conditions were,  $[\text{KMnO}_4]_0$  from 17 to 39  $\mu\text{M}$  and  $[\text{progestagens}]_0$  from 1.9 to 3.9  $\mu\text{M}$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) also given.



**Figure 5S - 4** Permanganate decay curves of a) permanganate with estrogens and b) permanganate with progestagens in Milli-Q and natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) waters according to pH values. Experimental conditions were,  $[\text{KMnO}_4]_0$  from 17 to 39  $\mu\text{M}$  and  $[\text{progestagens}]_0$  from 1.9 to 3.9  $\mu\text{M}$ . Solid and dotted lines represent the trend for the measured data (symbols).

**Tableau 5S - 1** Physico-chemical properties of selected steroid hormones.

<b>Steroid Hormones</b>	<b>MW<sup>a</sup> (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Water solubility<sup>a</sup> (mg L<sup>-1</sup> at 20°C)</b>	<b>Vapor pressure<sup>a</sup> (mm Hg)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub><sup>a</sup></b>	<b>pK<sub>a</sub><sup>b</sup></b>
PROG	314.5	8.8	$1.3 \times 10^{-6}$	3.87	----
LEVO	312.5	2.1	$3.9 \times 10^{-10}$	3.48	19.3
NORE	298.4	7.0	$7.3 \times 10^{-9}$	2.97	19.3
MEDRO	344.5	2.9	$1.9 \times 10^{-10}$	3.50	17.6

<sup>a</sup> The data was collected from the SRC PhysProp database. <http://www.syrres.com> [350]

<sup>b</sup> The pK<sub>a</sub> values for LEVO, NORE and MEDRO are predicted values listed according to the drug bank database. <http://www.drugbank.ca> [392]

**Tableau 5S - 2** MS/MS Parameters for the Analysis of Selected Steroid Hormones Analytes in Both Negative (NI) and Positive (PI) Ionization Mode by LDTD-APCI-MSMS.

<b>Compound</b>	<b>Ionisation mode</b>	<b>Precursor ion (m/z)</b>	<b>Product ion (m/z)</b>	<b>Relative intensity ratio<sup>a</sup> (%)</b>	<b>TL (V)</b>	<b>CE (eV)</b>
EE2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	PI	281 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	100	48	23
			159	22 ± 6	48	22
LEVO	PI	313 [M+H] <sup>+</sup>	109	83 ± 19	64	27
			185	45 ± 8	64	20
			245	100	64	18
MPROG	PI	345 [M+H] <sup>+</sup>	97	26 ± 4	74	23
			123	100	74	25
NOR	PI	299 [M+H] <sup>+</sup>	91	85 ± 16	69	35
			109	100	69	26
PROG	PI	315 [M+H] <sup>+</sup>	97	98 ± 17	65	20
			109	100	65	24

<sup>a</sup> The most abundant product ion was used for quantification whereas the other product ions were used for to confirm the presence of the steroid hormones..

## **Chapitre 5 Dégradation des hormones stéroïdiennes oestrogénique par le chlore et l'impact du bromure sur leurs cinétiques d'oxydation**

---

Degradation of estrogenic steroid hormones during water chlorination and the impact of  
bromide on the kinetics of oxidation

Paul B. Fayad, Arash Zamyadi, Romain Broseus, Michèle Prévost and Sébastien Sauvé,  
2013

Soumis à *Journal of Hazardous Materials*, 2013

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche: J'ai effectué les expériences d'oxydation en partie avec l'aide A. Zamyadi et R. Broseus, j'ai réalisé moi-même les analyses et l'interprétation des données.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires des Profs. Prévost et Sauvé, ainsi que A. Zamyadi.

## Abstract

The chlorination kinetic rate constants of three estrogenic steroid hormones (estradiol, estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol) were determined at both pH 6.0 and 8.0 in Milli-Q and natural waters as well as with and without the addition of bromine, in the presence of an excess of chlorine. The second order reaction rate constant with chlorine in the absence of bromide varied from 11.3 to 440 M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> in Milli-Q and natural waters at both pH values. The second order reaction rate constant with chlorine in the presence of 10 and 1000  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of bromide varied from 83 to 971 M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> in Milli-Q and natural waters at both pH values. The second order rate constants were measured under typical chlorine dosages (1 to 5 mg L<sup>-1</sup>) with a contact time of 6 to 75 min without the addition of bromide and 1.5 to 15 min with bromide. The reaction rates constants measured in Milli-Q water could be used by treatment plant operators as a conservative estimate to predict the oxidation of estrogenic steroid hormones in natural waters when bromide and chlorine are simultaneously present in solution. This was not the case for conditions where chlorine alone was used.

**Keywords:** Oxidation; Steroid hormones; Kinetic rate constant; Laser diode thermal desorption, Endocrine disruptors.

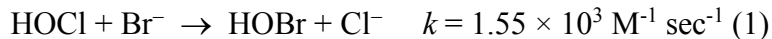


## 5.1 Introduction

The monitoring of endocrine disrupting compounds (EDCs) in the aquatic environment is progressively becoming a priority for government agencies, regulatory agencies as well as the general public. Given their strong endocrine-disrupting potency and their occurrence, selected estrogens (estradiol, estrone and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol) have been targeted and detected in natural waters, surface water and drinking water [163, 184, 294, 310-312]. There is strong evidence that impacts on the reproductive physiology of wildlife populations occur at very low concentrations, i.e. from 0.1 to 1.0 ng L<sup>-1</sup> [84, 85, 313, 314]. Several studies conducted in numerous countries [184, 315], have shown that wastewater effluents and receiving water bodies contain sufficient amounts of estrogenic compounds to induce harmful effects on fish, with their concentrations varying from sub-ng L<sup>-1</sup> levels to hundreds of ng L<sup>-1</sup> in waters samples [315-317]. Thus, current conventional natural waters treatment processes are not sufficiently efficient to remove steroid hormones below safe levels in receiving surface waters [184]. Surface water resources (rivers, lakes and reservoirs) are the main source for drinking water in numerous countries. With growing populations and increasing discharge levels of these compounds from wastewaters treatment plants to recipient waters, the presence of steroid hormones in surface waters could become a concern for drinking water treatment plants.

The low cost of chlorine [227] makes it the most used oxidizing agent for drinking water disinfection [231, 393]. Its reactivity is a function of chlorine speciation according to pH [231]. The main chlorine species under typical water treatment processes are hypochlorous acid (HOCl) and hypochlorite (OCl<sup>-</sup>), with a pK<sub>a</sub> = 7.5 [231]. Chlorine is known to react with compounds containing phenolic moieties, such as bromophenols [239] and estrogenic steroid hormones [231]. An earlier review [203] has reported the removal efficiencies of estrogens to vary between 40% and 100% during water chlorination for several water matrices (river, groundwater and ultrapure water) with no value available in drinking water. It has been shown that chlorination decreases estrogenic activity in different water matrices as well as in natural waters [203, 241, 394-398]. Given that common water treatment processes are not efficient at removing bromide from natural waters, its concentration in chlorinated waters can vary between the low  $\mu\text{g L}^{-1}$  to several hundred  $\mu\text{g L}^{-1}$  [399, 400].

Bromine is produced by the reaction of bromide ( $\text{Br}^-$ ) with chlorine according to equation 1: [401]



Once formed, hypobromous acid (HOBr) can dissociate to hypobromite ion ( $\text{OBr}^-$ ), with a  $\text{pK}_a = 8.89$ , [240] making HOBr a weaker acid than HOCl ( $\text{pK}_a = 7.5$ ). Hypochlorous acid is the dominant reactive species with bromide as shown by the large difference in rate constants ( $\text{Br}^-/\text{OCl}^-$  being  $9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ). Bromide is especially reactive towards phenol moieties [239].

To date, only two studies have determined the kinetic rate constants for estrogenic steroid hormones in the presence of chlorine. The first [232] determined the kinetic rate constants in pure aqueous solution, between pH 3.5 and 12 at  $20 \pm 2$  °C. The rate constants varied between 115 and  $131 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and there was no information available on the influence of natural organic matter or bromide on their values. The second study [402] did consider the impact of bromine on kinetic rate constants between pH 5 and 11 for one estrogenic steroid hormone, i.e. 17- $\alpha$ -ethinylestradiol. The rate constants varied significantly between 14 and  $58 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  for HOCl and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol without bromine and 2.1 to  $89 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  for HOBr and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in pure water tested at pH 7 and 9, respectively. The role of natural organic matter was determined in the presence of model dissolved organic matter, such as glycine or phenol, with the corresponding kinetic rate constants. In the case of the real natural waters matrices, the transformation of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol as a function of time could be predicted using a developed kinetic model based on pre-established rate constants.

During the past 20 years, a significant increase in NOM concentrations has been observed in several surface water sources worldwide [368-371]. Chlorine and bromine have been shown to react with NOM compounds and should be considered when evaluating reaction rate constants [242, 403]. However, bromine will react more rapidly towards phenolic moieties often found in NOM when compared to chlorine. This means that the role of bromine in the transformation of estrogenic steroid hormones can be lessened in source water.

The objectives of this study were to: *i*) experimentally determine the rate constants for the reaction of chlorine with three estrogenic steroid hormones (estradiol, estrone and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol) in pure and natural waters using laboratory bench-scale assays, *ii*) evaluate the influence of operating conditions, i.e. pH and NOM, on chlorine rate constants, *iii*) determine the role of bromine at different concentration levels on chlorine rate constants in both pure and natural waters *iv*) assess the validity of the determined rate constants when chlorine oxidation is applied to natural waters.

## 5.2 Materials and Methods

### 5.2.1 Chemicals, Reagents and Stock Solutions

The selected estrogenic steroid hormones (estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2)) used for this study are listed in **Table 6S-1** with their molecular structures presented in **Figure 6S-1**. All steroid hormone standards (purity  $\geq 97\%$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Isotopically-labeled 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, [ $^{13}\text{C}_2$ ]-EE2, was used as an internal standard (IS) and obtained from ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada). Other chemicals, including sodium hypochlorite solution, potassium bromide, potassium phosphate (monobasic and dibasic) and ascorbic acid were of analytical grade and used without further purification. All solvents used were of HPLC grade purity from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and ultrapure water (18 M $\Omega$  cm) used was produced with a Milli-Q (Millipore, USA) apparatus.

A mixed steroid hormone working solution was prepared prior to the experiments at a concentration of 200 mg L $^{-1}$  by dilution in MeOH of individual stock solutions aliquots for spiking solutions at the desired concentrations. Phosphate buffers of pH 6 and 8 (final concentrations: 50 mM) were prepared by dissolution of the commercial compounds in Milli-Q water. Chlorine stock solution, bromine stock solution, ascorbic acid working

solution ( $28.3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) were also freshly prepared in Milli-Q water prior to the experiments and stored in amber bottles at  $4^\circ\text{C}$ .

## 5.2.2 Water quality characterization

For the laboratory bench-scale experiments, filtered surface water samples were taken from drinking water treatment plants (DWTPs) in the province of Quebec, Canada. The first DWTP (DWTP A) takes its source in the St-Lawrence River (Quebec, Canada) and produces filtered water with a DOC of  $2.3 \text{ mg C L}^{-1}$ , an alkalinity of  $80 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , UV absorbance (at  $254 \text{ nm}$ ) of  $0.027 \text{ cm}^{-1}$ , and a pH of 8.24. The second DWTP (DWTP B) draws from the Des Prairies River (Quebec, Canada) and produces water with a DOC of  $1.89 \text{ mg C L}^{-1}$ , an alkalinity of  $27 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , UV absorbance (at  $254 \text{ nm}$ ) of  $0.047 \text{ cm}^{-1}$ , and a pH of 6.30. The bromide concentration of DWTP A and B were  $23.95 \text{ mg L}^{-1}$  and  $9.55 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. Natural water samples were not adjusted for pH and oxidation was carried out at ambient pH. The water samples were not analyzed for estrogenic steroid hormones prior to oxidation experiments since their concentrations are orders of magnitude lower than the concentration spiked during the bench-scale experiments, as previously documented [373]. The water samples were collected in 10-L polypropylene carboys washed and rinsed successively with distilled and ultrapure water (Milli-Q). Natural water samples were filtered ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  polyethersulfone) and kept at  $4^\circ\text{C}$  prior to the oxidation experiments. Prior to DOC analyses, samples were passed through pre-rinsed (1 L ultrapure water)  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  cellulose nitrate Supor-450 membrane filters (PALL Life Sciences, USA). DOC measurements were made using a 5310C total organic carbon analyzer (Sievers Instruments Inc., USA).

### 5.2.3 Analytical methods

#### 5.2.3.1 LDTD-APCI-MS/MS

. The validation and optimization parameters of the LDTD-APCI-MS/MS method used for the detection and quantification of the selected steroids were previously described [290]. Briefly, water samples recuperated from the bench-scale oxidation experiments were first spotted (2  $\mu\text{L}$ ) into the LazWell 96-well polypropylene plate cavities and then left to dry (in forced air oven at 30°C). Thermally desorbed, the dried sample is vaporized into the gas phase. The uncharged analyte molecules travel along a transfer tube by a carrier gas to eventually reach a corona region for ionization by APCI and then be transferred to the MS inlet [290]. The total time of analysis from sample to sample is 15 sec. The MS/MS parameters for the selected steroid hormones analyzed by LDTD-APCI are presented in **Table 6S-2**. Further details of the theory and principles behind the LDTD (Phytronix Technologies, Quebec, QC, Canada) are provided in the SI (Text S1). This method was used to determine oxidation rate constants for samples without the addition of bromine.

#### 5.2.3.2 LC-APCI-MS/MS

The validation and optimization parameters of the LC-APCI-MS/MS method used for the detection and quantification of the selected steroids were previously described [166]. Briefly, chromatographic separation of selected steroid hormones was conducted with a Thermo Finnigan HPLC Surveyor system on a Hypersil Gold (100 mm x 2.1mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particle size; Thermo Finnigan, San Jose, CA) column kept at 55 °C. The flow rate was set at 575  $\mu\text{L min}^{-1}$ . A binary gradient made of (A) HPLC grade water with 0.1% FA, and (B) MeOH with 0.1% FA was used to achieve chromatographic separation. Ionization of steroid hormones was achieved with an APCI source in positive (PI) mode using the Ion Max API Source mounted on a Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) operated in selected reaction monitoring (SRM) mode for quantification and detection. The total run time was 4 min and with an injection volume of 10  $\mu\text{L}$ . The MS/MS parameters for the selected steroid hormones analyzed by LC-APCI-

MS/MS are presented in **Table 6S-3**. This method was used to determine oxidation rate constants for samples with the addition of bromine.

### 5.2.3.3 Chlorine residual analysis

In the kinetic experiments, chlorine was analyzed at 515 nm with a spectrophotometer (Varian-Cary 100, Victoria, Australia) in a 1-cm quartz cell, by the *N, N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) colorimetric method [374].

## 5.2.4 Bench-scale experiments

Oxidation experiments with chlorine were conducted in 500 mL amber bottles (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada). All reactor assays were performed in duplicates. For ultrapure water (Milli-Q) samples, the pH was adjusted to 6.0 and 8.0 using the appropriate phosphate buffer solutions prior to the oxidation tests. For DWTP A and DWTP B effluents samples, buffered solutions were not necessary since their natural pH values were 8.24 and 6.30, respectively. Phosphate buffers were only used for the assays using ultrapure water. The pH values in the reactors were constant throughout the oxidation tests with changes between the initial and final pH not exceeding 0.2.

The initial concentrations of steroid hormones spiked in the reactors ranged from 0.883 to 9.76  $\mu\text{M}$ , with 26 to 99  $\mu\text{M}$  of chlorine added for the oxidation tests. The samples to which bromide ( $\text{Br}^-$ ) was added were spiked from the bromine stock solution to obtain a concentrations of 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (0.125  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (1.25  $\mu\text{M}$ ) and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (12.5  $\mu\text{M}$ ) of  $\text{Br}^-$ . These bromide concentrations were chosen since they were similar and fell within the ones found in DWTP A and DWTP B (23.95  $\text{mg L}^{-1}$  and 9.55  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively). Aliquots of 1.8 mL were collected at specific time intervals into a 2 mL amber vial containing a stoichiometric ratio of ascorbic acid (20  $\mu\text{L}$  of stock solution) to immediately quench the residual chlorine. Samples were then analyzed within 24h by LDTD-APCI-MS/MS or LC-APCI-MS/MS to determine the residual concentration of steroid hormones.

Initial tests were performed with several solvents in reactors with ultrapure water (without steroid hormones). All solvents showed that there was no decrease of initial chlorine concentration for contact times of up to 60 min (**Figures 6S-3 and 6S-4**), with the exception of acetone and ethyl acetate. Therefore, the solvent used for the dissolution of the steroid hormones spiked in the reactors was MeOH. Reactor blank experiments (no steroid hormones added) for both natural waters with the addition of chlorine were also conducted. All rate constants were determined under pseudo-first-order conditions, with chlorine in excess, in a batch reactor in ultrapure and natural waters at pH 6.0-8.2.

The oxidation experiments were conducted at  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , and the calculated rate constants obtained from duplicate experiments (Text S3).

### 5.2.5 Determination of rate constants for the reaction with chlorine

The kinetics of the reactions of chlorine with organic and inorganic compounds is typically second order, i.e. first order with respect to the oxidizing agents (OAs) and the contaminant concentrations [232]. The degradation of steroid hormones by chlorine can be described with the following equation:

$$-\frac{d[\text{TC}]}{dt} = k_{\text{OA}} [\text{OA}][\text{TC}] \quad (3)$$

Where TC = target compounds and  $k_{\text{OA}}$  = reaction rate constant for the applied oxidant. The rate constant is obtained from the integration of Eq. (3):

$$\ln\left(\frac{[\text{TC}]_t}{[\text{TC}]_0}\right) = -k_{\text{OA}} \int_0^t [\text{OA}] dt \quad (4)$$

where  $\int_0^t [\text{OA}] dt$  is the time-integrated oxidant concentration. The value of the second-order rate constant can be found from the gradient of a plot of  $\ln$  removal of the target compound against the time-integrated oxidant concentration. The latter defines an oxidant exposure (CT). In this study, CT values ( $\text{mg}\cdot\text{min L}^{-1}$ ) were performed using the integrated CT concept [378], for which the effective CT at time  $t$  (min) is equal to the area under the decay curve at that time. CT values were calculated using the oxidant concentration profiles (Eq. (4)) and assuming a simple first-order decay:

$$\text{CT}_{\text{effective}} = \int C(t) dt = \frac{C_0}{k'} [1 - \exp(-k' \cdot t)] \quad (5)$$

where  $C$  = oxidant residual ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $C_0$  = initial oxidant residual ( $\text{mg L}^{-1}$ ) determined from the exponential fit of the relation between the oxidant residual and the time (min);  $k'$  = oxidant first-order decay constant ( $\text{min}^{-1}$ ).

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Chlorine decay in Milli-Q water and natural waters

Experimental decay data fit the first-order decay rates for chlorine ( $R^2 \geq 0.94$ ) in Milli-Q water at pH 6.0 and 8.0 and in filtered surface water at ambient pH of 6.3 for DWTP B and pH 8.2 for DWTP A (**Figure 6S-3**). The values of apparent first-order rate constants for chlorine ( $k_{\text{OA}}$ ,  $\text{sec}^{-1}$ ), with and without the addition of estrogenic steroid hormones (SHs) or bromide were calculated by linear regression and the resulting apparent rate constants are summarized in **Table 6-1**. The decay constants increased in natural water in the presence of spiked SHs ( $1.50$  and  $2.3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ) compared to unspiked natural water without SHs ( $0.20$  and  $0.31 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ), and were influenced by pH with higher values for pH 8.2 (**Table 6-1**). The rate constants for DWTP B with the addition of bromide and SHs were higher than those in the absence bromide (**Table 6-1**), but they remained similar (from  $3.17$  to  $3.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ , between  $10$  to  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Br}^-$ ) despite an increase in bromide concentrations. This trend was also observed for Milli-Q water (**Table 6-1**) with varying bromide concentrations in the presence of SHs (from  $2.32$  to  $2.67 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ , between  $10$  to  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Br}^-$ ). The decay rates with chlorine increased in Milli-Q ( $0.35$  and  $1.75 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ , at pH 6.0 and 8.0 respectively) and natural waters ( $1.50$  and  $2.30 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ , at pH 6.3 and 8.2 respectively) when SHs were present. With negligible immediate demand ( $t < 2$  min), the relatively modest demand of SHs in Milli-Q water increased substantially with the addition of bromide regardless of their concentration and, to a lesser extent with pH. Immediate ( $t < 2$  min) chlorine demand in natural water spiked with SHs was more important ( $0.3$ - $0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}_2$ ) but chlorine decay was again most influenced by the addition of bromide and to a lesser extent pH.



**Tableau 5-1** First-order apparent rate constants ( $k$ ,  $\text{sec}^{-1}$ ) for chlorine decay with and without estrogenic steroid hormones (SH) in natural waters at  $22 \pm 2$  °C for pH 6.3 (DWTP B, DOC  $1.89 \text{ mg C L}^{-1}$ ) and 8.2 (DWTP A, COD  $2.3 \text{ mg C L}^{-1}$ )<sup>a</sup>. The averages of triplicate measurements are given with standard deviations.

	$k_{HOCl} (\times 10^{-3} \text{ sec}^{-1})$	
<i>Milli-Q water</i>	<i>pH 6.0</i>	<i>pH 8.0</i>
with SH	$0.35 \pm 0.01$ (0.98)	$1.75 \pm 0.05$ (0.98)
with SH + $10 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$2.67 \pm 0.06$ (0.99)	$3.03 \pm 0.08$ (0.98)
with SH + $100 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$2.63 \pm 0.06$ (0.99)	$2.3 \pm 0.2$ (0.94)
with SH + $1000 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$2.32 \pm 0.09$ (0.98)	$3.20 \pm 0.08$ (0.98)
<i>Natural waters</i>	<i>pH 6.3</i>	<i>pH 8.2</i>
without SH	$0.20 \pm 0.03$ (0.96)	$0.31 \pm 0.02$ (0.95)
with SH	$1.50 \pm 0.06$ (0.98)	$2.3 \pm 0.1$ (0.93)
with SH + $10 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$3.17 \pm 0.09$ (0.98)	n.d.
with SH + $100 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$3.5 \pm 0.2$ (0.95)	n.d.
with SH + $1000 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Br}^{-}$	$3.42 \pm 0.09$ (0.98)	n.d.

<sup>a</sup> Values in parentheses represent coefficients of determination ( $R^2$ ) and uncertainties on  $k$  values represent calculated standard deviation (SD) given from the linear regression equation.

### 5.3.2 Rate constant of chlorination without bromide: influence of pH and NOM

The second order reaction rate constant for SHs with chlorine in the absence of bromide increased from 11.3 (E2, pH 6.3) to 440 (EE2, pH 8.0)  $\text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  in Milli-Q and natural waters at both pH values (**Table 6-2**). Chlorine is known to react with compounds containing phenolic moieties, such as estrogenic steroid hormones, at the *ortho* (**Figure 6S-**

1, C2) and *para* (**Figure 6S-1**, C4) positions by electrophilic substitutions [227]. These are further activated by the electron donating character of the hydroxyl (–OH) functionalities found in their structures (**Figure 6S-1**, at C3) which may eventually result in the cleavage of the ring structure of estrogens [232, 404]. Rebenne *et al.* [405] studied the aqueous chlorination kinetics of dihydrobenzenes (resorcinol and substituted resorcinols) and concluded that such reactions are possible if HOCl is the only active electrophile and the reactivity of OCl<sup>–</sup> is negligible. This supports the presented results where, independently of the nature of the water matrix used or the amount of bromide added to the batch reactors, the second order rate constant were significantly higher in alkaline (pH ~ 8.0) conditions rather than at pH ~ 6.0 (**Table 6-2**). This was particularly more evident in the absence of bromide in solution with the second order rate constants were approximately 16 times higher at pH ~ 8.0 compared to pH ~ 6.0 (**Table 6-1**). In fact, the ratios obtained in our study between the second order rate constants for estrogens measured at pH 6.0 and 8.0 in Milli-Q water (**Table 6-2**, with  $k_{\text{pH } 6.0}/k_{\text{pH } 8.0}$  from 15 to 18) corresponded to those calculated from Deborde *et al.* [232] at the corresponding pH values (**Table 6S-4**, with  $k_{\text{pH } 6.0}/k_{\text{pH } 8.0}$  from 19 to 21).

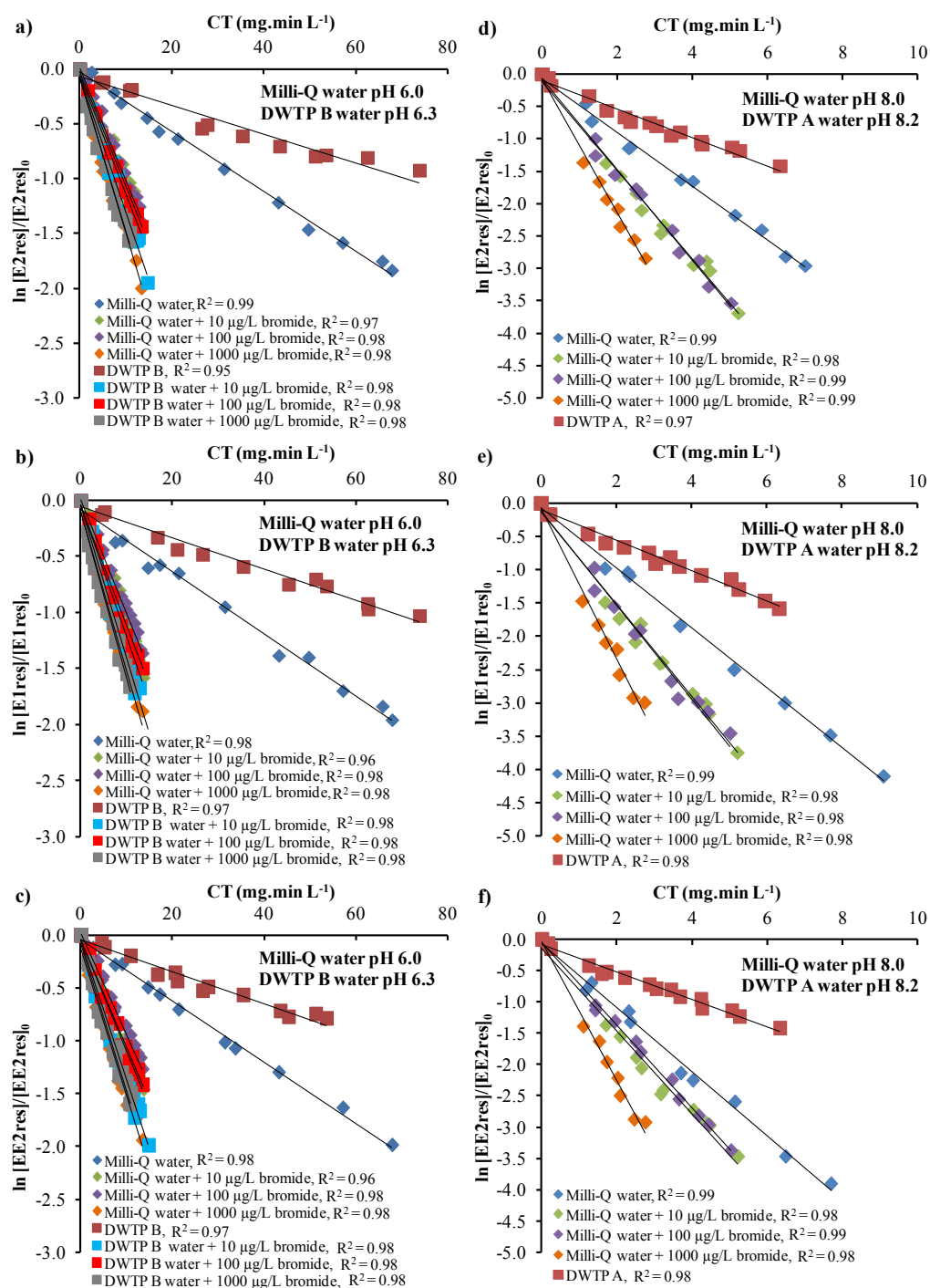
The influence of NOM was also investigated by using two natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) and measuring the second-order rate constants (**Table 6-2**) under the same experimental conditions. As was expected for chlorine, apparent rate constants significantly decreased, e.g. 23.7 to 11.9 M<sup>–1</sup> sec<sup>–1</sup> for E1 at pH ~6.0 and 440 to 188 M<sup>–1</sup> sec<sup>–1</sup> at pH~8.0 for EE2 in Milli-Q and natural waters, respectively. Chlorine oxidation efficiency will be affected by water quality parameters and its physicochemical characteristics (e.g. ammonia, nitrite, amine, type of NOM and pH) [231, 406, 407]. These factors can potentially promote competition for the applied oxidant, reducing its removal efficiency for the target analytes. The reaction rates constants measured in Milli-Q water could not be used to predict the oxidation of SHs in natural waters when exposed to chlorine, as illustrated in **Figure 6-1** and **Table 6-2**.

**Tableau 5-2** Steroid hormone (SH) oxidation rate constants ( $k$ ,  $M^{-1} sec^{-1}$ ), removal efficiency (%) and half-lives ( $t_{1/2}$ , min) derived from oxidation experiments using chlorine in Milli-Q and natural waters (DWTP A, pH 8.2, DOC 2.3 mg C  $L^{-1}$  and DWTP B, pH 6.3, COD 1.89 mg C  $L^{-1}$ ) with and without bromide (at 10, 100 and 1000  $\mu g L^{-1}$ ) at  $22 \pm 2$  °C for pH 6.0 and 8.0. The averages of triplicate measurements are given with standard deviations. <sup>a,b</sup>

Compounds	Milli-Q water					Wastewaters				
	$k_{HOCl-SH}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ )		Ratio $k_{HOCl-SH}$ $k$ pH 6.0/ $k$ pH 8.0	$t_{1/2}$ (min)		$k_{HOCl-SH}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ )		Ratio $k_{HOCl-SH}$ $k$ pH 6.0/ $k$ pH 8.0	$t_{1/2}$ (min)	
	pH 6.0	pH 8.0		pH 6.0	pH 8.0	pH 6.3	pH 8.2		pH 6.3	pH 8.2
<i>E2</i>										
without Br <sup>-</sup> spiking	23.4 ± 0.4 (0.99)	357 ± 9 (0.99)	15	25	1.7	11.3 ± 0.7 (0.95)	190 ± 8 (0.97)	17	53	3.1
with 10 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	87 ± 4 (0.97)	589 ± 20 (0.98)	6.8	6.7	1.0	105 ± 3 (0.98)	n.d.		5.7	n.d.
with 100 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	88 ± 3 (0.98)	602 ± 18 (0.99)	6.8	6.8	1.0	93 ± 4 (0.98)	n.d.		6.4	n.d.
with 1000 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	120 ± 4 (0.98)	894 ± 31 (0.99)	7.5	5.0	0.7	118 ± 4 (0.98)	n.d.		5.0	n.d.
<i>E1</i>										
without Br <sup>-</sup> spiking	23.7 ± 0.7 (0.98)	386 ± 8 (0.99)	16	25	1.5	11.9 ± 0.5 (0.97)	196 ± 7 (0.98)	16	50	3.0
with 10 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	91 ± 4 (0.96)	595 ± 22 (0.98)	6.5	6.5	1.0	109 ± 5 (0.98)	n.d.		5.5	n.d.
with 100 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	86 ± 5 (0.98)	605 ± 24 (0.98)	7.0	6.9	1.0	100 ± 9 (0.98)	n.d.		5.9	n.d.
with 1000 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	122 ± 4 (0.98)	971 ± 42 (0.98)	8.0	4.7	0.6	126 ± 4 (0.98)	n.d.		4.7	n.d.
<i>EE2</i>										
without Br <sup>-</sup> spiking	24.8 ± 0.5 (0.98)	440 ± 12 (0.99)	18	24	1.4	12.9 ± 0.7 (0.97)	188 ± 7 (0.98)	14	46	3.2
with 10 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	85 ± 7 (0.96)	566 ± 23 (0.98)	6.7	6.9	1.0	112 ± 3 (0.98)	n.d.		5.3	n.d.
with 100 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	83 ± 3 (0.98)	567 ± 12 (0.99)	6.8	7.1	1.0	90 ± 7 (0.98)	n.d.		6.6	n.d.
with 1000 $\mu g L^{-1}$ Br <sup>-</sup>	117 ± 5 (0.98)	953 ± 13 (0.98)	8.1	5	0.6	119 ± 5 (0.98)	n.d.		5.0	n.d.

<sup>a</sup> Values in parentheses represent coefficients of determination ( $R^2$ ) and uncertainties on  $k$  values represent calculated standard deviations (SD) given from the linear regression equation. Uncertainties on removal values represent standard deviations (SD) between replicates (n=2).

<sup>b</sup> n.d. = not determined



**Figure 5-1** Second-order rate kinetic plots for the oxidation of estrogenic steroid hormones (SH) by chlorine with and without bromide and the resulting effect of dissolved natural organic matter (NOM) with a) E2, b) E1, c) EE2 at pH 6.0 for Milli-Q water and pH 6.3 for DWTP B and d) E2, e) E1 and f) EE2 at pH 8.0 for Milli-Q water and pH 8.2 for DWTP A. Experimental conditions were,  $[\text{HOCl}]_0$  from 26 to 99  $\mu\text{M}$  and  $[\text{estrogens}]_0$  from 0.883 to

9.76  $\mu\text{M}$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ).

### 5.3.3 Rate constant of chlorination with bromide: influence of pH and NOM

The second order reaction rate constant for SHs with chlorine in the presence of various concentrations of bromide varied from 83 (EE2) to 971 (E1)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  in Milli-Q and natural waters at both pH values (**Table 6-2**). Bromine has a lower standard reduction potential than chlorine (+1.331 V for HOBr versus +1.630 V for HOCl [242]) which would suggest a higher tendency to react by substitution, rather than by oxidation reactions. This was first suggested by Rook *et al.* [408], that postulated that when present simultaneously in solution, chlorine acted as an oxidant whereas bromine preferred to react as a halogenating agent and this was later confirmed by spectroscopic measurements [242]. Furthermore, according to Westerhoff *et al.* [242], the electrophilic substitution in aromatic moieties are more favorable for Br in terms of electron release for the stabilization of a carbocation atom given its higher electron density and smaller bond strength as compared to the Cl atom. Indeed, bromine was found to be three orders of magnitude more reactive toward phenol [239] and an order of magnitude more reactive toward organic matter than chlorine [242]. Given the reactivity of HOBr towards NOM in natural waters and the phenolic moieties from the estrogens in Milli-Q water, bromine and chlorine can be consumed competitively.

In the presence of bromide in solution, the second order rate constants (**Table 6-2**) were *i*) always higher than with chlorine under all conditions and *ii*) approximately 7 times higher (less than the 16 times without the addition of bromide) at pH  $\sim$  8.0 compared to pH  $\sim$  6.0, in Milli-Q water and natural waters. This would suggest that the addition of bromide at pH  $\sim$  6.0 results in a significantly higher second order rate constants when in solution with chlorine. Certainly, the formation of the more reactive species HOBr through the reaction of bromide ( $\text{Br}^-$ ) with HOCl (according to eq. 1) will be favored at lower pH since  $\text{OCl}^-$  is the least abundant chlorine species ( $\text{pK}_a = 7.5$ ). The initial bromide concentration impacts the second order rate constants. At both 10 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , second order rates are increased in Milli-Q water at pH 6.0, with values between 83 (EE2) to 91 (E1)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  and at pH 8.0 with values between 566 (EE2) to 605 (E1)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  (considering SD, **Table 6-2**). This was also the case for natural waters, but with second order rate constant having slightly higher or

equivalent values than in ultrapure water, i.e. with values between 90 (EE2) to 112 (EE2)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  at pH 6.3. At a concentration of  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of bromide, the second order rate constants increased compared to those at 10 and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , but were not affected by the type of water tested at pH  $\sim 6.0$ . As expected, second order rate constants at pH 8.0 in Milli-Q water were significantly higher than those at pH 6.0 in the presence of bromide. These larger values are also attributable to the deprotonation of  $-\text{OH}$  to become  $-\text{O}^-$  for estrogens at pH  $\sim 8.0$ , further activating electrophilic substitution. The constants at pH 8.0 in Milli-Q water with a bromide concentration of  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  increased, from 894 (E2) to 971 (E1)  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ , when compared to those with 10 or  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of bromide. This could be a result of the increased conversion of available  $\text{Br}^-$  with  $\text{HOCl}$  that results in  $\text{HOBr}$  given  $26 \mu\text{M}$  of chlorine are added for the oxidation tests against  $0.125 \mu\text{M}$  ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $1.25 \mu\text{M}$  ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and  $12.5 \mu\text{M}$  ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of added bromide. This is further confirmed by the study by Lee and von Gunten [402] that have shown that chlorine will react faster with bromine than with estrogens ( $k_{\text{HOCl-SH}}/k_{\text{HOCl-Br}^-} = 2.9 \times 10^{-2}$ , at pH 8.0). In addition, the amount of estrogens added ( $0.883$  to  $9.76 \mu\text{M}$ ) can be responsible for consuming the formed bromine, although this reaction is not favored and would not be significant at concentrations found naturally in the natural waters ( $\sim 0.06$  to  $0.55 \mu\text{M}$ ). The impact of NOM on the second order rate constants of chlorine with estrogens was not considered significant in the presence of bromide, regardless of its concentration, as illustrated in **Figure 6- 1** and shown in **Table 6-2**, at pH  $\sim 6.0$ .

The reaction rates constants measured in Milli-Q water could therefore be used by operators as a conservative estimate to predict the oxidation of estrogenic steroid hormones in natural waters when bromide and chlorine are simultaneously in solution, which was not the case for conditions where chlorine alone was added. It could be presumed that under favorable conditions, such as pH and the known concentration of bromide in natural waters, the oxidation can be enhanced relative to that predicted in pure water.

### 5.3.4 Removal efficiencies and half-lives

The elimination of estrogenic steroid hormones by chlorine with and without bromide was measured in Milli-Q water and in natural waters for pH  $\sim 6.0$  and pH  $\sim 8.0$ . Estrogenic steroid hormone decay curves following oxidation in natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) are presented in **Figure 6- 2**, while corresponding rate

constants and half-lives are summarized in **Table 6-2**. The greatest impact of pH, NOM and bromide on both natural and ultrapure waters was observed for half-lives that ranged from 53 (E2, DWTP B, pH 6.3) to 0.61 min (E1, Milli-Q water, pH 8.0). The addition of bromide at pH 6.0 in Milli-Q water, independently of the concentration applied, considerably reduced half-lives of the three compounds (i.e. from ~25 min without bromide to ~6.9 min with bromide), but with similar degradation rates (according to SD, **Table 6-2**). This was also the case for Milli-Q water at pH 8.0, where the impact of bromide on half-lives was minimal (i.e. from ~1.7 min without bromide to ~0.6 min with bromide). In relation to practical applications in natural waters treatment plant conditions, the effect of bromide concentrations on the removal efficiencies and half-lives for natural waters appears dominant especially at lower pH (**Table 6-2** and **Figure 6- 2**). Observed removals of estrogens under the range of CT monitored ranged from 54 to 63% with chlorine alone compared to 74 to 85% in the presence of bromide, while corresponding half-lives varied from 46 to 53 min with chlorine alone versus to 4.7 to 6.6 min in the presence of bromide. This illustrates the important of evaluating the impact of bromine concentrations when determining the kinetic rate constants, the removal efficiencies as well as half-lives for the chlorination of estrogens in real environmental matrices.

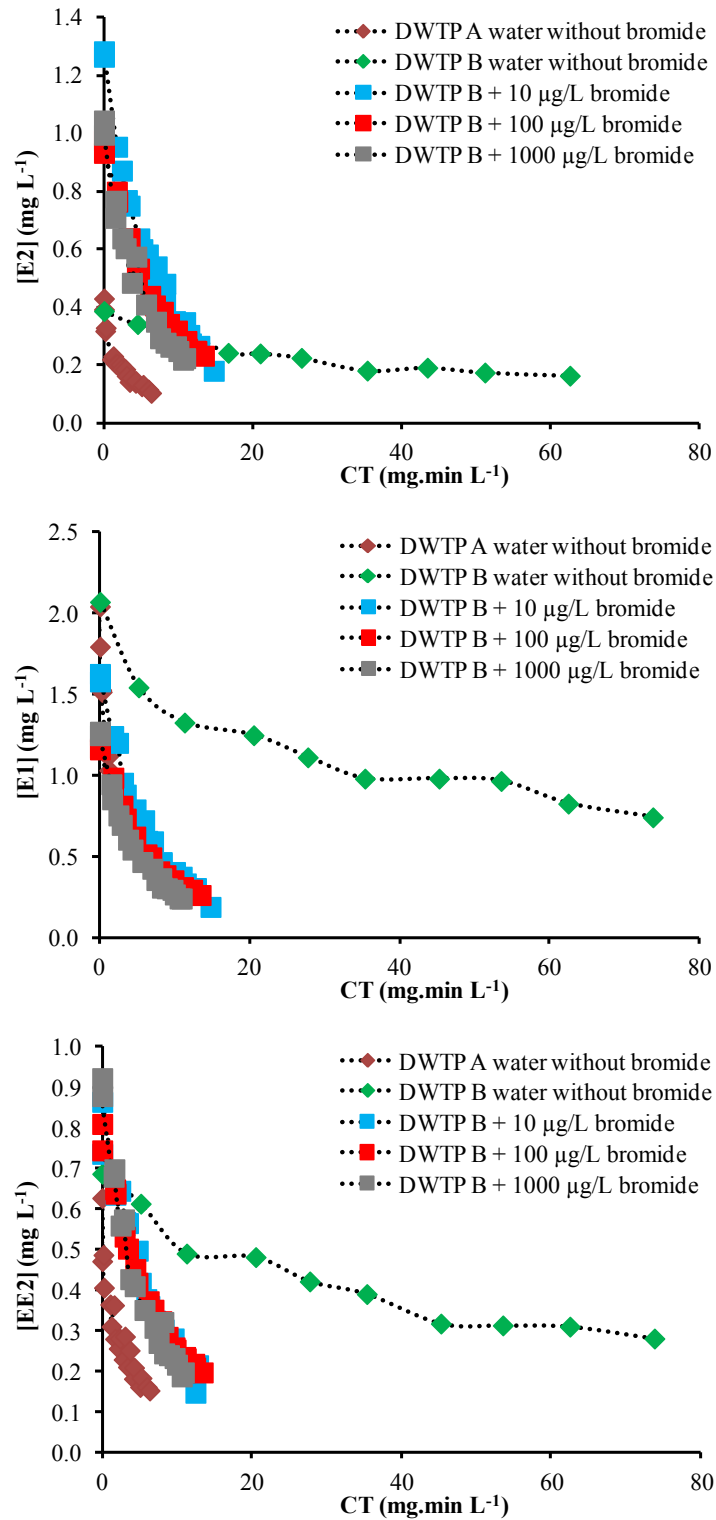
### 5.3.5 Implications for water treatment plants

The second order rate constants were measured using realistic applied chlorine dosages (1 to 5 mg L<sup>-1</sup>) consistent with practice. In plant application, treatment set points should take into account all factors that may impact the ability of chlorination to reach both primary disinfection and estrogen removal goals. In most cases, disinfection practice will always favor the use of low pH to enhance inactivation. This work confirms previous reports that pH and the presence of bromide are the overwhelming factors to consider to achieve efficient estrogen removals. Our observations show that, even with a CT value of 30 mg.min L<sup>-1</sup> at pH 6.3, the degradation of estrogens by chlorine was limited in DWTP B water, reaching a maximum value 63% in natural waters with a minimal bromide content (<10ug/L) (**Table 6-2**). At a higher pH of 8.0, removal was significantly improved, with 94% removal with a CT of 8 mg.min L<sup>-1</sup> in Milli-Q water, compared to 73% in natural waters (DWTP A, **Table 6- 2**). These values are comparable to the estrogen removal efficiency of 95% calculated by Deborde et al. [232] for an applied chlorine dose of 2 mg L<sup>-1</sup> with a contact

time of 15 min at pH 7-8 in ultrapure water. Therefore, for utilities with low bromide and low pH water, some removal will be obtained in the CT contactors during primary disinfection. However, significant additional removal can be expected after pH adjustment during storage and distribution that provide extensive CT at higher pH values.

The formation of disinfection by-products (DBPs) is the main drawback of chemical oxidation approaches. Chlorination can lead to the formation of potentially harmful by-products or transformation products (trihalomethanes, THMs and haloacetic acids, HAAs) due to their reactivity with water matrix components or micropollutants [232, 242]. The purpose of this study was not to determine such DBPs as a consequence of applied chlorine and bromine to natural waters, since these have been well documented and characterized, in previous works [203, 242, 409-412]. However, we did measure the total THMs (TTHM, **Table 6S-5**) created during chlorination at a CT value of 52 mg.min L<sup>-1</sup> for both natural waters studied (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) with and without estrogenic steroid hormones. Measured concentrations of TTHM were ≤ 64 µg L<sup>-1</sup>, meeting the United States Environmental Protection Agency (USEPA) established guideline of 80 µg L<sup>-1</sup> for TTHM [413].





**Figure 5-2** Estrogenic steroid hormone (SH) decay curves following oxidation by chlorine with and without bromide in natural waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3).  $[\text{HOCl}]_0$  ranged from 26 to 99  $\mu\text{M}$  and  $[\text{estrogens}]_0$  from 0.883 to 9.76  $\mu\text{M}$ . Dotted lines represent the trend of the measured data (symbols).

## 5.4 Conclusion

This work demonstrates the potential of chlorination, with and without bromide to oxidize estrogens in treatment plants within the typical ranges of operational values of pH and NOM. Proper attention should be given to provide adequate CT values in order to ensure the efficient removal of estrogenic hormones and recalcitrant analogues. The second order reaction rate constants with chlorine in the absence of bromide varied from 11.3 to 440 M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> in Milli-Q and natural waters at both pH values. The second order reaction rate constants with chlorine in the presence of various concentrations of bromide (between 10 and 1000 µg L<sup>-1</sup>) varied from 83 to 971 M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> in Milli-Q and natural waters at both pH values. Observed rate constants with bromine during chlorination were approximately 7-8 times higher than rate constants with chlorine alone.

## 5.5 Acknowledgements

The authors would like to thank the Regional Center for Mass Spectrometry of the Université de Montréal (Quebec, Montreal, Canada) managed by Dr. Alexandra Furtos for allowing us to use their LC-MS/MS instrument for our analysis. This work was made possible through the financial support from operating grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Industrial Chair on Drinking Water at the Ecole Polytechnique de Montréal and the Canadian Foundation for Innovation (equipment).

## 5.6 Supporting information

Additional text, figures, and tables addressing supporting data as mentioned in the text can be found online.

## **5.7 Supplementary material**

### 5.7.1 LDTD-APCI Source Principles

The Arrhenius plots comparing the logarithm of the kinetic rates of the temperature dependencies of vaporization (dissociation of intermolecular bonds) and molecular decomposition (dissociation of intramolecular bonds) against the inverse temperature ( $1/T$ ) would identify an intersection point at some value of  $1/T$ , above which the vaporization of the uncharged molecular species would be favored and below which decomposition would be observed [288, 289]. The heating rate of the LDTD laser is  $3000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  which allows the samples to be quickly heated at high temperatures, minimizing the time spent in the decomposition region and favoring vaporization which generates a greater amount of the uncharged molecular species.

The characterization of the thermal desorption processes associated with rapid sample heating and thin film deposition for the LDTD-APCI source have been shown on prednisone, a corticosteroid steroid hormone, that decomposed at a temperature of  $234^{\circ}\text{C}$  but was fully analyzed by LDTD-APCI-MS/MS at a desorption temperature of  $170^{\circ}\text{C}$ . Also sulfadiazine, a sulfonamide antibiotic, shows a desorption temperature observed between  $95^{\circ}\text{C}$  and  $140^{\circ}\text{C}$  though its bulk melting point is  $252\text{-}256^{\circ}\text{C}$  [283]. Unlike traditional LC-APCI, the LDTD-APCI ionization is performed in the absence of solvent reacting molecules as no liquid phase is introduced into the corona discharge region. Similarly to classical chemical ionization, the species present in the APCI region of the LDTD originate from gas-phase reactions involving proton transfer, governed by proton affinity in positive mode (PI) and gas-phase acidity in negative mode (NI), as well as charge exchange [303]. The solvent used for analyte deposition in LDTD-APCI will not induce signal suppression due to competition for protonation as can be the case in classical LC-APCI mobile-phase components [270, 304, 305]. In the absence of any mobile phase, it is the water traces in the carrier gas that will generate ionization in LDTD-APCI, since proton transfer in the PI mode mostly occurs between water cluster,  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$  where  $n = 0\text{-}4$  [391], and more basic analytes (higher proton affinity). Higher efficiency protonation in LDTD-APCI is accomplished in the presence of the smallest hydronium species because of their low proton affinity, i.e.  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $(\text{H}_2\text{O})\text{H}_3\text{O}^+$ . Larger water clusters will form when

the humidity (water saturation) in the ionization region is increased and negatively impact the analyte ionization process [307]. The larger hydronium cluster, with higher proton affinity, will affect sensitivity towards low proton affinity molecules and decrease their fragmentation because of an excess of energy in protonation reactions [308]. The main advantage of using APCI with the LDTD is that it is less susceptible to matrix effects and ionization suppression than with electrospray ionization [309].

### **5.7.2 Brief review of other oxidation processes used for estrogens and other phenolic compounds**

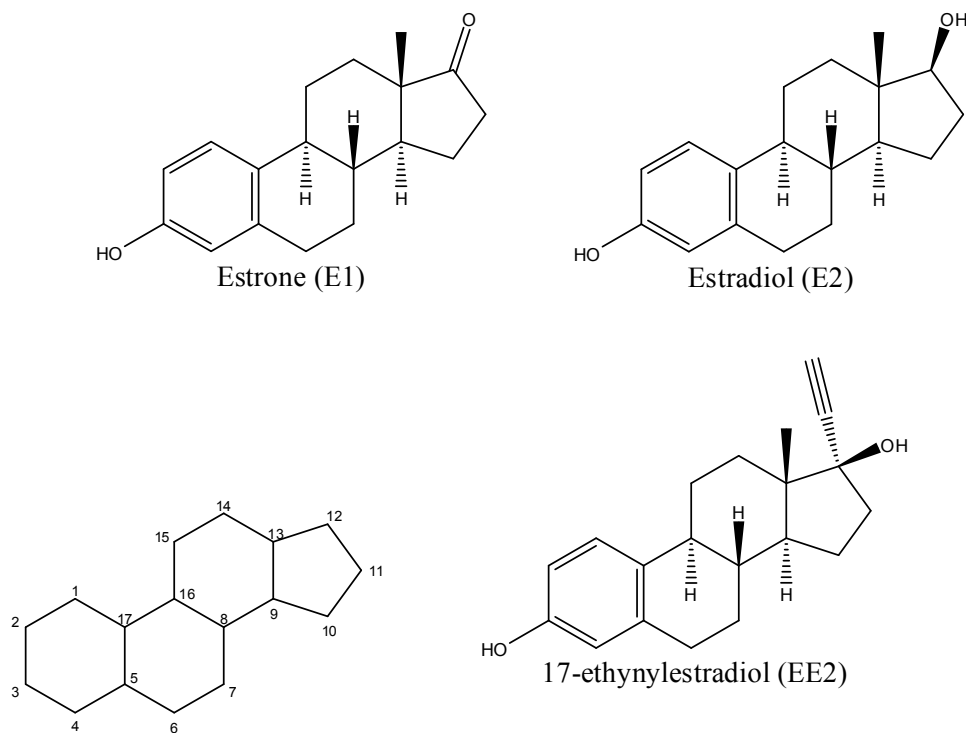
Alternative oxidation processes in water treatment plants have demonstrated their effectiveness in the removal/degradation of steroid hormones. Studies involving ozone have reported its oxidizing efficiency on several steroid hormones [203], with the estrogens (containing aromatic moieties) being more susceptible to ozonation than progestogens or androgens, steroids without aromatic or phenolic moieties [414]. However, ozonation in the presence of bromide ions ( $\text{Br}^-$ ) or iodine containing waters can result in the formation of potentially carcinogenic brominated, i.e. bromated ions ( $\text{BrO}_3^-$ ) as well as total organic bromine (TOBr) disinfection by-products [400]. Ferrate (VI) ( $\text{FeO}_4^{2-}$ ) is also a strong oxidant with a redox potential (2.20 V) greater than ozone (2.04 V) in acidic conditions and has been successfully applied as a treatment method for the degradation of hormones [415-417]. In addition, ferrate (VI) ions are reduced to environmentally benign Fe (III) ions or ferric hydroxide that can simultaneously act as coagulant agents for metals and non-metals from solution [243, 418]. Unlike ozone, ferrate (VI) does not react with halogenated ions, thus eliminating the formation of undesirable by-products [419]. Together with its high cost and instability at lower pH, ferrate (VI) is limited by the optimum operating conditions for high removal efficiencies, i.e. very alkaline environment (pH 9), which makes it difficult to implement in water treatment plants [420]. Thus, a compilation of rate constants for the selected estrogenic steroid hormones (E2, E1 and EE2) from this paper as well as those from other studies including several different oxidants and other similar phenolic ring containing compounds (E3, BPA, NP and phenol) are given in **Table 6S-4**.

The rate constants were calculated or directly given in the papers chosen in terms of the pH conditions, temperature and water type in order to allow for proper comparison against the values found in this study. For values for which chlorine and bromine were simultaneously in solution, it was those for a concentration of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Br}^-$  that was added to **Table 6S-4**, since this is the concentration that would most likely be found in natural waters samples [399]. As was the case in this work, all of the oxidants showed higher reactivity at pH 8.0, with the exception of ferrate (VI) for which the pH-dependent speciation of ferrate (VI) and organic functional groups do not adequately predict expected rate constant trends [420]. These larger values are also attributable to the deprotonation of  $-\text{OH}$  to become  $-\text{O}^-$  for phenolic ring containing compounds at more alkaline pH values, further activating electrophilic substitution. Ozone,  $\text{ClO}_2$  and ferrate (VI) have the highest rate constants at pH 6.0 than all other oxidants (**Table 6S-4**), whereas at pH 8.0 ozone,  $\text{ClO}_2$  and Mn (IV) have the highest rate constants. Although at pH 8.0 with  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of bromide, chlorination rate constants (**Table 6S-2**) are only lower than those of  $\text{O}_3$  and  $\text{ClO}_2$  (**Table 6S-4**). Therefore, chlorine and bromine combined under typical environmental conditions can be considered as a relative mild oxidant for the oxidation of phenolic compounds compared with other drinking water oxidants. Nonetheless, chlorine is used worldwide for pre-oxidation, primary and secondary disinfection and its low cost makes it the most used oxidizing agent for drinking water disinfection [393].

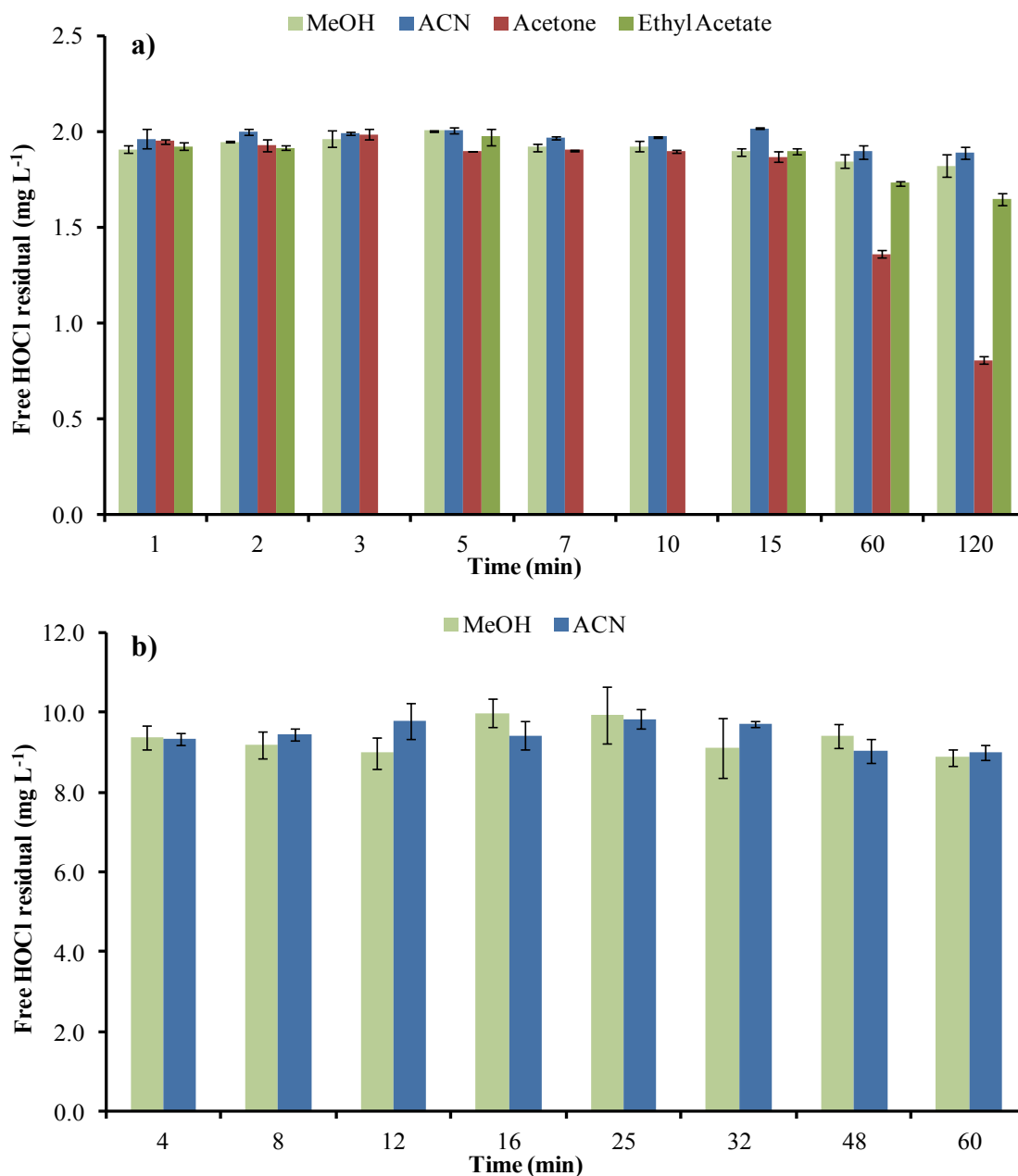
### 5.7.3 Oxidation of estrogenic steroid hormones

Previous studies have investigated the reaction between oxidizing agents and estrogenic steroid hormones have shown that the reaction followed second-order kinetics, first-order with respect to estrogens and oxidation agents (OA) [232, 350, 361]. **Figure 6S-3** shows that the decay of the three estrogenic steroid hormones exposed to chlorine follows the second-order rate law expressed by Eq. (3). The tabulated first-order rate constants (**Table 6-1**) were derived from the free chlorine residual decay curves in the presence of SHs with and without the addition of bromide (**Figure 6S-4**) from which CT values were calculated using Eq. (5). The second-order rate constants ( $k_{\text{HOCl-SH}}$ ,  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ) were then measured by

linear regression of  $\ln([\text{SH}_{\text{res}}]/[\text{SH}_{\text{res}}]_0)$  as a function of CT ( $\text{mg}\cdot\text{min L}^{-1}$ ), as shown in **Figure 6-1**.

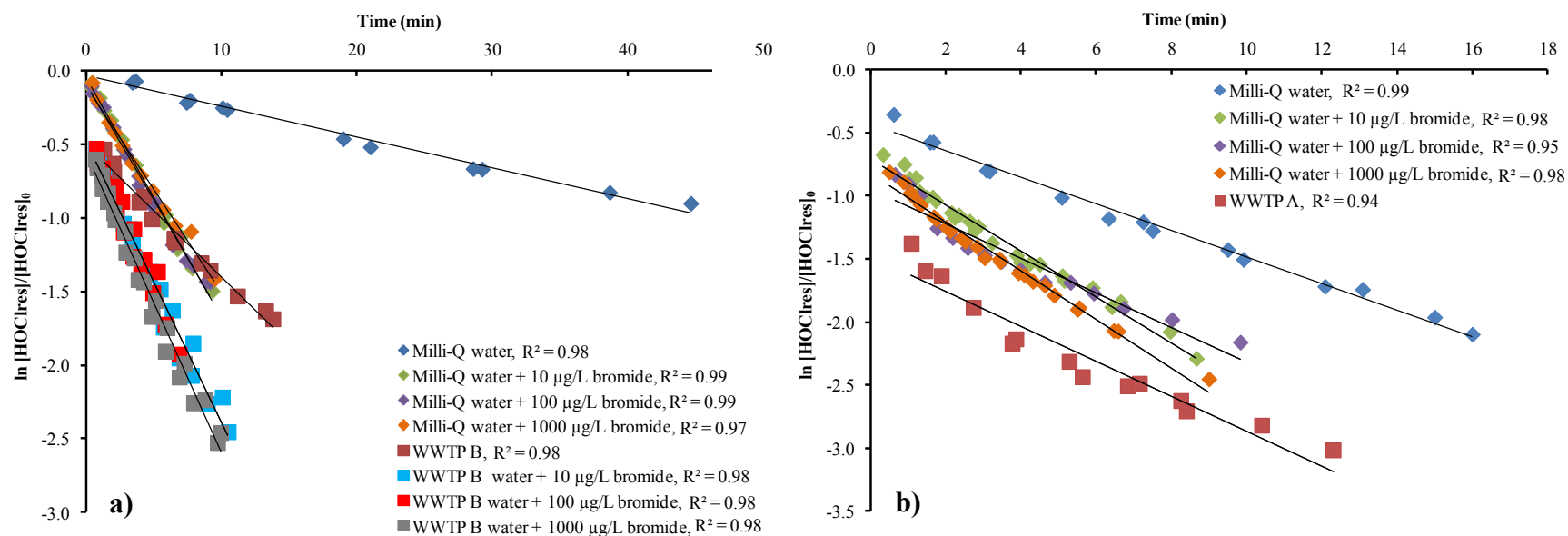


**Figure 6S - 1** Molecular structures of selected estrogenic steroid hormones and their acronyms, with atom numbering for the base structure of steroid hormones.

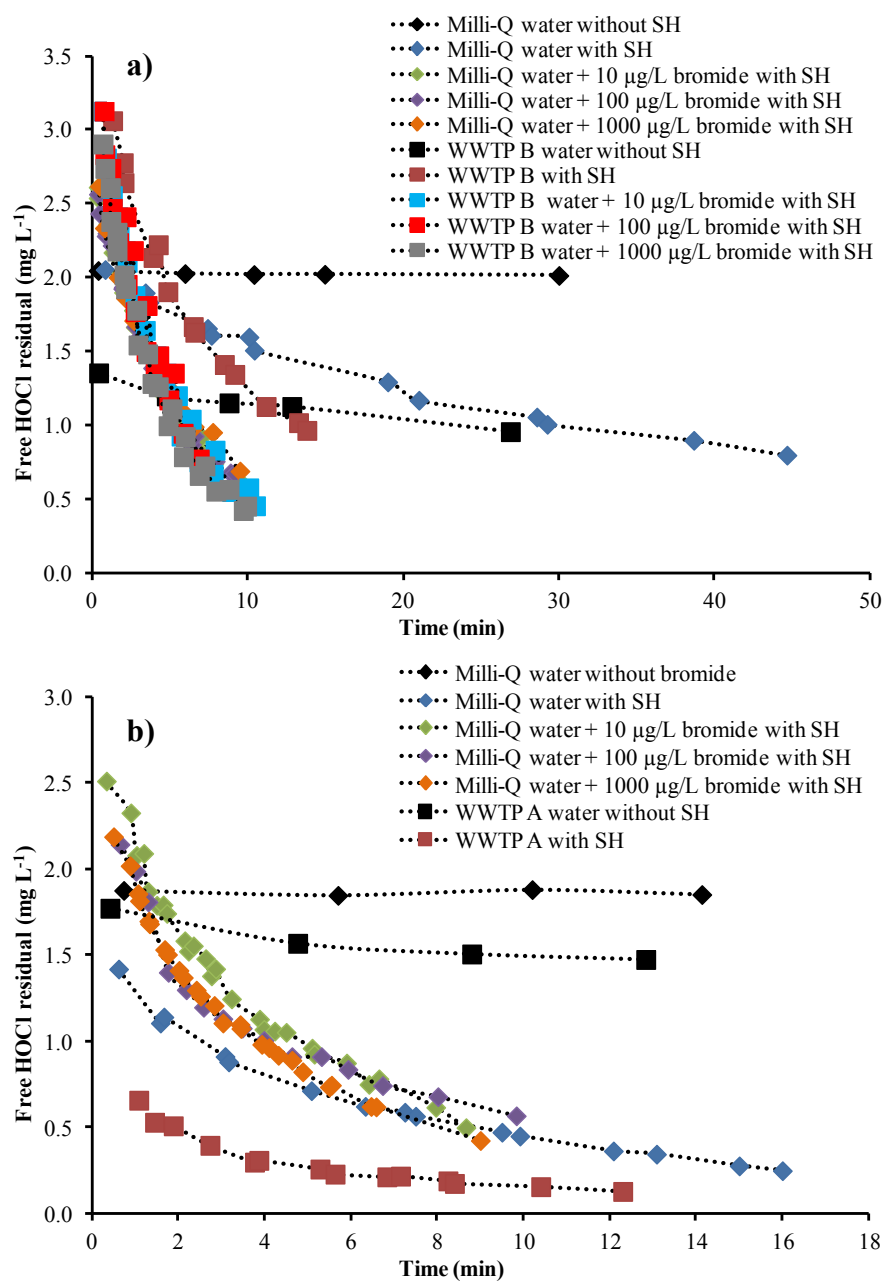


**Figure 6S - 2** Impact of solvents (methanol; MeOH, acetonitrile; ACN, acetone and ethyl acetate) on chlorine decay in batch reactor conditions without the addition of steroid hormones at concentrations of chlorine of a) 2 mg L<sup>-1</sup> and b) 10 mg L<sup>-1</sup>. Experimental conditions were, [HOCl]<sub>0</sub> = 2 or 10 mg L<sup>-1</sup> at pH 8.0 in Milli-Q water with a 0.2% v/v addition of solvent into 500 mL batch reactor. Error bars represent the standard deviation of replicate measurements/batch (n=3).





**Figure 6S - 3** Pseudo-first-order kinetic plots corresponding to decay curves of chlorine in the presence of estrogenic steroid hormones (E2, E1 and EE2) with and without the addition of bromide (10, 100 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in Milli-Q water and drinking waters according to pH values for a) DWTP B, pH 6.3 and Milli-Q, pH 6.0 and b) DWTP A, pH 8.2 and Milli-Q, pH 8.0. Experimental conditions were,  $[\text{HOCl}]_0$  from 26 to 99  $\mu\text{M}$  and  $[\text{estrogens}]_0$  from 0.883 to 9.76  $\mu\text{M}$ . Solid lines represent the linear regression of the measured data (symbols) with their related coefficients of determination ( $R^2$ ) also given.



**Figure 6S - 4** Decay curves of chlorine with estrogenic steroid hormone (SH) in Milli-Q water and drinking waters according to pH values and the addition of bromide with a) DWTP B, pH 6.3 and Milli-Q, pH 6.0 and b) DWTP A, pH 8.2 and Milli-Q, pH 8.0. Experimental conditions were,  $[\text{HOCl}]_0$  from 26 to 99  $\mu\text{M}$  and  $[\text{estrogens}]_0$  from 0.883 to 9.76  $\mu\text{M}$ . Solid and dotted lines represent the trend of the measured data (symbols).

**Tableau 6S - 1** Physicochemical properties of selected estrogenic steroid hormones

Steroid Hormones	MW <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	Water solubility <sup>a</sup>		Vapor pressure <sup>a</sup> (mm Hg)	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>b</sup>
		(mg L <sup>-1</sup> at 20°C)				
E2	272.4	3.6		$1.3 \times 10^{-8}$	4.01	10.5
E1	270.4	30		$1.4 \times 10^{-7}$	3.13	10.3
EE2	296.4	11.3		$2.7 \times 10^{-9}$	3.67	10.4

<sup>a</sup> The data was collected from the SRC PhysProp database. <http://www.syrres.com> [350]

<sup>b</sup> The pK<sub>a</sub> values for E1, E2 and EE2 are experimental and taken from the literature [351]

**Tableau 6S - 2** MS/MS parameters for the analysis of selected estrogenic steroid hormone analytes in negative (NI) and in positive (PI) ionization mode by LDTD-APCI-MS/MS

Compound	Ionisation mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Relative intensity ratio <sup>a</sup> (%)	TL (V)	CE (eV)
E1	NI	269	143	45 ± 6	-84	57
			145	100	-84	41
E2	PI	255	133	31 ± 3	68	18
			144	21 ± 3	68	40
			159	100	68	19
EE2	PI	279	133	100	46	16
			159	69 ± 11	46	20
EE2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	NI	297	145	100	-74	43
	PI	281	133	100	48	23

<sup>a</sup> The most abundant product ion was used for quantification whereas the second most abundant product ions were used for to confirm the presence of the steroid hormones.

**Tableau 6S - 3** MS/MS parameters for the analysis of selected estrogenic steroid hormone analytes in positive (PI) ionization mode by LC-APCI-MS/MS

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Intensity ratio <sup>a</sup> (%)	TL (V)	CE (eV)
E1	271	157	100	91	22
	[M+H] <sup>+</sup>	133	93 ± 6	91	22
E2	255	159	100	100	16
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	133	29 ± 2	100	17
EE2	279	133	100	87	15
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	159	80 ± 7	87	18
EE2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	281	133	100	93	20
	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>				

<sup>a</sup> The most abundant product ion was used for quantification whereas the second most abundant product ions were used for to confirm the presence of the steroid hormones.

**Tableau 6S - 4** Oxidation rate constants ( $k$ ,  $M^{-1} \text{sec}^{-1}$ ) of other endocrine disrupting compounds found in the literature with similar reactivity than the selected estrogenic steroid hormones in this study (without and with bromine at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). All rate constants were determined in ultrapure water (Milli-Q water) for temperatures between 20 and 25°C. Rate constants at the specified pH values were available experimentally or calculated from species-specific second-order rate constants given in the literature.<sup>a</sup>

Compounds	Milli-Q water						
	$k_{app}$ ( $M^{-1}\text{sec}^{-1}$ )						
	$\text{O}_3^b$	$\text{ClO}_2^c$	$\text{Fe(VI)}^d$	$\text{Mn(VII)}^e$	$\text{HOCl}^f$	$\text{HOCl}$	$\text{HOCl} + \text{Br}^-$
<b>E2</b>	$E^\circ, V = 2.07$	$E^\circ, V = 0.95$	$E^\circ, V = 2.20$	$E^\circ, V = 1.68$	$E^\circ, V = 1.35$	<i>our study</i>	<i>our study</i>
pH 6.0	$3.38 \times 10^5$	n.a.	$9.57 \times 10^2$	$2.61 \times 10^1$	$1.48 \times 10^1$	$2.30 \times 10^1$	$8.70 \times 10^1$
pH 8.0	$1.19 \times 10^7$	n.a.	$3.69 \times 10^2$	$8.30 \times 10^2$	$2.77 \times 10^2$	$3.57 \times 10^2$	$5.89 \times 10^2$
<b>E1</b>							
pH 6.0	$3.65 \times 10^5$	n.a.	n.a.	$2.61 \times 10^1$	$2.38 \times 10^1$	$2.40 \times 10^1$	$9.10 \times 10^1$
pH 8.0	$2.13 \times 10^7$	n.a.	n.a.	$7.85 \times 10^2$	$4.98 \times 10^2$	$3.87 \times 10^2$	$5.95 \times 10^2$
<b>EE2</b>							
pH 6.0	$3.28 \times 10^5$	$1.83 \times 10^4$	$9.04 \times 10^2$	n.a.	$1.78 \times 10^1$	$2.50 \times 10^1$	$8.50 \times 10^1$
pH 8.0	$1.47 \times 10^7$	$1.82 \times 10^6$	$4.21 \times 10^2$	n.a.	$3.36 \times 10^2$	$4.40 \times 10^2$	$5.66 \times 10^2$
<b>E3</b>							
pH 6.0	$2.56 \times 10^5$	n.a.	n.a.	$2.80 \times 10^1$	$1.84 \times 10^1$	n.d.	n.d.
pH 8.0	$1.55 \times 10^7$	n.a.	n.a.	$8.34 \times 10^2$	$3.40 \times 10^2$	n.d.	n.d.
<b>BPA</b>							
pH 6.0	$2.83 \times 10^5$	n.a.	$7.90 \times 10^2$	$1.63 \times 10^1$	$9.33 \times 10^0$	n.d.	n.d.
pH 8.0	$2.62 \times 10^7$	n.a.	$3.83 \times 10^2$	$3.94 \times 10^2$	$1.85 \times 10^2$	n.d.	n.d.
<b>NP</b>							
pH 6.0	$1.74 \times 10^5$	n.a.	$1.61 \times 10^3$	$1.20 \times 10^1$	$2.72 \times 10^0$	n.d.	n.d.
pH 8.0	$1.36 \times 10^7$	n.a.	$2.91 \times 10^2$	$9.17 \times 10^2$	$3.62 \times 10^2$	n.d.	n.d.
<b>Phenol</b>							
pH 6.0	n.a.	n.a.	n.a.	$1.47 \times 10^0$	$1.48 \times 10^0$	n.d.	n.d.
pH 8.0	n.a.	n.a.	$4.50 \times 10^1$	$4.27 \times 10^1$	$7.65 \times 10^2$	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> E2= estradiol; E1=estrone; EE2=17- $\alpha$ -ethynylestradiol; E3=estriol; BPA=bisphenol-A; NP=4-*n*-nonyphenol; n.a.= not available or not found in the literature; n.d.= not determined. Redox potential ( $E^\circ, V$ ) are found in ref. [421]

<sup>b</sup> Calculated from ref. [208]

<sup>c</sup> Calculated from ref. [422]

<sup>d</sup> Calculated from ref. [420] and ref. [417]

<sup>e</sup> Taken from ref. [361]

<sup>f</sup> Taken from ref. [232, 239]

**Tableau 6S - 5** Measured concentrations of TTHM as chlorination (CT of 52 mg.min L<sup>-1</sup>) byproducts with drinking waters (DWTP A, pH 8.2 and DWTP B, pH 6.3) with and without estrogenic steroid hormones (SHs)<sup>a</sup>

Water type	TTHM (µg L <sup>-1</sup> )
WWTP A without SHs	28
WWTP A with SHs	4
WWTP B without SHs	64
WWTP B with SHs	15

<sup>a</sup>*Disinfection by-products (DBPs):* Trihalomethanes (THMs) were quantified by capillary chromatography [423]. The sum of four trihalomethanes, i.e. chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform, was reported as the total THM (TTHM) concentration. The THM analysis were performed using a CP-3800 gas chromatograph (Varian) coupled with an electron capture detector (GC-ECD).

## **Chapitre 6 Conclusion**

---

## 6.1 Conclusion

Depuis quelques décennies, les contaminants émergents sont devenus une source d'intérêt grandissant. Parmi ceux-ci, les perturbateurs endocriniens, spécifiquement les hormones stéroïdiennes sont particulièrement importantes. En effet, l'effet des hormones stéroïdiennes sur les écosystèmes aquatique et terrestre sont clairement démontrées dans la littérature pour des concentrations aussi faibles que  $1 \text{ ng L}^{-1}$ . Les sources responsables du déversement de ces composés dans l'environnement aquatique sont multiples et découlent majoritairement de leur consommation et excrétion naturelle autant humaine qu'animale. Aucun effet délétère en lien direct avec les hormones stéroïdiennes sur les humains n'a été démontré jusqu'à présent. Toutefois, diverses maladies chez l'humain sont soupçonnées d'être le résultat de l'exposition aux hormones stéroïdiennes et autres perturbateurs endocriniens. Le risque associé à des années d'exposition, avec les éventuels effets cumulatifs ou synergiques de ces substances, ne doit pas être ignoré et une approche préventive plutôt que réactive doit être adoptée.

Dans ce contexte, différentes techniques pour la détection et la quantification des hormones stéroïdiennes dans les eaux usées et les eaux de surface ont été développées et validées. Les hormones stéroïdiennes visées comptent quatre oestrogènes et quatre progestagènes, choisies en raison de leur présence et quantité dans l'environnement. Une première méthode ultrarapide, éliminant la nécessité de la chromatographie liquide traditionnelle a été proposée et validée, celle-ci utilisant une nouvelle interface d'introduction d'échantillons par désorption thermique à diode laser (LDTD). Cette interface est munie d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (APCI) et permet une analyse en moins de 15 sec par échantillon. En effet, une diode laser infrarouge permet la volatilisation rapide des hormones, par désorption thermique. Ils sont ensuite entraînés dans la région d'ionisation puis transférés, détectés et quantifiés par spectromètre de masse en tandem (MS/MS). Une SPE manuelle a servi pour le prétraitement de l'échantillon d'eau naturelle contenant les hormones stéroïdiennes. La SPE manuelle suivi de LDTD-APCI-MS/MS donne des limites de détection entre  $13$  et  $43 \text{ ng L}^{-1}$ . Une seconde méthode instrumentale a été développée pour remplacer la SPE manuelle par une méthode automatisée couplée à la chromatographie liquide (LC) avec une détection pas MS/MS pour l'analyse des hormones stéroïdiennes. Cette



approche permet de réduire le temps requis et simplifie l'étape de prétraitement de l'échantillon. La SPE-LC-APCI-MS/MS a permis d'obtenir des résultats reproductibles avec un important gain de temps (15 min par échantillon), comparativement à la SPE manuelle conventionnelle couplée à la MS/MS. Les limites de détections obtenues dans les eaux usées étaient entre 8 et 60 ng L<sup>-1</sup>. En plus de la validation de cette méthode, l'impact de la préparation de l'échantillon sur l'intégrité de l'analyse, soit la collecte des eaux, la filtration et la conservation, a été évalué. Les limites de détection obtenues lors du développement des méthodes analytiques sont appropriées compte tenu des concentrations en hormones dans les eaux usées (affluent et effluent) et de surfaces qui se situent entre 5 et 400 ng L<sup>-1</sup> selon une revue de la littérature pour différents pays dans le monde entre 1998 et 2013. En ce qui concerne la concentration des hormones pouvant se retrouver dans les eaux potables, il faudrait améliorer les limites de détection, compte-tenu des faibles concentrations anticipées.

Aussi, de façon à évaluer les méthodes d'élimination des hormones stéroïdiennes des eaux, leur oxydation par le chlore et permanganate a été considérée. L'impact du pH, de la nature de l'eau (eau ultrapure versus eau usée) et de la température sur les constantes de vitesse d'oxydation du deuxième ordre a été évalué et discuté. Les pourcentages d'élimination par le chlore pour les œstrogènes étaient entre 53% et 97% avec des temps de demi-vies entre 0.61 et 53 min alors que pour les progestagènes avec le permanganate celles-ci variaient entre 78% et 97% avec des demi-vies de 10 à 60 min. Le chlore n'avait pas d'effet sur les hormones progestagéniques mais était efficace pour la dégradation des hormones oestrogéniques alors que le permanganate peut servir dans les deux cas. La variation de pH (entre 6 et 8) n'avait aucun impact sur l'effet du permanganate dans les conditions d'oxydation des progestagènes alors que pour les œstrogènes en présence de chlore il jouait un rôle important, soit une augmentation des constantes de vitesse à un pH 8. Compte-tenu des variations de températures observées au Québec, les constantes de vitesse changeront également, avec des valeurs plus faibles à des températures plus froides, en hiver par exemple, comparativement à des températures plus chaudes en été. En ce qui concerne la nature de l'eau, le permanganate démontre des constantes de vitesse plus grandes en présence de matière organique par rapport à celles dans l'eau ultrapure à pH 8 ce qui est également le cas pour le chlore, peu importe le pH, si en présence de bromures.

Dans le même ordre d'idées et en complément aux travaux préalablement effectués, nous nous sommes attardés sur l'aspect de la séparation chromatographique des hormones. Les colonnes analytiques les plus souvent utilisées sont la phase inverse C18 (**Annexe 1**). Dans ces conditions, certaines hormones (E1, E2 et EE2, NORE), ne peuvent pas être séparées pour des temps d'analyse court. En effet, les temps requis pour séparer ces composés varient entre 30 et 40 min avec les phases mobiles constituées de MeOH ou d'ACN en combinaison avec l'eau. Dans le cadre de nos travaux, nous avons voulu améliorer cet aspect en nous concentrant sur la possibilité de faire des liaisons ponts hydrogènes avec les hormones à séparer au lieu des interactions hydrophobes traditionnellement exploitées. Ainsi, nous avons réussi à séparer les quatre hormones en question en utilisant une phase mobile constituée d'acétate d'éthyle (7%) dans le MeOH en combinaison avec de l'eau. Toutefois, l'acétate d'éthyle diminue légèrement l'efficacité de l'ionisation par APCI (affinité protonique supérieure au MeOH). Les tests sont encore en cours et nous avons eu des résultats similaires en utilisant le HFBA (l'acide heptafluorobutyrique) sans effets néfastes sur l'efficacité de l'ionisation.

## 6.2 Perspectives

La croissance de la population humaine et animale entrainera inévitablement une augmentation de la concentration des hormones stéroïdiennes dans l'environnement. Les défis importants seront donc principalement au niveau de leur élimination dans les usines de traitement des eaux. L'objectif est de diminuer leurs rejets dans les eaux réceptrices destinées à la production d'eau potable et où vivent les espèces aquatiques susceptibles à ces composés à de très faibles concentrations. De plus, nous nous sommes concentrés que sur les hormones stéroïdiennes, mais il existe plusieurs perturbateurs endocriniens de natures différentes (e.g. phtalates, phyto-œstrogènes, dioxines, pesticides). Ceux-ci sont également présents dans les eaux usées et peuvent interagir de diverses façons, en coopérant ou en produisant un effet synergique, où la réaction biologique de l'un sera amplifiée par l'existence du second. Il faut aussi tenir compte de cette possibilité dans les travaux futurs sur les hormones stéroïdiennes en combinaison avec d'autres perturbateurs endocriniens. Ceci met en évidence le besoin d'une collaboration étroite entre les ingénieurs, les chimistes et écotoxicologues ainsi que d'autres intervenants dans le traitement des eaux usées pour éliminer les hormones

stéroïdiennes et comprendre l'effet synergique causé par la présence d'autres perturbateurs endocriniens présent dans les matrices d'eaux environnementales.

D'un point de vue analytique, les défis sont les limites de quantification des méthodes développées, surtout quand il s'agit de détecter les hormones dans les eaux de surfaces et encore plus dans les eaux potables. Nous savons que l'impact sur la vie aquatique peut se manifester à des concentrations aussi basses que  $0.1 \text{ ng L}^{-1}$ . Présentement, les limites de quantification les plus faibles se trouvent entre  $0.5$  et  $1.0 \text{ ng L}^{-1}$  en moyenne pour des facteurs de concentrations qui varient entre 2500 et 5000 (**Annexe 1**) que ce soit par GC ou LC-MS/MS. Donc, nous devons améliorer les limites de détection de 5 à 10 fois, ce qui demande énormément de temps au niveau du volume d'eau à gérer et des facteurs de concentrations à atteindre en plus du nombre limité d'échantillons qui peuvent être analysés selon une telle méthode. Une des limitations de l'extraction sur phase solide (SPE) manuelle est qu'il est difficile d'injecter la totalité du volume de reconstitution dans les colonnes analytiques (souvent 4% de la masse pré-concentrée seulement). Ayant travaillé avec la SPE manuelle et celle automatisée en ligne, il serait possible d'effectuer en premier lieu la SPE manuelle, puis passer à la SPE en ligne de manière à mesurer la totalité de la masse pré-concentrée de l'échantillon, ce qui pourrait donner des facteurs de concentrations variant entre 60 000 et 120 000. Nous souhaitons effectuer des expériences afin d'évaluer la faisabilité, les limitations et les avantages de cette approche.

Une autre façon d'attaquer le problème des limites de détection, serait d'utiliser des méthodes de dérivation qui peuvent être couplées à l'extraction sur phase solide automatisée en ligne. Cette approche a été développée par certains, mais seulement dans le cas des hormones oestrogéniques, alors que les hormones progestagéniques ont une importance significative, comme nous l'avons démontré dans nos travaux. En effet, des limites de détection avec des ordres de grandeur entre 1 et 2 fois plus faibles sont obtenues lorsqu'une méthode dérivation est utilisée par rapport à une analyse directe des hormones dans l'eau ultrapure ou de surface. Toutefois, l'application d'une méthode de dérivation dans les matrices d'eaux complexes, comme les eaux usées, demeure difficile et ne donne pas d'aussi bons résultats. Donc, une approche basée sur la dérivation pourrait être envisagée pour obtenir de meilleurs limites de détection, mais elle doit être adaptée pour les eaux usées et applicables autant pour les hormones oestrogéniques que progestagéniques. Cette approche

et présentement étudiée dans nos laboratoires pour l'analyse des estrogènes et des estrogènes conjugués dans les eaux usées en combinaison avec la SPE automatisée en ligne. Les travaux sur les progestagènes devraient suivre d'ici peu.

Aussi, nos travaux sur les méthodes d'élimination des hormones stéroïdiennes par différentes approches oxydatives, nous permet de soulever d'autres questions. En effet, les sous-produits résultants des expériences d'oxydation possèdent-ils encore (ou plus) un effet de type perturbateur endocrinien et quelles sont leurs structures, surtout pour les progestatifs pour lesquels très peu d'information est disponible présentement? Par exemple, nous pourrions envisager des expériences dans lesquelles une hormone progestagénique serait mise en contact avec un agent oxydant dans l'eau ultrapure. Des aliquotes seraient alors recueillies selon des intervalles de temps afin suivre la dégradation de la molécule intacte ainsi que l'apparition des sous-produits. Les sous-produits pourraient être identifiés en utilisant un instrument à haute résolution de masse qui nous permettrait d'obtenir leurs masses exactes et de déterminer leurs structures respectives avec des expériences de MS/MS. L'effet endocrinien des sous-produits identifiés pourraient être évalué en y exposant des espèces aquatiques puis en évaluant les différences en termes de marqueurs biologiques par rapport à des espèces non-exposés (groupe contrôle).

Bref, les travaux analytiques sur les hormones stéroïdiennes demeurent un sujet d'intérêt dans les matrices environnementales et se doivent d'être améliorés si nous voulons répondre aux questions que nous avons encore à leur sujet ainsi qu'aux à celles à venir.

## **Bibliographie**

---

- [1] Carson, R. D., Darling, L., Darling, L. 1962. *Silent spring*. Houghton Mifflin ; Riverside Press, Boston; Cambridge, Mass.
- [2] van der Werf, H. M. G. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric Ecosyst Environ* 60:81-96.
- [3] Keith, L. H., Telliard, W. 1979. ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environ Sci Technol* 13:416-423.
- [4] Wania, F., Mackay, D. 1996. Peer reviewed: tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ Sci Technol* 30:390A-396A.
- [5] Jones, K. C., de Voogt, P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ Pollut* 100:209-221.
- [6] Vallack, H. W., Bakker, D. J., Brandt, I., Brostrom-Lunden, E., Brouwer, A., Bull, K. R., Gough, C., Guardans, R., Holoubek, I., Jansson, B., Koch, R., Kuylensstierna, J., Lecloux, A., Mackay, D., McCutcheon, P., Mocarelli, P., Taalman, R. D. 1998. Controlling persistent organic pollutants-what next? *Environ Toxicol Pharmacol* 6:143-175.
- [7] Mnif, W., Hassine, A. I., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 8:2265-2303.
- [8] Mnif, W., Pillon, A., Balaguer, P., Bartegi, A. 2007. Endocrine xenoestrogens disrupters: molecular mechanisms and detection methods. *Therapie* 62:369-386.
- [9] Lohmann, R., Breivik, K., Dachs, J., Muir, D. 2007. Global fate of POPs: current and future research directions. *Environ Pollut* 150:150-165.
- [10] Jacob, J., Cherian, J. 2013. Review of environmental and human exposure to persistent organic pollutants. *Asian Soc Sci* 9:107-120.
- [11] Hignite, C., Azarnoff, D. L. 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* 20:337-341.
- [12] Garrison, A. W., Pope, J. D., Allen, F. R. 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In Keith, L. H., ed, *Identification & analysis of organic pollutants in water*. Ann Arbor Science Publishers, pp 517-530.
- [13] 1998 Workshop on Emerging Drinking Water Contaminants, N. R. C. 1999. *Identifying future drinking water contaminants*. The National Academies Press.
- [14] Erickson, B. E. 2002. Analyzing the ignored environmental contaminants. *Environ Sci Technol* 36:140A-145A.

- [15] Daughton, C. G. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ Impact Assess* 24:711-732.
- [16] Daughton, C. G. 2004. *PPCPs in the environment: future research - beginning with the end always in mind*, 2 ed. Springer. 463-395.
- [17] Richardson, S. D., Ternes, T. A. 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 83:4614-4648.
- [18] Farré, M. I., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D. 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends Analyt Chem* 27:991-1007.
- [19] Fawell, J., Ong, C. N. 2012. Emerging contaminants and the implications for drinking water. *Int J Water Resour D* 28:247-263.
- [20] Muir, D. C., Howard, P. H. 2006. Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. *Environ Sci Technol* 40:7157-7166.
- [21] Ternes, T. A., Joss, A., Siegrist, H. 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 38:392A-399A.
- [22] Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ Int* 35:803-814.
- [23] Wiesmann, U., Choi, I. S., Dombrowski, E.-M. 2007. *Fundamentals of Biological Wastewater Treatment*. Wiley.
- [24] Dolar, D., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Moreno, J., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Barcelo, D. 2012. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *J Hazard Mater* 239-240:64-69.
- [25] De la Cruz, N., Gimenez, J., Esplugas, S., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Pulgarin, C. 2012. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Res* 46:1947-1957.
- [26] Acero, J. L., Javier Benitez, F., Real, F. J., Teva, F. 2012. Coupling of adsorption, coagulation, and ultrafiltration processes for the removal of emerging contaminants in a secondary effluent. *Chem Eng J* 210:1-8.
- [27] Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M., de Voogt, P., van Wezel, A. P. 2010. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Res* 44:461-476.

- [28] Christensen, F. M. 1998. Pharmaceuticals in the environment--a human risk? *Regul Toxicol Pharmacol* 28:212-221.
- [29] Kümmerer, K., Al-Ahamad, A. 1998. The cancer risk for humans related to cyclophosphamide and ifosfamide excretions emitted into surface water via hospital effluents. *Cancer Detect Prev* 22:136.
- [30] Miyamoto, J., Scienti, I. C. 2003. *Implications of endocrine active substances for humans and wildlife*. Union. 1617-2615.
- [31] Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, J., L. J., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, D., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkeback, N. E. 1995. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. In Agency., M. n. C. D. E. P., ed., p. 175.
- [32] Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P. 1997. *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? : a scientific detective story : with a new epilogue by the authors*. Plume.
- [33] Weybridge, T. 2012. *The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments*.
- [34] Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., Tilson, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4:715-740.
- [35] Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Van Der Kraak, G. 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organization.
- [36] Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Woodruff, T. J., Vom Saal, F. S. 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153:4097-4110.
- [37] Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30:293-342.



- [38] Fisher, J. S. 2004. Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? *Toxicology* 205:33-41.
- [39] Tyler, C. R., Jobling, S., Sumpter, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 28:319-361.
- [40] McLachlan, J. A. 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22:319-341.
- [41] De Coster, S., van Larebeke, N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012:713696.
- [42] Kortenkamp, A. M., O.; Faust, M.; Evans, R.; McKinlay, R.; Orton, F.; Rosivatz, E. 2012. State of the art assessment of endocrine disrupters - final report. European Commission. 135
- [43] Tortora, G. J., Grabowski, S. R. 1996. *Principles of anatomy and physiology*. HarperCollins College.
- [44] Hoover, R. N., Hyer, M., Pfeiffer, R. M., Adam, E., Bond, B., Cheville, A. L., Colton, T., Hartge, P., Hatch, E. E., Herbst, A. L., Karlan, B. Y., Kaufman, R., Noller, K. L., Palmer, J. R., Robboy, S. J., Saal, R. C., Strohsnitter, W., Titus-Ernstoff, L., Troisi, R. 2011. Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N Engl J Med* 365:1304-1314.
- [45] Newbold, R. R. 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol Appl Pharmacol* 199:142-150.
- [46] Kortenkamp, A. 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:98-105.
- [47] Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R. W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8897-8901.
- [48] Palace, V. P., Evans, R. E., Wautier, K. G., Mills, K. H., Blanchfield, P. J., Park, B. J., Baron, C. L., Kidd, K. A. 2009. Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake This paper is part of the series "Forty Years of Aquatic Research at the Experimental Lakes Area". *Can J Fish Aquat Sci* 66:1920-1935.
- [49] Hughes, C. L., Jr. 1988. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ Health Perspect* 78:171-174.

- [50] Setchell, K. D., Gosselin, S. J., Welsh, M. B., Johnston, J. O., Balistreri, W. F., Kramer, L. W., Dresser, B. L., Tarr, M. J. 1987. Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology* 93:225-233.
- [51] Newbold, R. R., Hanson, R. B., Jefferson, W. N., Bullock, B. C., Haseman, J., McLachlan, J. A. 2000. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 21:1355-1363.
- [52] Bryan, T. E., Gildersleeve, R. P., Wiard, R. P. 1989. Exposure of Japanese quail embryos to o,p'-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology, and feather morphology. *Teratology* 39:525-535.
- [53] Fry, D. M., Toone, C. K. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213:922-924.
- [54] Guillette, L. J., Jr., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102:680-688.
- [55] Guillette, L. J., Jr., Woodward, A. R., Crain, D. A., Pickford, D. B., Rooney, A. A., Percival, H. F. 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen Comp Endocrinol* 116:356-372.
- [56] Willingham, E., Crews, D. 1999. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 113:429-435.
- [57] Howell, W. M., Black, D. A., Bortone, S. A. 1980. Abnormal Expression of Secondary Sex Characters in a Population of Mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for Environmentally-Induced Masculinization. *Copeia* 1980:676-681.
- [58] Hossain, M. S., Larsson, A., Scherbak, N., Olsson, P. E., Orban, L. 2008. Zebrafish androgen receptor: isolation, molecular, and biochemical characterization. *Biol Reprod* 78:361-369.
- [59] Andersen, H. R., Andersson, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregaard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E. B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J. B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Skakkeboek, N. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M., et al. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for

- identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1:89-108.
- [60] Zou, E., Fingerman, M. 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 38:281-285.
- [61] Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., Vethaak, A. D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30:71-133.
- [62] Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B. 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397.
- [63] Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence river (Quebec, Canada). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134:189-198.
- [64] Latini, G., Knipp, G., Mantovani, A., Marcovecchio, M. L., Chiarelli, F., Soder, O. 2010. Endocrine disruptors and human health. *Mini Rev Med Chem* 10:846-855.
- [65] Safe, S. 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicology* 205:3-10.
- [66] Safe, S. 2005. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol Metab* 16:139-144.
- [67] Safe, S. H. 2000. Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ Health Perspect* 108:487-493.
- [68] Waring, R. H., Harris, R. M. 2005. Endocrine disruptors: a human risk? *Mol Cell Endocrinol* 244:2-9.
- [69] Waring, R. H., Harris, R. M. 2011. Endocrine disruptors--a threat to women's health? *Maturitas* 68:111-115.
- [70] Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J* 305:609-613.
- [71] Swan, S. H., Elkin, E. P., Fenster, L. 2000. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 108:961-966.

- [72] Halling, J., Petersen, M. S., Jorgensen, N., Jensen, T. K., Grandjean, P., Weihe, P. 2013. Semen quality and reproductive hormones in Faroese men: a cross-sectional population-based study of 481 men. *Brit Med J Open* 3:1-11.
- [73] Jorgensen, N., Joensen, U. N., Jensen, T. K., Jensen, M. B., Almstrup, K., Olesen, I. A., Juul, A., Andersson, A. M., Carlsen, E., Petersen, J. H., Toppari, J., Skakkebaek, N. E. 2012. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *Brit Med J Open* 2.
- [74] Iwamoto, T., Nozawa, S., Mieno, M. N., Yamakawa, K., Baba, K., Yoshiike, M., Namiki, M., Koh, E., Kanaya, J., Okuyama, A., Matsumiya, K., Tsujimura, A., Kanetake, H., Eguchi, J., Skakkebaek, N. E., Vierula, M., Toppari, J., Jorgensen, N. 2013. Semen quality of 1559 young men from four cities in Japan: a cross-sectional population-based study. *Brit Med J Open* 3.
- [75] Merzenich, H., Zeeb, H., Blettner, M. 2010. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* 10:24.
- [76] Pastuszak, A. W., Lamb, D. J. 2013. Counting your sperm before they fertilize: are sperm counts really declining? *Asian J Androl* 15:179-183.
- [77] Depue, R. H., Pike, M. C., Henderson, B. E. 1983. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* 71:1151-1155.
- [78] Weisglas-Kuperus, N., Vreugdenhil, H. J., Mulder, P. G. 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol Lett* 149:281-285.
- [79] Roy, J. R., Chakraborty, S., Chakraborty, T. R. 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15:RA137-145.
- [80] Lopez-Cervantes, M., Torres-Sanchez, L., Tobias, A., Lopez-Carrillo, L. 2004. Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 112:207-214.
- [81] Ahlborg, U. G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C. C., Hanberg, A., Baron, J., Trichopoulos, D., Adami, H. O. 1995. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol* 25:463-531.
- [82] Falck, F., Jr., Ricci, A., Jr., Wolff, M. S., Godbold, J., Deckers, P. 1992. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47:143-146.

- [83] Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J. L., Bennetau, B., Dunogues, J., Le Gac, F., Sumpter, J. P. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:263-272.
- [84] Hansen, P. D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C. 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Analyt Chem* 17:448-451.
- [85] Purdom, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., Sumpter, J. P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8:275-285.
- [86] van Vliet, L., Jensen, G. K. 2013. Revising the EU strategy on endocrine disruptors: nearing a decisive moment. *J Epidemiol Community Health* 67:383-384.
- [87] Starling, E. 1905. The Croonian Lectures ON THE CHEMICAL CORRELATION OF THE FUNCTIONS OF THE BODY. *Lancet* 166:339-341.
- [88] Simoni, R. D., Hill, R. L., Vaughan, M. 2002. The isolation of thyroxine and cortisone: the work of Edward C. Kendall. *J Biol Chem* 277:e10.
- [89] Harington, C. R., Barger, G. 1927. Chemistry of thyroxine: constitution and synthesis of thyroxine. *Biochem J* 21:169-183.
- [90] Tata, J. R. 2005. One hundred years of hormones. *EMBO Rep* 6:490-496.
- [91] Diczfalusy, E. 1982. Gregory Pincus and steroidal contraception revisited. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 105:7-15.
- [92] Goldstein, J. L. 2004. Towering science: an ounce of creativity is worth a ton of impact. *Nat Med* 10:1015-1017.
- [93] Voet, D., Voet, J. G. 1990. *Biochemistry*. Wiley.
- [94] Lednicer, D. 2011. *Steroid chemistry at a glance*. Wiley.
- [95] Payne, A. H., Hales, D. B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25:947-970.
- [96] Norman, A. W., Mizwicki, M. T., Norman, D. P. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3:27-41.
- [97] Norman, A. W., Litwack, G. 1997. *Hormones*. Elsevier Science.
- [98] Viglino, L., Aboufadi, K., Prevost, M., Sauve, S. 2008. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta* 76:1088-1096.
- [99] Canada, I. H. 2008. <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>.

- [100] Jones-Lepp, T. L., Stevens, R. 2007. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal Bioanal Chem* 387:1173-1183.
- [101] Barrett-Connor, E., Bush, T. L. 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265:1861-1867.
- [102] Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., Manson, J. E., Rosner, B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H. 1991. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 325:756-762.
- [103] Simon, J. A. 2012. What's new in hormone replacement therapy: focus on transdermal estradiol and micronized progesterone. *Climacteric* 15 Suppl 1:3-10.
- [104] Zohar, Y., Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197:99-136.
- [105] Andersen, H. R., Halling-Sorensen, B., Kusk, K. O. 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:56-61.
- [106] Corporation, S. R. FatePointers Search Module. <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>. September 5th 2013
- [107] Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol* 34:3890-3894.
- [108] Yu, Z., Xiao, B., Huang, W., Peng, P. 2004. Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. *Environ Toxicol Chem* 23:531-539.
- [109] Commission, E. Directive 96/22/EC [http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/press/press57\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/press/press57_en.pdf). September 8th 2013
- [110] Adlercreutz, H., Martin, F. 1980. Biliary excretion and intestinal metabolism of progesterone and estrogens in man. *J Steroid Biochem* 13:231-244.
- [111] D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ* 302:199-209.
- [112] Gomes, R. L., Birkett, J. W., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. 2005. Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem* 85:1-14.

- [113] Reddy, S., Iden, C. R., Brownawell, B. J. 2005. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 77:7032-7038.
- [114] Holthaus, K. I., Johnson, A. C., Jurgens, M. D., Williams, R. J., Smith, J. J., Carter, J. E. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. *Environ Toxicol Chem* 21:2526-2535.
- [115] Hanselman, T. A., Graetz, D. A., Wilkie, A. C. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environ Sci Technol* 37:5471-5478.
- [116] Kuster, M., José López de Alda, M., Barceló, D. 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends Analyt Chem* 23:790-798.
- [117] Nguyen, T. H., Goss, K. U., Ball, W. P. 2005. Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments. *Environ Sci Technol* 39:913-924.
- [118] Das, B. S., Lee, L. S., Rao, P. S., Hultgren, R. P. 2004. Sorption and degradation of steroid hormones in soils during transport: column studies and model evaluation. *Environ Sci Technol* 38:1460-1470.
- [119] Yamamoto, H., Liljestrand, H. M., Shimizu, Y., Morita, M. 2003. Effects of physical-chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. *Environ Sci Technol* 37:2646-2657.
- [120] Kim, I., Yu, Z., Xiao, B., Huang, W. 2007. Sorption of male hormones by soils and sediments. *Environ Toxicol Chem* 26:264-270.
- [121] McGechan, M. B., Lewis, D. R. 2002. SW—Soil and Water: transport of particulate and colloid-sorbed contaminants through soil, Part 1: general principles. *Biosyst Eng* 83:255-273.
- [122] Neale, P. A., Escher, B. I., Schafer, A. I. 2009. pH dependence of steroid hormone-organic matter interactions at environmental concentrations. *Sci Total Environ* 407:1164-1173.
- [123] Urase, T., Kikuta, T. 2005. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res* 39:1289-1300.
- [124] Donova, M. V. 2007. Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Appl Biochem Microbiol* 43:1-14.

- [125] Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. 2003. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol* 32:688-705.
- [126] Malaviya, A., Gomes, J. 2008. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol* 99:6725-6737.
- [127] Layton, A. C., Gregory, B. W., Seward, J. R., Schultz, T. W., Sayler, G. S. 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee U.S.A. *Environ Sci Technol* 34:3925-3931.
- [128] Li, F., Yuasa, A., Obara, A., Mathews, A. P. 2005. Aerobic batch degradation of 17-beta estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. *Water Res* 39:2065-2075.
- [129] Jurgens, M. D., Holthaus, K. I., Johnson, A. C., Smith, J. L., Hetheridge, M., Williams, R. J. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem* 21:480-488.
- [130] Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res* 38:2322-2329.
- [131] Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H., Omura, H. 2004. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 70:5283-5289.
- [132] Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B., Ternes, T. A. 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ Sci Technol* 37:4021-4026.
- [133] Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompert, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res* 38:2918-2926.
- [134] Dytczak, M. A., Londry, K. L., Oleszkiewicz, J. A. 2008. Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions. *Water Environ Res* 80:47-52.
- [135] Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A. 2005. Distribution of estrogens, 17beta-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 336:155-170.



- [136] Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225:81-90.
- [137] Ternes, T. A., Kreckel, P., Mueller, J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 225:91-99.
- [138] Kuster, M., López de Alda, M. J., Barceló, D. 2005. Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. In Barceló, D., ed, *Water Pollution*. Vol 2-The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, pp 1-24.
- [139] Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ Sci Technol* 34:5059-5066.
- [140] Behnisch, P. A., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I., Sakai, S. 2001. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere* 43:977-984.
- [141] Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324:55-66.
- [142] Johnson, A. C., Belfroid, A., Di Corcia, A. D. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* 256:163-173.
- [143] Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A. 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 501:79-88.
- [144] Nasu, M., Goto, M., Kato, H., Oshima, Y., Tanaka, H. 2001. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Sci Technol* 43:101-108.
- [145] Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A. S., Grinwis, G. C., Kuiper, R. V., Legler, J., Murk, T. A., Peijnenburg, W., Verhaar, H. J., de Voogt, P. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59:511-524.
- [146] Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schafer, A. J., Rijs, G. B., Wegener, J., Cofino, W. P. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their

glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* 225:101-108.

[147] Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32:1549-1558.

[148] Huang, C. H., Sedlak, D. L. 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* 20:133-139.

[149] Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M. 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 984:195-202.

[150] Jin, S., Yang, F., Liao, T., Hui, Y., Xu, Y. 2008. Seasonal variations of estrogenic compounds and their estrogenicities in influent and effluent from a municipal sewage treatment plant in China. *Environ Toxicol Chem* 27:146-153.

[151] Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202-1211.

[152] Kuch, H. M., Ballschmiter, K. 2001. 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* 35:3201-3206.

[153] Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E., Förlin, L. 1999. Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol* 45:91-97.

[154] Niven, S. J., Snape, J., Hetheridge, M., Evans, M., McEvoy, J., Sutton, P. G., Rowland, S. J. 2001. Investigations of the origins of estrogenic A-ring aromatic steroids in UK sewage treatment works effluents. *Analyst* 126:285-287.

[155] Sheahan, D. A., Brighty, G. C., Daniel, M., Kirby, S. J., Hurst, M. R., Kennedy, J., Morris, S., Routledge, E. J., Sumpter, J. P., Waldock, M. J. 2002. Estrogenic activity measured in a sewage treatment works treating industrial inputs containing high concentrations of alkylphenolic compounds--a case study. *Environ Toxicol Chem* 21:507-514.

- [156] Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E. C., Yoon, Y. 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202:156-181.
- [157] Spengler, P., Korner, W., Metzger, J. W. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ Toxicol Chem* 20:2133-2141.
- [158] Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.-F. 2011. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ Chem Lett* 9:103-114.
- [159] Xiao, X.-Y., McCalley, D. V., McEvoy, J. 2001. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A* 923:195-204.
- [160] Zhou, Y., Zha, J., Xu, Y., Lei, B., Wang, Z. 2012. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environ Monit Assess* 184:1719-1729.
- [161] Al-Odaini, N. A., Zakaria, M. P., Yaziz, M. I., Surif, S. 2010. 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* 1217:6791-6806.
- [162] Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Ait-Aissa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J. P., Balaguer, P. 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res* 46:1912-1922.
- [163] Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J. 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res* 45:732-740.
- [164] Chen, C. Y., Wen, T. Y., Wang, G. S., Cheng, H. W., Lin, Y. H., Lien, G. W. 2007. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Sci Total Environ* 378:352-365.
- [165] Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. 2005. The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res* 39:97-106.

- [166] Fayad, P. B., Prévost, M., Sauvé, S. 2013. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* 115:349-360.
- [167] Fernandez, M. P., Ikononou, M. G., Buchanan, I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ* 373:250-269.
- [168] Kolodziej, E. P., Gray, J. L., Sedlak, D. L. 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem* 22:2622-2629.
- [169] Kolok, A. S., Snow, D. D., Kohno, S., Sellin, M. K., Guillette, L. J., Jr. 2007. Occurrence and biological effect of exogenous steroids in the Elkhorn River, Nebraska, USA. *Sci Total Environ* 388:104-115.
- [170] Kuster, M., Azevedo, D. A., Lopez de Alda, M. J., Aquino Neto, F. R., Barcelo, D. 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ Int* 35:997-1003.
- [171] Labadie, P., Budzinski, H. 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal Bioanal Chem* 381:1199-1205.
- [172] Labadie, P., Budzinski, H. 2005. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ Sci Technol* 39:5113-5120.
- [173] Morteani, G., Moller, P., Fuganti, A., Paces, T. 2006. 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* 28:257-264.
- [174] Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M. 2011. Presence of pharmaceuticals and hormones in waters from sewage treatment plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 217:267-281.
- [175] Pu, C., Wu, Y.-F., Yang, H., Deng, A.-P. 2008. Trace analysis of contraceptive drug levonorgestrel in wastewater samples by a newly developed indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) coupled with solid phase extraction. *Anal Chim Acta* 628:73-79.
- [176] Qiao, Y., Yang, H., Wang, B., Song, J., Deng, A. 2009. Preparation and characterization of an immunoaffinity chromatography column for the selective extraction of trace contraceptive drug levonorgestrel from water samples. *Talanta* 80:98-103.

- [177] Solé, M., López de Alda, M. J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barceló, D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 34:5076-5083.
- [178] Sun, L., Yong, W., Chu, X., Lin, J. M. 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:5416-5423.
- [179] Vulliet, E., Baugros, J. B., Flament-Waton, M. M., Grenier-Loustalot, M. F. 2007. Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Anal Bioanal Chem* 387:2143-2151.
- [180] Yoon, Y., Ryu, J., Oh, J., Choi, B. G., Snyder, S. A. 2010. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Sci Total Environ* 408:636-643.
- [181] Petrovic, M., Sole, M., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D. 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 21:2146-2156.
- [182] Blackburn, R. D., Cunkelman, A., Zlidar, V. M. 2000. Oral contraceptives--an update. *Popul Rep A* 28:1-16, 25-32.
- [183] Arcand-Hoy, L. D., Nimrod, A. C., Benson, W. H. 1998. Endocrine-modulating substances in the environment estrogenic effects of pharmaceutical products. *Int J Toxicol* 17:139-158.
- [184] Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., Surampalli, R. Y. 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem* 41:525-539.
- [185] Ren, Y. X., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N., Nishimura, O. 2007. A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process. *Water Res* 41:2341-2348.
- [186] Andersen, H. R., Hansen, M., Kjolholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T., Halling-Sorensen, B. 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61:139-146.
- [187] Johnson, A. C., Sumpter, J. P. 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ Sci Technol* 35:4697-4703.

- [188] Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N. 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56:843-851.
- [189] Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P., Brenner, R. 2007. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: conventional treatment. *Chemosphere* 66:1535-1544.
- [190] Babel, S., Kurniawan, T. A. 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *J Hazard Mater* 97:219-243.
- [191] Jiuhui, Q. U. 2008. Research progress of novel adsorption processes in water purification: a review. *J Environ Sci (China)* 20:1-13.
- [192] Cheremisinoff, N. P. 2002. *Handbook of water and wastewater treatment technologies*. Butterworth-Heinemann.
- [193] Kumar, A. K., Mohan, S. V., Sarma, P. N. 2009. Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: kinetic and mechanistic evaluation. *J Hazard Mater* 164:820-828.
- [194] Zhang, Y., Zhou, J. L. 2005. Removal of estrone and 17beta-estradiol from water by adsorption. *Water Res* 39:3991-4003.
- [195] Curcio, P. 2009. Approche semi-covalente pour la préparation de polymères imprimés par la technique de polymérisation en mini-émulsion. Université de Strasbourg.
- [196] Meng, Z., Chen, W., Mulchandani, A. 2005. Removal of estrogenic pollutants from contaminated water using molecularly imprinted polymers. *Environ Sci Technol* 39:8958-8962.
- [197] Le Noir, M., Lepeuple, A. S., Guieysse, B., Mattiasson, B. 2007. Selective removal of 17beta-estradiol at trace concentration using a molecularly imprinted polymer. *Water Res* 41:2825-2831.
- [198] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T. 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239:229-246.
- [199] Nghiem, L. D., Manis, A., Soldenhoff, K., Schafer, A. I. 2004. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *J Memb Sci* 242:37-45.
- [200] Liu, Z. H., Kanjo, Y., Mizutani, S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Sci Total Environ* 407:731-748.

- [201] Bellona, C., Drewes, J. E., Xu, P., Amy, G. 2004. Factors affecting the rejection of organic solutes during NF/RO treatment--a literature review. *Water Res* 38:2795-2809.
- [202] Schafer, A. I., Akanyeti, I., Semiao, A. J. 2011. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. *AdvColloid Interfac* 164:100-117.
- [203] Pereira, R. O., Postigo, C., de Alda, M. L., Daniel, L. A., Barcelo, D. 2011. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere* 82:789-799.
- [204] Dantas, R. F., Canterino, M., Marotta, R., Sans, C., Esplugas, S., Andreozzi, R. 2007. Bezafibrate removal by means of ozonation: primary intermediates, kinetics, and toxicity assessment. *Water Res* 41:2525-2532.
- [205] Dantas, R. F., Contreras, S., Sans, C., Esplugas, S. 2008. Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. *J Hazard Mater* 150:790-794.
- [206] Mantzavinos, D., Psillakis, E. 2004. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79:431-454.
- [207] Maniero, M. G., Bila, D. M., Dezotti, M. 2008. Degradation and estrogenic activity removal of 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol by ozonation and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Sci Total Environ* 407:105-115.
- [208] Deborde, M., Rabouan, S., Duguet, J. P., Legube, B. 2005. Kinetics of aqueous ozone-induced oxidation of some endocrine disruptors. *Environ Sci Technol* 39:6086-6092.
- [209] Bila, D., Montalvao, A. F., Azevedo Dde, A., Dezotti, M. 2007. Estrogenic activity removal of 17beta-estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere* 69:736-746.
- [210] Yargeau, V., Leclair, C. 2008. Impact of operating conditions on decomposition of antibiotics during ozonation: a review. *Ozone: Sci Eng* 30:175-188.
- [211] Augugliaro, V., Bellardita, M., Loddo, V., Palmisano, G., Palmisano, L., Yurdakal, S. 2012. Overview on oxidation mechanisms of organic compounds by TiO<sub>2</sub> in heterogeneous photocatalysis. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* 13:224-245.
- [212] Palmisano, G., Garcia-Lopez, E., Marci, G., Loddo, V., Yurdakal, S., Augugliaro, V., Palmisano, L. 2010. Advances in selective conversions by heterogeneous photocatalysis. *Chem Commun (Camb)* 46:7074-7089.

- [213] Herrmann, J.-M. 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catal Today* 53:115-129.
- [214] Herrmann, J.-M. 2010. Photocatalysis fundamentals revisited to avoid several misconceptions. *Appl Catal, B* 99:461-468.
- [215] Herrmann, J.-M. 2010. Fundamentals and misconceptions in photocatalysis. *J Photochem Photobiol A Chem* 216:85-93.
- [216] Robert, D., Malato, S. 2002. Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification. *Sci Total Environ* 291:85-97.
- [217] Augugliaro, V., García-López, E., Loddo, V., Malato-Rodríguez, S., Maldonado, I., Marci, G., Molinari, R., Palmisano, L. 2005. Degradation of lincomycin in aqueous medium: Coupling of solar photocatalysis and membrane separation. *Sol Energy* 79:402-408.
- [218] Molinari, R., Pirillo, F., Loddo, V., Palmisano, L. 2006. Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceuticals in water by using polycrystalline TiO<sub>2</sub> and a nanofiltration membrane reactor. *Catal Today* 118:205-213.
- [219] Coleman, H. M., Routledge, E. J., Sumpter, J. P., Eggins, B. R., Byrne, J. A. 2004. Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilised titanium dioxide catalyst. *Water Res* 38:3233-3240.
- [220] Liu, B., Liu, X. 2004. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Sci Total Environ* 320:269-274.
- [221] Caupos, E., Mazellier, P., Croue, J. P. 2011. Photodegradation of estrone enhanced by dissolved organic matter under simulated sunlight. *Water Res* 45:3341-3350.
- [222] Leech, D. M., Snyder, M. T., Wetzel, R. G. 2009. Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 $\alpha$ -estradiol in water. *Sci Total Environ* 407:2087-2092.
- [223] Lin, A. Y., Reinhard, M. 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environ Toxicol Chem* 24:1303-1309.
- [224] Zuo, Y., Zhang, K., Deng, Y. 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere* 63:1583-1590.
- [225] Chowdhury, R. R., Charpentier, P. A., Ray, M. B. 2011. Photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. *J Photochem Photobiol A Chem* 219:67-75.



- [226] Rosenfeldt, E. J., Chen, P. J., Kullman, S., Linden, K. G. 2007. Destruction of estrogenic activity in water using UV advanced oxidation. *Science of The Total Environment* 377:105-113.
- [227] Cotruvo, J. A. 1981. Trihalomethanes (THMs) in drinking water. *Environ Sci Technol* 15:268-274.
- [228] Crittenden, J. C., Trussel, R. R., Hand, D. W., Howe, K. J., Tchobanglous, G. 2005. *Water treatment: principles and design*, 2 ed. Wiley.
- [229] Reinhard, M., W., S. 1990. *Kinetics of chlorination of p-xylene in aqueous solution*. Taylor & Francis, Michigan. 209-218.
- [230] Cherney, D. P., Duirk, S. E., Tarr, J. C., Collette, T. W. 2006. Monitoring the speciation of aqueous free chlorine from pH 1 to 12 with Raman spectroscopy to determine the identity of the potent low-pH oxidant. *Appl Spectrosc* 60:764-772.
- [231] Deborde, M., von Gunten, U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res* 42:13-51.
- [232] Deborde, M., Rabouan, S., Gallard, H., Legube, B. 2004. Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environ Sci Technol* 38:5577-5583.
- [233] Rodriguez, M. J., Serodes, J. B., Levallois, P. 2004. Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system. *Water Res* 38:4367-4382.
- [234] Guo, G. M. 2011. Factors influencing the formation of trihalomethanes and haloacetic acids in source water. *Adv Mater Res* 183:347-351.
- [235] Liang, L., Singer, P. C. 2003. Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. *Environ Sci Technol* 37:2920-2928.
- [236] Florentin, A., Hautemaniere, A., Hartemann, P. 2011. Health effects of disinfection by-products in chlorinated swimming pools. *Int J Hyg Environ Health* 214:461-469.
- [237] Abu Qdais, H. A., Al-Abed, N., Al-Ghazawi, Z., Abdulla, F. 2009. Prediction of trihalomethane formation in water distribution systems. *Desalination Water Treat* 2:166-173.
- [238] Serodes, J. B., Rodriguez, M. J., Li, H., Bouchard, C. 2003. Occurrence of THMs and HAAs in experimental chlorinated waters of the Quebec City area (Canada). *Chemosphere* 51:253-263.

- [239] Acero, J. L., Piriou, P., von Gunten, U. 2005. Kinetics and mechanisms of formation of bromophenols during drinking water chlorination: Assessment of taste and odor development. *Water Res* 39:2979-2993.
- [240] Gallard, H., Pellizzari, F., Croue, J. P., Legube, B. 2003. Rate constants of reactions of bromine with phenols in aqueous solution. *Water Res* 37:2883-2892.
- [241] Lee, Y., Escher, B. I., von Gunten, U. 2008. Efficient removal of estrogenic activity during oxidative treatment of waters containing steroid estrogens. *Environ Sci Technol* 42:6333-6339.
- [242] Westerhoff, P., Chao, P., Mash, H. 2004. Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. *Water Res* 38:1502-1513.
- [243] Hu, L., Martin, H. M., Arce-Bulted, O., Sugihara, M. N., Keating, K. A., Strathmann, T. I. 2009. Oxidation of carbamazepine by Mn(VII) and Fe(VI): reaction kinetics and mechanism. *Environ Sci Technol* 43:509-515.
- [244] Ma, J. G., N. 1996. Controlling the formation of chloroform by permanganate preoxidation- destruction of precursors. *J Water Supply Res Technol-AQUA* 45:308-315.
- [245] Waldemer, R. H., Tratnyek, P. G. 2006. Kinetics of contaminant degradation by permanganate. *Environ Sci Technol* 40:1055-1061.
- [246] Ma, J. G., N.; Li, G. 1997. Effect of permanganate preoxidation in enhancing the coagulation of surface water- laboratory case studies. *J Water Supply Res Technol-AQUA* 46:1-10.
- [247] Stone, A. T. 1987. Reductive dissolution of manganese(III/IV) oxides by substituted phenols. *Environ Sci Technol* 21:979-988.
- [248] Zhang, H., Huang, C. H. 2003. Oxidative transformation of triclosan and chlorophene by manganese oxides. *Environ Sci Technol* 37:2421-2430.
- [249] Dash, S., Patel, S., Mishra, B. K. 2009. Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects. *Tetrahedron* 65:707-739.
- [250] Zhou, W. J., Boyd, J. M., Qin, F., Hrudey, S. E., Li, X. F. 2009. Formation of N-nitrosodiphenylamine and two new N-containing disinfection byproducts from chloramination of water containing diphenylamine. *Environ Sci Technol* 43:8443-8448.
- [251] Johnson, M. D., Sharma, K. D. 1999. Kinetics and mechanism of the reduction of ferrate by one-electron reductants. *Inorg Chim Acta* 293:229-233.
- [252] Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodriguez, J. J. 2012. Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance

liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. *Journal of Chromatography A* 1230:66-76.

[253] Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D. 2001. 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. *Journal of Chromatography A* 911:203-210.

[254] Boyd, R. K., Basic, C., Bethem, R. A. 2011. *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. Wiley.

[255] Miller, P. E., Denton, M. B. 1986. The quadrupole mass filter: Basic operating concepts. *J Chem Edu* 63:617.

[256] Miller, J. M. 2004. *Chromatography: concepts and contrasts*. Wiley.

[257] Claessens, H. A., van Straten, M. A. 2004. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1060:23-41.

[258] Gross, J. H. 2004. *Mass spectrometry: a textbook*. Springer.

[259] De Hoffmann, E., Stroobant, V. 2005. *Spectrométrie de masse: Cours et exercices corrigés*, 3 ed. Dunod.

[260] Rouessac, F., Rouessac, A., Ourisson, G., Cruché, D. 2004. *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales modernes, Cours et exercices corrigés*, 6 ed. Dunod.

[261] Abian, J. 1999. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34:157-168.

[262] Covey, T. R., Thomson, B. A., Schneider, B. B. 2009. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrom Rev* 28:870-897.

[263] Gelpi, E. 2002. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *J Mass Spectrom* 37:241-253.

[264] Thomson, B. A. 1998. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry—together at last. *J Am Soc Mass Spectrom* 9:187-193.

[265] Kostianin, R., Kauppila, T. J. 2009. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:685-699.

[266] Watson, J. T., Sparkman, O. D. 2008. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*, 4 ed. Wiley.

- [267] Byrdwell, W. C. 2001. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 36:327-346.
- [268] Carroll, D. I., Dzidic, I., Horning, E. C., Stillwell, R. N. 1981. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Appl Spectrosc Rev* 17:337-406.
- [269] Luosujarvi, L., Karikko, M. M., Haapala, M., Saarela, V., Huhtala, S., Franssila, S., Kostiainen, R., Kotiaho, T., Kauppila, T. J. 2008. Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization microchips. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:425-431.
- [270] Ma, Y. C., Kim, H. Y. 1997. Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 8:1010-1020.
- [271] Lien, G.-W., Chen, C.-Y., Wang, G.-S. 2009. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *Journal of Chromatography A* 1216:956-966.
- [272] Wang, C., Gardinali, P. R. 2012. Comparison of multiple API techniques for the simultaneous detection of microconstituents in water by on-line SPE-LC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 47:1255-1268.
- [273] Loconto, P. R. 2012. *Trace environmental quantitative analysis: principles, techniques and applications*, 2 ed. Taylor & Francis.
- [274] Commission, E. 2002. Off. J. Eur. Com. L221
- [275] Schlusener, M. P., Bester, K. 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:3269-3278.
- [276] Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G. 2004. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306:471-473.
- [277] Takáts, Z., Wiseman, J. M., Cooks, R. G. 2005. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* 40:1261-1275.

- [278] Cody, R. B., Laramée, J. A., Durst, H. D. 2005. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem* 77:2297-2302.
- [279] Cody, R. B. 2008. Observation of molecular ions and analysis of nonpolar compounds with the direct analysis in real time ion source. *Anal Chem* 81:1101-1107.
- [280] Song, L., Dykstra, A. B., Yao, H., Bartmess, J. E. 2009. Ionization mechanism of negative ion-direct analysis in real time: A comparative study with negative ion-atmospheric pressure photoionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 20:42-50.
- [281] Alberici, R. M., Simas, R. C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N. 2010. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Anal Bioanal Chem* 398:265-294.
- [282] Weston, D. J. 2010. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* 135:661-668.
- [283] Picard, P., Tremblay, P., Paquin, E. R. 2008. Laser diode thermal desorption ionization source (LDTD): fundamental aspects. 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2008.
- [284] Picard, P., Tremblay, P., Paquin, E. R. 2008. Mechanisms involved in positive atmospheric pressure chemical ionization (APCI) of an LDTD source. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2009.
- [285] Goldstein, A. N., Echer, C. M., Alivisatos, A. P. 1992. Melting in semiconductor nanocrystals. *Science* 256:1425-1427.
- [286] Wang, L., Cai, Y. Q., He, B., Yuan, C. G., Shen, D. Z., Shao, J., Jiang, G. B. 2006. Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction. *Talanta* 70:47-51.
- [287] Riegler, H., Kohler, R. 2007. How pre-melting on surrounding interfaces broadens solid-liquid phase transitions. *Nat Phys* 3:890-894.
- [288] Daves, G. D. 1979. Mass spectrometry of involatile and thermally unstable molecules. *Acc Chem Res* 12:359-365.
- [289] Beuhler, R. J., Flanigan, E., Greene, L. J., Friedman, L. 1974. Proton transfer mass spectrometry of peptides. Rapid heating technique for underivatized peptides containing arginine. *J Am Chem Soc* 96:3990-3999.
- [290] Fayad, P. B., Prévost, M., Sauvé, S. 2010. Laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry analysis of

selected steroid hormones in wastewater: method optimization and application. *Anal Chem* 82:639-645.

[291] Rahman, M. F., Yanful, E. K., Jasim, S. Y. 2009. Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: implications for the drinking water industry and global environmental health. *J Water Health* 7:224-243.

[292] Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J., de Roubin, M. R. 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1020:99-104.

[293] Ying, G. G., Kookana, R. S., Ru, Y. J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int* 28:545-551.

[294] Lopez de Alda, M. J., Barceló, D. 2001. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius J Anal Chem* 371:437-447.

[295] Laiko, V. V., Moyer, S. C., Cotter, R. J. 2000. Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry. *Anal Chem* 72:5239-5243.

[296] McLafferty, F. W. 1980. Tandem mass spectrometry (MS/MS): a promising new analytical technique for specific component determination in complex mixtures. *Acc Chem Res* 13:33-39.

[297] Soni, M., Bauer, S., Amy, J. W., Wong, P., Cooks, R. G. 2002. Direct determination of organic compounds in water at parts-per-quadrillion levels by membrane introduction mass spectrometry. *Anal Chem* 67:1409-1412.

[298] Wu, J., Hughes, C. S., Picard, P., Letarte, S., Gaudreault, M., Levesque, J. F., Nicoll-Griffith, D. A., Bateman, K. P. 2007. High-throughput cytochrome P450 inhibition assays using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79:4657-4665.

[299] Council, R. 1990. Council of the European Communities. *Official Journal of the European Communities* Annexe 1 (L224):1-8.

[300] Wang, S., Huang, W., Fang, G., He, J., Zhang, Y. 2008. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. *Anal Chim Acta* 606:194-201.

- [301] Soliman, M. A., Pedersen, J. A., Suffet, I. H. 2004. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A* 1029:223-237.
- [302] Beuhler, R. J., Flanigan, E., Greene, L. J., Friedman, L. 2002. Proton transfer mass spectrometry of peptides. Rapid heating technique for underivatized peptides containing arginine. *J Am Chem Soc* 96:3990-3999.
- [303] Harrison, H. G. 1983. *Chemical ionization mass spectrometry*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
- [304] Dams, R., Benijts, T., Duff, K., Bell, D. 2002. Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16:1072-1077.
- [305] Geerdink, R. B., Kooistra-Sijpersma, A., Tiesnitsch, J., Kienhuis, P. G. M., Brinkman, U. A. T. 1999. Determination of polar pesticides with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry-mass spectrometry using methanol and/or acetonitrile for solid-phase desorption and gradient liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 863:147-155.
- [306] Zook, D. R., Grimsrud, E. P. 1988. Measurement of ion clustering equilibria of proton hydrates by atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Phys Chem* 92:6374-6379.
- [307] Sinha, V., Custer, T. G., Kluepfel, T., Williams, J. 2009. The effect of relative humidity on the detection of pyrrole by PTR-MS for OH reactivity measurements. *Int J Mass Spec* 282:108-111.
- [308] Tani, A., Hayward, S., Hansel, A., Hewitt, C. N. 2004. Effect of water vapour pressure on monoterpene measurements using proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS). *Int J Mass Spec* 239:161-169.
- [309] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75:3019-3030.
- [310] Briciu, R. D., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J. 2009. Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments. *J Chromatogr Sci* 47:127-139.

- [311] Lopez de Alda, M. J., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barcelo, D. 2003. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000:503-526.
- [312] Tomšiková, H., Aufartová, J., Solich, P., Nováková, L. 2012. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *Trends Analyt Chem* 34:35-58.
- [313] Kramer, V. J., Miles-Richardson, S., Pierens, S. L., Giesy, J. P. 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. *Aquat Toxicol* 40:335-360.
- [314] Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., Sumpter, J. P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32:1559-1565.
- [315] Besse, J. P., Garric, J. 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ Pollut* 157:3485-3494.
- [316] Koubovec, D., Ronacher, K., Stubsrud, E., Louw, A., Hapgood, J. P. 2005. Synthetic progestins used in HRT have different glucocorticoid agonist properties. *Mol Cell Endocrinol* 242:23-32.
- [317] Lopez-Roldan, R., Lopez de Alda, M. J., Gros, M., Petrovic, M., Martin-Alonso, J., Barcelo, D. 2010. 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* 80:1337-1344.
- [318] Streck, G. 2009. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trends Analyt Chem* 28:635-652.
- [319] Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M. J., Barcelò, D. 2002. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A* 974:23-51.
- [320] Ciofi, L., Fibbi, D., Chiuminatto, U., Coppini, E., Checchini, L., Del, B. M. 2013. 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. *Journal of Chromatography A* 1283:53-61.



- [321] Brouwer, E. R., Kofman, S., Brinkman, U. A. T. 1995. Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. *Journal of Chromatography A* 703:167-190.
- [322] Guo, F., Liu, Q., Qu, G. B., Song, S. J., Sun, J. T., Shi, J. B., Jiang, G. B. 2013. 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. *Journal of Chromatography A* 1281:9-18.
- [323] Qin, F., Zhao, Y. Y., Sawyer, M. B., Li, X. F. 2008. Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water. *Anal Chim Acta* 627:91-98.
- [324] Rodriguez-Mozaz, S., Lòpez de Alda, M. J., Barcelò, D. 2004. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* 76:6998-7006.
- [325] Salvador, A., Moreton, C., Piram, A., Faure, R. 2007. 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. *Journal of Chromatography A* 1145:102-109.
- [326] Anon. 1995. CPMP/ICH/381/95. (adopted by the CPMP in November 1994)
- [327] Aboulfadl, K., De Potter, C., Prévost, M., Sauvé, S. 2010. Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products, feminizing hormones and pesticides. *Chem Cent J* 4:10.
- [328] Havens, S. M., Hedman, C. J., Hemming, J. D., Mieritz, M. G., Shafer, M. M., Schauer, J. J. 2010. Stability, preservation, and quantification of hormones and estrogenic and androgenic activities in surface water runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2481-2490.
- [329] Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., Snyder, S. A. 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75:6265-6274.
- [330] Han, J., Meng, S., Dong, Y., Hu, J., Gao, W. 2013. Capturing hormones and bisphenol A from water via sustained hydrogen bond driven sorption in polyamide microfiltration membranes. *Water Res* 47:197-208.

- [331] Hedgespeth, M. L., Sapozhnikova, Y., Pennington, P., Clum, A., Fairey, A., Wirth, E. 2012. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Science of The Total Environment* 437:1-9.
- [332] Azzouz, A., Souhail, B., Ballesteros, E. 2010. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography A* 1217:2956-2963.
- [333] Krein, A., Pailler, J. Y., Guignard, C., Gutleb, A. C., Hoffmann, L., Meyer, B., Kefler, S., Berckmans, P., Witters, H. E. 2012. Determination of estrogen activity in river waters and wastewater in Luxembourg by chemical analysis and the yeast estrogen screen assay. *EnvironPollut* 1:86-96.
- [334] Morishima, Y., Irata, Y., Inno, K., Ujimoto, C. 2005. Solid-phase extraction device coupled to a microcolumn liquid chromatograph with a UV detector for determining estrogens in water samples. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 28:3217-3228.
- [335] Laganà, A., Bacaloni, A., Fago, G., Marino, A. 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14:401-407.
- [336] Mompelat, S., Jaffrezic, A., JardÇ, E., Le Bot, B. 2013. Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification. *Talanta* in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.1001.1042>.
- [337] Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., Sethuraman, R. 2000. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 885:17-39.
- [338] Hennion, M. C., Pichon, V. 1994. Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Environ Sci Technol* 28:576A-583A.
- [339] Larrivee, M. L., Poole, C. F. 1994. Solvation parameter model for the prediction of breakthrough volumes in solid-phase extraction with particle-loaded membranes. *Anal Chem* 66:139-146.
- [340] King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *JAmSocMass Spectrom* 11:942-950.
- [341] Antignac, J. P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., Le Bizec, B. 2005. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal Chim Acta* 529:129-136.

- [342] Trufelli, H., Palma, P., Famiglioni, G., Cappiello, A. 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass SpectromRev* 30:491-509.
- [343] Kang, J., Hick, L. A., Price, W. E. 2007. Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21:4065-4072.
- [344] Buhrman, D. L., Price, P. I., Rudewicz, P. J. 1996. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *JAmSocMass Spectrom* 7:1099-1105.
- [345] Negreira, N., Lòpez de Alda, M. J., Barceò, D. 2013. On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. *Journal of Chromatography A* 1280:64-74.
- [346] Segura, P. A., Gagnon, C., Sauvé, S. 2009. Application of turbulent flow chromatography load columns for the on-line analysis of anti-infectives in wastewaters. *Chromatographia* 70:239-245.
- [347] Glaser, J. A., Foerst, D. L., McKee, G. D., Quave, S. A., Budde, W. L. 1981. Trace analyses for wastewaters. *Environ Sci Technol* 15:1426-1435.
- [348] Long, G. L., Winefordner, J. D. 1983. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 55:712A-724A.
- [349] Singh, K. P., Basant, N., Malik, A., Jain, G. 2010. Modeling the performance of "up-flow anaerobic sludge blanket" reactor based wastewater treatment plant using linear and nonlinear approaches- A case study. *Anal Chim Acta* 658:1-11.
- [350] Interactive PhysProp Database, D. 2012. <http://www.syrres.com>. *www.syrres.com* accessed August.
- [351] Hurwitz, A. R., Liu, S. T. 1977. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. *J Pharm Sci* 66:624-627.
- [352] Ternes, T. A., Joss, A. 2007. *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management*. IWA Publishing.
- [353] Liu, Z. H., Ogejo, J. A., Pruden, A., Knowlton, K. F. 2011. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: a review. *Sci Total Environ* 409:5149-5161.

- [354] Sumpter, J. P., Johnson, A. C. 2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* 39:4321-4332.
- [355] Kobayashi, M., Sorensen, P., Stacey, N. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 26:71-84.
- [356] Dinger, J. C., Heinemann, L. A. J., Kuhl-Habich, D. 2007. The safety of a drospirenone-containing oral contraceptive: final results from the European Active Surveillance study on Oral Contraceptives based on 142,475 women-years of observation. *Contraception* 75:344-354.
- [357] Runnalls, T. J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., Sumpter, J. P. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Hum Ecol Risk Assess* 16:1318-1338.
- [358] Shore, L. S., Shemesh, M. 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Appl Chem* 75:1859-1871.
- [359] Guan, X., He, D., Ma, J., Chen, G. 2010. Application of permanganate in the oxidation of micropollutants: a mini review. *Front Environ Sci Eng* 4:405-413.
- [360] Hu, L., Martin, H. M., Strathmann, T. J. 2010. Oxidation kinetics of antibiotics during water treatment with potassium permanganate. *Environ Sci Technol* 44:6416-6422.
- [361] Jiang, J., Pang, S. Y., Ma, J., Liu, H. 2012. Oxidation of phenolic endocrine disrupting chemicals by potassium permanganate in synthetic and real waters. *Environ Sci Technol* 46:1774-1781.
- [362] Rodriguez, E., Majado, M. E., Meriluoto, J., Acero, J. L. 2007. Oxidation of microcystins by permanganate: reaction kinetics and implications for water treatment. *Water Res* 41:102-110.
- [363] Korshin, G. V., Chang, H. S., Frenkel, A. I., Ferguson, J. F. 2007. Structural study of the incorporation of heavy metals into solid phase formed during the oxidation of EDTA by permanganate at high pH. *Environ Sci Technol* 41:2560-2565.
- [364] Shao, X., Ma, J., Wen, G., Yang, J. 2010. Oxidation of estrone by permanganate: reaction kinetics and estrogenicity removal. *Chinese Sci Bull* 55:802-808.
- [365] Fabris, R., Chow, C. W. K., Drikas, M., Eikebrokk, B. 2008. Comparison of NOM character in selected Australian and Norwegian drinking waters. *Water Res* 42:4188-4196.
- [366] Sharp, E. L., Jarvis, P., Parsons, S. A., Jefferson, B. 2006. Impact of fractional character on the coagulation of NOM. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 286:104-111.

- [367] Sharp, E. L., Parsons, S. A., Jefferson, B. 2006. Seasonal variations in natural organic matter and its impact on coagulation in water treatment. *Science of The Total Environment* 363:183-194.
- [368] Eikebrokk, B., Vogt, R. D., Liltved, H. 2004. NOM increase in Northern European source waters: Discussion of possible causes and impacts on coagulation/contact filtration processes. *Water Sci Technol Water Supply* 4:45-54.
- [369] Forsberg, C. 1992. Will an increased greenhouse impact in Fennoscandia give rise to more humic and coloured lakes? *Hydrobiologia* 229:51-58.
- [370] Worrall, F., Burt, T. P. 2007. Trends in DOC concentration in Great Britain. *J Hydrol (Amst)* 346:81-92.
- [371] Worrall, F., Burt, T. P. 2009. Changes in DOC treatability: Indications of compositional changes in DOC trends. *J Hydrol (Amst)* 366:1-8.
- [372] Matilainen, A., Sillanpää, M. 2010. Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes. *Chemosphere* 80:351-365.
- [373] Broseus, R., Vincent, S., Aboulfadl, K., Daneshvar, A., Sauve, S., Barbeau, B., Prevost, M. 2009. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water Res* 43:4707-4717.
- [374] Afnor. 1994. *Recueil de Normes Françaises; Qualité de l'Eau (French standards and regulations for the quality of water)*. Association Française de Normalisation, Paris.
- [375] Jiang, J., Pang, S. Y., Ma, J. 2009. Oxidation of triclosan by permanganate (Mn(VII)): importance of ligands and in situ formed manganese oxides. *Environ Sci Technol* 43:8326-8331.
- [376] Jiang, J., Pang, S. Y., Ma, J. 2010. Role of ligands in permanganate oxidation of organics. *Environ Sci Technol* 44:4270-4275.
- [377] Yan, Y. E., Schwartz, F. W. 2000. Kinetics and mechanisms for TCE oxidation by permanganate. *Environ Sci Technol* 34:2535-2541.
- [378] Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C., Prévost, M. 2005. Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. *Water Res* 39:2024-2033.
- [379] Schulten, H. R. 2001. Models of humic structures: association of humic acids and organic matter in soils and water. In Clapp, C. E., Hayes, M. H. B., Senesi, N., Bloom, P. R., Jardine, P. M., eds, *Humic Substances and Chemical Contaminants*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 73-87.

- [380] He, D., Guan, X., Ma, J., Yang, X., Cui, C. 2010. Influence of humic acids of different origins on oxidation of phenol and chlorophenols by permanganate. *J Hazard Mater* 182:681-688.
- [381] Karanfil, T., Kilduff, J. E., Schlautman, M. A., Weber, W. J. 1996. Adsorption of organic macromolecules by granular activated carbon. 1. influence of molecular properties under anoxic solution conditions. *Environ Sci Technol* 30:2187-2194.
- [382] Karanfil, T., Schlautman, M. A., Kilduff, J. E., Weber, W. J. 1996. Adsorption of organic macromolecules by granular activated carbon. 2. influence of dissolved oxygen. *Environ Sci Technol* 30:2195-2201.
- [383] Chin, Y. P., Weber, W. J. 1989. Estimating the effects of dispersed organic polymers on the sorption of contaminants by natural solids. I. A predictive thermodynamic humic substance organic solute interaction model. *Environ Sci Technol* 23:978-984.
- [384] Chiou, C. T., Kile, D. E., Brinton, T. I., Malcolm, R. L., Leenheer, J. A., MacCarthy, P. 1987. A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. *Environ Sci Technol* 21:1231-1234.
- [385] Ghosh, K., Schnitzer, M. 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci* 126:266-276.
- [386] Schlautman, M. A., Morgan, J. J. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environ Sci Technol* 27:961-969.
- [387] Cameron, R. S., Thornton, B. K., Swift, R. S., Posner, A. M. 1972. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J Soil Sci* 23:394-408.
- [388] Chen, X., Xiao, B., Liu, J., Fang, T., Xu, X. 2005. Kinetics of the oxidation of MCCR by potassium permanganate. *Toxicol* 45:911-917.
- [389] Huang, K. C., Hoag, G. E., Chheda, P., Woody, B. A., Dobbs, G. M. 2001. Oxidation of chlorinated ethenes by potassium permanganate: a kinetics study. *J Hazard Mater* 87:155-169.
- [390] Huang, K. C., Hoag, G. E., Chheda, P., Woody, B. A., Dobbs, G. M. 2002. Kinetics and mechanism of oxidation of tetrachloroethylene with permanganate. *Chemosphere* 46:815-825.
- [391] Zook, D. R., Grimsrud, E. P. 1988. Ion-molecule reactions in API. *J Phys Chem* 92:6374-6378.

- [392] DrugBank Open Data, D., Drug Target, D. 2012. <http://www.drugbank.ca>. Vol (accessed August 2012).
- [393] White, G. C. 1992. *The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, 3, illustrated ed. Van Nostrand Reinhold.
- [394] Alum, A., Yoon, Y., Westerhoff, P., Abbaszadegan, M. 2004. Oxidation of bisphenol A, 17beta-estradiol, and 17alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. *Environ Toxicol* 19:257-264.
- [395] Lee, B. C., Kamata, M., Akatsuka, Y., Takeda, M., Ohno, K., Kamei, T., Magara, Y. 2004. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Res* 38:733-739.
- [396] Moriyama, K., Matsufuji, H., Chino, M., Takeda, M. 2004. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere* 55:839-847.
- [397] Nakamura, H., Shiozawa, T., Terao, Y., Shiraishi, F., Fukazawa, H. 2006. By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *J Health Sci* 52:124-131.
- [398] Schiliro, T., Pignata, C., Rovere, R., Fea, E., Gilli, G. 2009. The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. *Chemosphere* 75:335-340.
- [399] von Gunten, U. 2003. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Res* 37:1469-1487.
- [400] Zhang, H., Yamada, H., Tsuno, H. 2008. Removal of endocrine-disrupting chemicals during ozonation of municipal sewage with brominated byproducts control. *Environ Sci Technol* 42:3375-3380.
- [401] Kumar, K., Margerum, D. W. 1987. Kinetics and mechanism of general-acid-assisted oxidation of bromide by hypochlorite and hypochlorous acid. *Inorg Chem* 26:2706-2711.
- [402] Lee, Y., von Gunten, U. 2009. Transformation of 17alpha-ethinylestradiol during water chlorination: effects of bromide on kinetics, products, and transformation pathways. *Environ Sci Technol* 43:480-487.
- [403] Hua, G., Reckhow, D. A. 2007. Characterization of disinfection byproduct precursors based on hydrophobicity and molecular size. *Environ Sci Technol* 41:3309-3315.
- [404] Lei, H., Snyder, S. A. 2007. 3D QSPR models for the removal of trace organic contaminants by ozone and free chlorine. *Water Res* 41:4051-4060.

- [405] Rebenne, L. M., Gonzalez, A. C., Olson, T. M. 1996. Aqueous chlorination kinetics and mechanism of substituted dihydroxybenzenes. *Environ Sci Technol* 30:2235-2242.
- [406] Gallard, H., von Gunten, U. 2002. Chlorination of natural organic matter: kinetics of chlorination and of THM formation. *Water Res* 36:65-74.
- [407] Lee, Y., von Gunten, U. 2010. Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: Comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrateVI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical). *Water Res* 44:555-566.
- [408] Rook, J. J., Gras, A. A., van der Heijden, B. G., de Wee, J. 1978. Bromide oxidation and organic substitution in water treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering* 13:91-116.
- [409] Heller-Grossman, L., Manka, J., Limoni-Relis, B., Rebhun, M. 1993. Formation and distribution of haloacetic acids, THM and tox in chlorination of bromide-rich lake water. *Water Res* 27:1323-1331.
- [410] Hu, J., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., Kunikane, S. 2003. Products of aqueous chlorination of 17beta-estradiol and their estrogenic activities. *Environ Sci Technol* 37:5665-5670.
- [411] Luong, T. V., Peters, C. J., Perry, R. 1982. Influence of bromide and ammonia upon the formation of trihalomethanes under water-treatment conditions. *Environ Sci Technol* 16:473-479.
- [412] Williams, D. T., LeBel, G. L., Benoit, F. M. 1997. Disinfection by-products in Canadian drinking water. *Chemosphere* 34:299-316.
- [413] EPA, U. 2006. National primary drinking water regulations: stage 2 disinfectants and disinfection byproducts rule; USEPA, Final rule - Part II Federal Register; Office of Science and Technology; Office of Water: Washington, DC, USA.
- [414] Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E. 2005. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ Sci Technol* 39:6649-6663.
- [415] Jiang, J. Q., Yin, Q., Zhou, J. L., Pearce, P. 2005. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere* 61:544-550.
- [416] Li, C., Li, X. Z., Graham, N., Gao, N. Y. 2008. The aqueous degradation of bisphenol A and steroid estrogens by ferrate. *Water Res* 42:109-120.



- [417] Sharma, V. K., Li, X. Z., Graham, N., Doong, R. 2008. Ferrate(VI) oxidation of endocrine disruptors and antimicrobials in water. *Journal of water supply : research and technology - AQUA* 57:419-426.
- [418] Jiang, J. Q., Lloyd, B. 2002. Progress in the development and use of ferrate(VI) salt as an oxidant and coagulant for water and wastewater treatment. *Water Res* 36:1397-1408.
- [419] Sharma, V. K., Mishra, S. K., Nesnas, N. 2006. Oxidation of sulfonamide antimicrobials by ferrate(VI) [Fe(VI)O<sub>4</sub>(2-)]. *Environ Sci Technol* 40:7222-7227.
- [420] Lee, Y., Yoon, J., von, G. U. 2005. Kinetics of the oxidation of phenols and phenolic endocrine disruptors during water treatment with ferrate (Fe(VI)). *Environ Sci Technol* 39:8978-8984.
- [421] Tiwari, D., Lee, S. M. 2011. Ferrate(VI) in the Treatment of Wastewaters: A New Generation Green Chemical. In Garcia Einschlag, F. S., ed, *Waste water - Treatment and Reutilization*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 241-276.
- [422] Huber, M. M., Korhonen, S., Ternes, T. A., von Gunten, U. 2005. Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. *Water Res* 39:3607-3617.
- [423] Koch, B., Crofts, E. W., Schimpff, W. K., Davis, M. K. 1988. Analysis of halogenated disinfection by-products by capillary chromatography. In: AWWA-WQTC Conf Proc, Denver CO AWWA, Denver, CO, 1988, pp 1-28.
- [424] Zhang, C. J., Miura, J., Nagaosa, Y. 2005. Determination of cadmium, zinc, nickel and cobalt in tobacco by reversed-phase high-performance liquid chromatography with 2-(8-quinolylazo)-4,5-diphenylimidazole as a chelating reagent. *Anal Sci* 21:1105-1110.
- [425] Ifelebuegu, A. O. 2011. The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes. *Int J Environ Sci Technol* 8:245-254.
- [426] Drewes, J. E., Hemming, J., Ladenburger, S. J., Schauer, J., Sonzogni, W. 2005. An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements. *Water Environ Res* 77:12-23.
- [427] Lai, E. P. C., De Maleki, Z., Wu, S. 2010. Characterization of molecularly imprinted and nonimprinted polymer submicron particles specifically tailored for removal of trace 17 $\beta$ -estradiol in water treatment. *J Appl Polym Sci* 116:1499-1508.
- [428] DeMaleki, Z., Lai, E. P., Dabek-Zlotorzynska, E. 2010. Capillary electrophoresis characterization of molecularly imprinted polymer particles in fast binding with 17 $\beta$ -estradiol. *J Sep Sci* 33:2796-2803.

- [429] Kumar, A. K., Mohan, S. V. 2011. Endocrine disruptive synthetic estrogen (17 $\alpha$ -ethynylestradiol) removal from aqueous phase through batch and column sorption studies: Mechanistic and kinetic analysis. *Desalination* 276:66-74.
- [430] Kimura, K., Toshima, S., Amy, G., Watanabe, Y. 2004. Rejection of neutral endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceutical active compounds (PhACs) by RO membranes. *J Memb Sci* 245:71-78.
- [431] Bodzek, M., Dudziak, M. 2006. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination* 198:24-32.
- [432] Cartinella, J. L., Cath, T. Y., Flynn, M. T., Miller, G. C., Hunter, K. W., Jr., Childress, A. E. 2006. Removal of natural steroid hormones from wastewater using membrane contactor processes. *Environ Sci Technol* 40:7381-7386.
- [433] Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Wert, E. C., Yoon, J. 2007. Removal of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Desalination* 202:16-23.
- [434] Koyuncu, I., Arıkan, O. A., Wiesner, M. R., Rice, C. 2008. Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes. *J Memb Sci* 309:94-101.
- [435] McCallum, E. A., Hyung, H., Do, T. A., Huang, C.-H., Kim, J.-H. 2008. Adsorption, desorption, and steady-state removal of 17 $\beta$ -estradiol by nanofiltration membranes. *J Memb Sci* 319:38-43.
- [436] Alturki, A. A., Tadkaew, N., McDonald, J. A., Khan, S. J., Price, W. E., Nghiem, L. D. 2010. Combining MBR and NF/RO membrane filtration for the removal of trace organics in indirect potable water reuse applications. *J Memb Sci* 365:206-215.
- [437] Dudziak, M., Bodzek, M. 2009. Selected factors affecting the elimination of hormones from water using nanofiltration. *Desalination* 240:236-243.
- [438] Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., Snyder, S. A. 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res* 41:1013-1021.
- [439] Nghiem, L. D., Schäfer, A. I., Waite, T. D. 2002. Adsorptive interactions between membranes and trace contaminants. *Desalination* 147:269-274.
- [440] Chang, S., Waite, T. D., Schafer, A. I., Fane, A. G. 2003. Adsorption of the endocrine-active compound estrone on microfiltration hollow fiber membranes. *Environ Sci Technol* 37:3158-3163.

- [441] Schafer, A. I., Nghiem, L. D., Waite, T. D. 2003. Removal of the natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. *Environ Sci Technol* 37:182-188.
- [442] Hu, J. Y., Jin, X., Ong, S. L. 2007. Rejection of estrone by nanofiltration: Influence of solution chemistry. *J Memb Sci* 302:188-196.
- [443] Jin, X., Hu, J., Ong, S. L. 2007. Influence of dissolved organic matter on estrone removal by NF membranes and the role of their structures. *Water Res* 41:3077-3088.
- [444] Han, J., Qiu, W., Gao, W. 2010. Adsorption of estrone in microfiltration membrane filters. *Chem Eng J* 165:819-826.
- [445] Schäfer, A. I., Nghiem, L. D., Meier, A., Neale, P. A. 2010. Impact of organic matrix compounds on the retention of steroid hormone estrone by a 'loose' nanofiltration membrane. *Sep Purif Technol* 73:179-187.
- [446] Yang, B., Ying, G. G., Zhao, J. L., Liu, S., Zhou, L. J., Chen, F. 2012. Removal of selected endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) during ferrate(VI) treatment of secondary wastewater effluents. *Water Res* 46:2194-2204.
- [447] Nakamura, H., Kuruto-Niwa, R., Uchida, M., Terao, Y. 2007. Formation of chlorinated estrones via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone. *Chemosphere* 66:1441-1448.
- [448] Nakagawa, S., Kenmochi, Y., Tutumi, K., Tanaka, T., Hirasawa, I. 2002. A study on the degradation of endocrine disruptors and dioxins by ozonation and advanced oxidation processes. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN* 35:840-847.
- [449] Irmak, S., Erbatur, O., Akgerman, A. 2005. Degradation of 17beta-estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *J Hazard Mater* 126:54-62.
- [450] Kim, S.-E., Yamada, H., Tsuno, H. 2004. Evaluation of estrogenicity for 17  $\beta$ -estradiol decomposition during ozonation. *Ozone: Sci Eng* 26:563-571.
- [451] Rokhina, E. V., Vattikonda, N. S., Johnson, C., Suri, R. P. 2012. Ozonation of a mixture of estrogens and progestins in aqueous solution: interpretation of experimental results by computational methods. *Chemosphere* 89:1323-1329.
- [452] Hashimoto, T., Takahashi, K., Murakami, T. 2006. Characteristics of estrogen decomposition by ozonation. *Water Sci Technol* 54:87-93.

- [453] Lin, Y., Peng, Z., Zhang, X. 2009. Ozonation of estrone, estradiol, diethylstilbestrol in waters. *Desalination* 249:235-240.
- [454] Ternes, T. A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res* 37:1976-1982.
- [455] Huber, M. M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mc Ardell, C. S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. A., von Gunten, U. 2005. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environ Sci Technol* 39:4290-4299.
- [456] Huber, M. M., Canonica, S., Park, G. Y., von Gunten, U. 2003. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ Sci Technol* 37:1016-1024.
- [457] Huber, M. M., Ternes, T. A., von Gunten, U. 2004. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ Sci Technol* 38:5177-5186.
- [458] Ohko, Y., Iuchi, K., Niwa, C., Tatsuma, T., Nakashima, T., Iguchi, T., Kubota, Y., Fujishima, A. 2002. 17 beta-estradiol degradation by TiO<sub>2</sub> photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 36:4175-4181.
- [459] Coleman, H. M., Chiang, K., Amal, R. 2005. Effects of Ag and Pt on photocatalytic degradation of endocrine disrupting chemicals in water. *Chem Eng J* 113:65-72.
- [460] Coleman, H. M., Eggins, B. R., Byrne, J. A., Palmer, F. L., King, E. 2000. Photocatalytic degradation of 17- $\beta$ -oestradiol on immobilised TiO<sub>2</sub>. *Appl Catal, B* 24:L1-L5.
- [461] Tanizaki, T., Kadokami, K., Shinohara, R. 2002. Catalytic photodegradation of endocrine disrupting chemicals using titanium dioxide photoconductor thin films. *Bull Environ Contam Toxicol* 68:732-739.
- [462] Zhang, Y., Zhou, J. L., Ning, B. 2007. Photodegradation of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in water. *Water Res* 41:19-26.
- [463] Nakashima, T., Ohko, Y., Kubota, Y., Fujishima, A. 2003. Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO<sub>2</sub>-modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. *J Photochem Photobiol A Chem* 160:115-120.
- [464] Sichel, C., Garcia, C., Andre, K. 2011. Feasibility studies: UV/chlorine advanced oxidation treatment for the removal of emerging contaminants. *Water Res* 45:6371-6380.

- [465] Barron, E., Deborde, M., Rabouan, S., Mazellier, P., Legube, B. 2006. Kinetic and mechanistic investigations of progesterone reaction with ozone. *Water Res* 40:2181-2189.
- [466] Jeffries, K. M., Jackson, L. J., Ikonomou, M. G., Habibi, H. R. 2010. Presence of natural and anthropogenic organic contaminants and potential fish health impacts along two river gradients in Alberta, Canada. *Environ Toxicol Chem* 29:2379-2387.
- [467] Ikonomou, M. G., Cai, S. S., Fernandez, M. P., Blair, J. D., Fischer, M. 2008. Ultra-trace analysis of multiple endocrine-disrupting chemicals in municipal and bleached kraft mill effluents using gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* 27:243-251.
- [468] Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. L., Perdiz, D., Cargouet, M., Levi, Y. 2003. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. *J Sep Sci* 26:105-111.
- [469] Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A. 2003. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS. *Anal Chem* 76:704-711.
- [470] Chang, C.-C., Huang, S.-D. 2010. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 662:39-43.
- [471] Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K., Blair, I. A. 2000. Liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: analysis of pentafluorobenzyl derivatives of biomolecules and drugs in the attomole range. *Anal Chem* 72:3007-3013.
- [472] Zorita, S., Hallgren, P., Mathiasson, L. 2008. Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique. *J Chromatogr A* 1192:1-8.
- [473] Wen, Y., Zhou, B.-S., Xu, Y., Jin, S.-W., Feng, Y.-Q. 2006. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1133:21-28.
- [474] Kawaguchi, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Nakazawa, H. 2006. Dual derivatization-stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-

mass spectrometry for determination of 17 $\beta$ -estradiol in water sample. *Journal of Chromatography A* 1105:140-147.

[475] Tan, B. L., Hawker, D. W., Muller, J. F., Leusch, F. D., Tremblay, L. A., Chapman, H. F. 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ Int* 33:654-669.

[476] Bicchi, C., Schilirò, T., Pignata, C., Fea, E., Cordero, C., Canale, F., Gilli, G. 2009. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of The Total Environment* 407:1842-1851.

[477] Almeida, C., Nogueira, J. M. F. 2006. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *J Pharm Biomed Anal* 41:1303-1311.

[478] Huang, X., Lin, J. M., Yuan, D., Hu, R. 2009. Determination of steroid sex hormones in wastewater by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 1216:3508-3511.

[479] Kuch, H. M., Ballschmiter, K. 2000. Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius J Anal Chem* 366:392-395.

[480] Grover, D. P., Zhang, Z. L., Readman, J. W., Zhou, J. L. 2009. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta* 78:1204-1210.

[481] Nie, Y., Qiang, Z., Zhang, H., Adams, C. 2009. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:7071-7080.

[482] Möder, M., Braun, P., Lange, F., Schrader, S., Lorenz, W. 2007. Determination of Endocrine Disrupting Compounds and Acidic Drugs in Water by Coupling of Derivatization, Gas Chromatography and Negative-Chemical Ionization Mass Spectrometry. *CLEAN – Soil Air Water* 35:444-451.

[483] Braun, P., Moeder, M., Schrader, S., Popp, P., Kusch, P., Engewald, W. 2003. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in wastewater

using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 988:41-51.

[484] Chimchirian, R. F., Suri, R. P., Fu, H. 2007. Free synthetic and natural estrogen hormones in influent and effluent of three municipal wastewater treatment plants. *Water Environ Res* 79:969-974.

[485] Suri, R. P., Nayak, M., Devaiah, U., Helmig, E. 2007. Ultrasound assisted destruction of estrogen hormones in aqueous solution: effect of power density, power intensity and reactor configuration. *J Hazard Mater* 146:472-478.

[486] Velicu, M., Suri, R. 2009. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ Monit Assess* 154:349-359.

[487] Nakamura, S., Hwee Sian, T., Daishima, S. 2001. Determination of estrogens in river water by gas chromatography–negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 919:275-282.

[488] Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodríguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Cela, R. 2004. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1024:177-185.

[489] Hernando, M. D., Mezcua, M., Gómez, M. J., Malato, O., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R. 2004. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1047:129-135.

[490] Noppe, H., De Wasch, K., Poelmans, S., Van Hoof, N., Verslycke, T., Janssen, C. R., De Brabander, H. F. 2005. Development and validation of an analytical method for detection of estrogens in water. *Anal Bioanal Chem* 382:91-98.

[491] Croley, T. R., Hughes, R. J., Koenig, B. G., Metcalfe, C. D., March, R. E. 2000. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1087-1093.

[492] Fine, D. D., Breidenbach, G. P., Price, T. L., Hutchins, S. R. 2003. Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography–negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1017:167-185.

- [493] Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Dagnac, T., Dohrendorf, K. 2002. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 974:143-159.
- [494] Zarzycki, P. K., Włodarczyk, E., Baran, M. J. 2009. Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography: II. Fast screening of free steroids and related low-molecular-mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material. *Journal of Chromatography A* 1216:7612-7622.
- [495] López de Alda, M. J., Barceló, D. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 892:391-406.
- [496] Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Esparza, M. 2003. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17beta-estradiol, and 17alpha-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Res* 37:3530-3537.
- [497] Matejcek, D., Kuban, V. 2008. Enhancing sensitivity of liquid chromatographic/ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens by on-line pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A* 1192:248-253.
- [498] Ferguson, P. L., Iden, C. R., McElroy, A. E., Brownawell, B. J. 2001. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-electrospray-MS. *Anal Chem* 73:3890-3895.
- [499] Cespedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D. 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 378:697-708.
- [500] Sodr e, F. F., Pescara, I. C., Montagner, C. C., Jardim, W. F. 2010. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchem J* 96:92-98.
- [501] Kumar, V., Nakada, N., Yasojima, M., Yamashita, N., Johnson, A. C., Tanaka, H. 2009. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 77:1440-1446.
- [502] Pailler, J. Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C. 2009. 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* 407:4736-4743.

[503] Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodriguez, J. J. 2010. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17alpha-ethynylestradiol and 17beta-estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *J Hazard Mater* 183:701-711.

[504] Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marce, R. M. 2009. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 78:1327-1331.

[505] Miège, C., Bados, P., Brosse, C., Coquery, M. 2009. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. *Trends Analyt Chem* 28:237-244.

[506] Koh, Y. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J. N., Scrimshaw, M. D. 2007. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1173:81-87.

[507] Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.-F. 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1210:84-91.

[508] Fick, J., Lindberg, R. H., Parkkonen, J., Arvidsson, B., Tysklind, M., Larsson, D. G. J. 2010. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ Sci Technol* 44:2661-2666.

[509] Chang, H., Wu, S., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S. 2008. Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1195:44-51.

[510] Batt, A. L., Kostich, M. S., Lazorchak, J. M. 2008. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC–MS/MS. *Anal Chem* 80:5021-5030.

[511] Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W. 2005. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography A* 1090:98-106.

- [512] Zuehlke, S., Duennbier, U., Heberer, T. 2005. Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 28:52-58.
- [513] Kvanli, D. M., Marisetty, S., Anderson, T. A., Jackson, W. A., Morse, A. N. 2008. Monitoring estrogen compounds in wastewater recycling systems. *Water, Air, and Soil Pollution* 188:31-40.
- [514] Watabe, Y., Kubo, T., Nishikawa, T., Fujita, T., Kaya, K., Hosoya, K. 2006. Fully automated liquid chromatography–mass spectrometry determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water. *Journal of Chromatography A* 1120:252-259.
- [515] Carpinteiro, J., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Cela, R. 2004. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1056:179-185.
- [516] Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R. M. 2002. Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 964:153-160.
- [517] Matejicek, D., Kuban, V. 2007. High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethynylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. *Anal Chim Acta* 588:304-315.

## **Annexe 1**

**Tableau A1-1.** Élimination des hormones dans les usines de traitement des eaux usées.

Composé	Affluent	Effluent	Élimination (%)	Traitement (procédé)	Référence
E2	21	–	99.9	ASS	[137]
	4.0–25	0.35–3.5	59–98	ASS	[139]
	11	1.6	85 (moyenne)	ASS	[111]
	3	n.d	65	ASS	[133]
	35–125	n.d–30	44–100	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[165]
	2.4–26	0.2–14.7	–19 to 99	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , Lagon	[135]
	63	19.2	69 (moyenne)	ASS	[424]
	16–83	0.9–3.9	83–97	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , BO	[425]
	16	<1	>98	ASS + N <sub>az</sub> , P	[132]
	11	4.5	60	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	17	7.2	59	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	12	6.6	43	BF (dénit + nit)	[141]
	17	8.6	49	ASS	[141]
	45	1	98	ASS (anaérobique)	[189]
40.5	n.d.	100	ASS (aérobique)	[189]	
E3	24–188	0.43–18	77–99	ASS	[139]
	72	2.3	97 (moyenne)	ASS	[111]
	23–660	n.d–275	18–100	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[165]
	138–381	<1–4.9	>7	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[426]
	15	7.3	51	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	15	5.0	67	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	12	5.7	54	BF (dénit + nit)	[141]
	11	6.8	40	ASS	[141]
	22	4.0	82	ASS (anaérobique)	[189]
	14	2.5	82	ASS (aérobique)	[189]
E1	40	–	83	ASS	[137]
	25–132	2.5–8.2	–22 to 95	ASS	[139]
	44	17	61 (moyenne)	ASS	[111]
	29–670	n.d.–72	–111 to 100	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[165]
	65–116	22–8.6	81–86	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , BO	[425]
	20	10	50 (moyenne)	ASS	[424]
	66	<1	>98	ASS + N <sub>az</sub> , P	[132]
	18	7.2	59	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	15	6.5	57	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	9.6	4.3	55	BF (dénit + nit)	[141]
	11	6.2	44	ASS	[141]
	50	9.0	82	ASS (anaérobique)	[189]
41	8.4	79	ASS (aérobique)	[189]	
EE2	0.40–13	n.d–1.7	52–100	ASS	[139]
	3–70	n.d–5	33–100	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[165]
	<0.7–14	<0.7–4.1	71–93	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , P, MBR	[426]
	6.3	n.d	55	ASS	[424]
	0.5–1.6	0.3–0.5	41–58	ASS, ASS + N <sub>az</sub> , BO	[425]
	8.2	<1	90	ASS + N <sub>az</sub> , P	[132]
	5.4	3.1	43	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	7.1	4.4	38	ASS + N <sub>az</sub> , P	[141]
	4.9	2.7	45	BF (dénit + nit)	[141]
	6.8	4.5	34	ASS	[141]
	56	33	42	ASS (anaérobique)	[189]
	39	28	29	ASS (aérobique)	[189]
	PROG	74	n.d.	100	ASS (anaérobique)
73		n.d.	100	ASS (aérobique)	[189]

ASS : boues activées; BF : filtration biologique; BO : bassin d'oxydation; dénit + nit : dénitrification et nitrification; MBR : bioréacteur membranaire; N<sub>az</sub> : élimination de l'azote; n.d. : non détecté; P : élimination du phosphore.

**Tableau A1-2.** Élimination des hormones par adsorption

Composé	Traitement	Quantité ajoutée (temps de contact)	Type d'eau	Élimination (%)	Référence
E2	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau synthétique + eau de surface	84 (moyenne)	[414]
	MIP ( $\alpha$ -estradiol)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	~25	[196]
	NIP (polymère seul)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	~20	[196]
	MIP (estradiol)	n.d. (8-120 min)	Eau déionisée	100	[197]
	MIP (17 $\beta$ -estradiol)	20 mg mL <sup>-1</sup> (3 min)	Eau déionisée	97 $\pm$ 3	[427]
	MIP (17 $\beta$ -estradiol)	0.25 mg mL <sup>-1</sup> (2 min)	Eau déionisée	90 $\pm$ 5	[428]
E3	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau de surface	~60	[156]
	PAC (usine pilote)	5 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	~40	[156]
	PAC (usine pilote)	35 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	>90	[156]
	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau synthétique + eau de surface	60 (moyenne)	[414]
	AC (en laboratoire)	5 g L <sup>-1</sup> (300 min)	Eau distillée	>90	[193]
	MIP ( $\alpha$ -estradiol)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	~40	[196]
	NIP (polymère seul)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	<10	[196]
	NIP (polymère seul)	0.5 mg mL <sup>-1</sup> (3 min)	Eau déionisée	64 $\pm$ 3	[427]
E1	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau de surface	~75	[156]
	PAC (usine pilote)	5 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	~35	[156]
	PAC (usine pilote)	35 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	>90	[156]
	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau synthétique + eau de surface	76 (moyenne)	[414]
	MIP ( $\alpha$ -estradiol)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	~80	[196]
	NIP (polymère seul)	1 mg mL <sup>-1</sup> (30 min)	Eau déionisée	~60	[196]
EE2	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau de surface	~77	[156]
	PAC (usine pilote)	5 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	~65	[156]
	PAC (usine pilote)	35 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	100	[156]
	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau synthétique + eau de surface	76 (moyenne)	[414]
	AC (en laboratoire)	5 g L <sup>-1</sup> (120 min)	Eau distillée	>90	[429]
	AC (en laboratoire)	Colonne (12.5 cm de profondeur, 34 h)	Affluent	>90	[429]
PROG	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau de surface	~85	[156]
	PAC (usine pilote)	5 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	n.d.	[156]
	PAC (usine pilote)	35 mg L <sup>-1</sup> (5 h)	Eau de surface	>90	[156]
	PAC (en laboratoire)	5 mg L <sup>-1</sup> (4 h)	Eau synthétique + eau de surface	86 (moyenne)	[414]

AC : charbon actif; MIP : polymère moléculaire imprimé; n.d. : valeur non disponible; NIP : polymère moléculaire non imprimé; PAC : charbon actif particulaire.

**Tableau A1-3.** Élimination des hormones par différents procédés membranaires.

Composé	Type d'eau	Élimination (%)	Membrane	Référence
E2	Milli-Q	83	RO	[430]
	Électrolyte liquide	90	NF/RO	[199]
	Milli-Q + acides humiques	77	NF	[431]
	Eau usée synthétique	99.5	DCMD	[432]
	Eau usée synthétique	99	FO	[432]
	Eau de surface	40	NF	[433]
	Eau de surface	8	UF	[433]
	Eau usée synthétique	100	NF	[434]
	Eau usée synthétique	100	NF	[435]
	Eau usée synthétique	100	NF/RO	[436]
Eau déionisée	86.8	NF	[437]	
E3	Milli-Q + acides humiques	70	NF	[431]
	Effluent	>95	NF/RO	[438]
	Eau de surface	8	NF	[433]
	Eau déionisée	79.8	NF	[437]
	Eau déionisée	96	NF	[437]
	Eau de surface	100	NF/RO	[436]
	Milli-Q + acides humiques	90	NF	[431]
	Milli-Q	99	RO	[439]
	Tampon (pH 8)	90	MFHF	[440]
	Eau de surface	90	MFHF	[440]
	Effluent	80	MFHF	[440]
	Tampon carbonate	99	NF/RO	[441]
	Électrolyte liquide	85	NF/RO	[199]
	Eau de surface	90	NF/RO	[199]
	Effluent	95	NF/RO	[199]
	Milli-Q + acides humiques	63	NF	[431]
	Eau usée synthétique	99.5	DCMD	[432]
	Eau usée synthétique	99	FO	[432]
	Électrolyte liquide	95	NF	[442]
	Milli-Q + acides humiques	97	NF	[443]
	Eau de surface	42	NF	[433]
	Eau de surface	44	UF	[433]
	Eau usée synthétique	100	NF	[434]
	Eau usée synthétique	98	NF/RO	[436]
Eau déionisée	100	MF	[444]	
Eau usée synthétique	95	NF	[445]	
Eau déionisée	78.6	NF	[437]	
EE2	Eau de surface	60	NF	[433]
	Eau de surface	34	UF	[433]
	Eau usée synthétique	99	NF/RO	[436]
	Eau déionisée	93.6	NF	[437]
LEVO	Eau déionisée	87.1	NF	[437]
NORE	Eau déionisée	74.1	NF	[437]
PROG	Eau déionisée	89.1	NF	[437]
	Eau de surface	70	NF	[433]
	Eau de surface	60	UF	[433]
	Eau souterraine saline	>90	NF	[156]
	Effluent	>99	UF	[156]

FO : osmose directe; DCMD : distillation membranaire à contact direct; MF : microfiltration; MFHF : microfiltration à fibre creuse; NF : nanofiltration; RO : osmose inverse; UF : ultrafiltration.

**Tableau A1-4.** Élimination des hormones oestrogénique par des procédés avancés.

Traitement (procédé)	Composé	Dose ajoutée	Temps de contact	Type d'eau	Élimination (%)	Référence
ClO <sub>2</sub>	E2	0.1-1.0 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau de surface	>95	[422]
		0.1 mg L <sup>-1</sup>	5 min	Eau souterraine	>95	[422]
	E1	0.1 mg L <sup>-1</sup>	5 min	Eau souterraine	>95	[422]
	EE2	0.1 mg L <sup>-1</sup>	5 min	Eau souterraine	>95	[422]
Fe(VI)	E2	13-17 mg L <sup>-1</sup>	60 min	Effluent	99.99	[415]
		0.05 mmol L <sup>-1</sup>	~240 min	Milli-Q	>90	[416]
		0.25 mg L <sup>-1</sup>	30 min	Eau de surface	100	[241]
		1 mg L <sup>-1</sup>	30 min	Effluent	100	[241]
		10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	>98	[446]
Fe(VI)	E1	0.05 mmol L <sup>-1</sup>	~240 min	Milli-Q	>90	[416]
		10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	>99.3	[446]
Fe(VI)	EE2	13-17 mg L <sup>-1</sup>	60 min	Effluent	99.99	[415]
		0.05 mmol L <sup>-1</sup>	~240 min	Milli-Q	>90	[416]
		0.25 mg L <sup>-1</sup>	30 min	Eau de surface	100	[241]
		1 mg L <sup>-1</sup>	30 min	Effluent	100	[241]
		10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	>99	[446]
HOCl	E2	1.46 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau synthétique	100	[410]
		1.5 mg L <sup>-1</sup>	36 h	Eau synthétique	100	[395]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 min	Eau de surface	99 (moyenne)	[404]
		1-2 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Milli-Q	95 (calculée)	[232]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 h	Eau de surface	100	[414]
HOCl	E3	1.0 mg L <sup>-1</sup>	1 h	Milli-Q	99	[394]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 min	Eau de surface	99 (moyenne)	[404]
		1-2 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Milli-Q	95 (calculée)	[232]
HOCl	E1	3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 h	Eau de surface	100	[414]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 min	Eau de surface	99 (moyenne)	[404]
		1-2 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Milli-Q	95 (calculée)	[232]
HOCl	EE2	3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 h	Eau de surface	100	[414]
		1 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau synthétique	70	[447]
		1.0 mmol L <sup>-1</sup>	5 min	Eau synthétique	100	[396]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 min	Eau de surface	99 (moyenne)	[404]
		3.5-3.8 mg L <sup>-1</sup>	24 h	Eau de surface	100	[414]
HOCl	EE2	1.0 mg L <sup>-1</sup>	1 h	Milli-Q	99	[394]
		1-2 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Milli-Q	95 (calculée)	[232]
		1.0 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Milli-Q	95 (calculée)	[232]
Mn(VII) (pH 8)	E2	3.3 mg L <sup>-1</sup> (calculée)	2.4-2.6 min (calculé)	Eau synthétique	99 (valeur attendue)	[361]
Mn(VII) (pH 8)	E3	3.3 mg L <sup>-1</sup> (calculée)	2.4-2.6 min (calculé)	Eau synthétique	99 (valeur attendue)	[361]
Mn(VII) (pH 8)	E1	3.3 mg L <sup>-1</sup> (calculée)	2.4-2.6 min (calculé)	Eau synthétique	99 (valeur attendue)	[361]
O <sub>3</sub>	E2	1.5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau déionisée	99	[394]
		5 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Effluent	95	[448]
		0.5-5 mg L <sup>-1</sup>	4.2 min	Effluent	90-99	[422]
		9.78-15.7 μmol min <sup>-1</sup>	55-90 min	Eau distillée	100	[449]
		1.5-4.9 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Eau de surface + effluent	98 (moyenne)	[404]
		3-4 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau de surface	98-99	[414]
		5-15 mg L <sup>-1</sup>	4-15 min	Milli-Q	99	[450]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
		1 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau usée	>90	[452]
		1.52 mg L <sup>-1</sup>	4 min	Milli-Q	100	[453]

Tableau A1-4. (suite)

Traitement (procédé)	Composé	Dose ajoutée	Temps de contact	Type d'eau	Élimination (%)	Référence
O <sub>3</sub>	E3	1.5-4.9 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Eau de surface + effluent	99 (moyenne)	[404]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
	E1	3-4 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau de surface	98-99	[414]
		5 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Effluent	95	[448]
		5 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Effluent	>80	[454]
		1 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau usée	>90	[452]
		0.5-5 mg L <sup>-1</sup>	4.2 min (HRT)	Effluent	90-99	[455]
		1.5-4.9 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Eau de surface + effluent	98 (moyenne)	[404]
		1.52 mg L <sup>-1</sup>	4 min	Milli-Q	100	[453]
O <sub>3</sub>	EE2	5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
		3-4 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau de surface	98-99	[414]
		0.1 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Rivière	>97	[456]
		0.2 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Lac	>97	[456]
		1 mg L <sup>-1</sup>	6 min	Eau déionisée	99.5	[457]
		0.5-5 mg L <sup>-1</sup>	4.2 min	Effluent	90-99	[455]
		1.5-4.9 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Eau de surface + effluent	99 (moyenne)	[404]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
		1 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau usée	>90	[452]
		3-4 mg L <sup>-1</sup>	10 min	Eau de surface	98-99	[414]
		1.52 mg L <sup>-1</sup>	4 min	Milli-Q	100	[453]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
O <sub>3</sub> /UV	E2	8.22-15.8 μmol min <sup>-1</sup>	45-75 min	Eau distillée	100	[449]
		1 mg L <sup>-1</sup>	30 min	Eau synthétique	99	[458]
		n.a.	55 min	Eau distillée	100	[219]
TiO <sub>2</sub>	E1	n.a.	60 min	Eau distillée	100	[219]
	EE2	n.a.	50 min	Eau distillée	100	[219]
TiO <sub>2</sub> /UV (125 W)	E2	0.8 mg L <sup>-1</sup>	2 min	ACN/eau	50	[459]
TiO <sub>2</sub> /UV (150 W)	E2	1.5 mg cm <sup>-1</sup>	210 min	ACN/eau	98	[460]
TiO <sub>2</sub> /UV	E2	n.a.	2 h	Milli-Q	90	[461]
	E1	n.a.	30 min	Milli-Q	90	[461]
	EE2	n.a.	30 min	Milli-Q	90	[461]
TiO <sub>2</sub> /UV	E2	1 g L <sup>-1</sup>	1 h	Eau déionisée	98	[462]
	E1	1 g L <sup>-1</sup>	1 h	Eau déionisée	98	[462]
TiO <sub>2</sub> /UV	E2	n.a.	4 min	Effluent	90	[463]
TiO <sub>2</sub> /UV	E1	n.a.	4 min	Effluent	90	[463]
UV	EE2	80 W	18 min	Eau synthétique	10	[464]
UV	E2	n.a.	30 min	Milli-Q	0	[461]
	E1	n.a.	30 min	Milli-Q	20	[461]
	EE2	n.a.	30 min	Milli-Q	20	[461]
UV	E2	1 g L <sup>-1</sup>	4 h	Eau déionisée	97	[462]
	E1	1 g L <sup>-1</sup>	4 h	Eau déionisée	97	[462]
UV/ClO <sub>2</sub>	EE2	80W/0.4 mg L <sup>-1</sup>	17 min	Eau synthétique	99	[464]
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	EE2	80W/5 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau synthétique	90	[464]
UV/HOCl	EE2	80W/1 mg L <sup>-1</sup>	16 min	Eau synthétique	99	[464]
UVA	E2	n.a.	485 min	Eau distillée	100	[219]
	E1	n.a.	360 min	Eau distillée	100	[219]
	EE2	n.a.	120 min	Eau distillée	100	[219]



**Tableau A1-5.** Élimination des hormones progestagéniques par des procédés avancés.

Traitement (procédé)	Composé	Dose ajoutée	Temps de contact	Type d'eau	Élimination (%)	Référence
Fe(VI)	LEVO	10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	97.5-99.3	[446]
	MPROG	10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	78.5-95.4	[446]
	NORE	10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	>99.6	[446]
	PROG	10.7-46.6 mg L <sup>-1</sup> min	1-180 min	Effluent	64.8-88.2	[446]
O <sub>3</sub>	LEVO	1.03 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau de surface	≥88.5	[373]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
	MPROG	5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
		1.03 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau de surface	≥57	[373]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
	NORE	5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
		1.03 mg L <sup>-1</sup>	15 min	Eau de surface	≥95	[373]
	PROG	1.5-4.9 mg L <sup>-1</sup>	18 min	Eau de surface + effluent	93 (moyenne)	[404]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Milli-Q	>99	[451]
		5 mg L <sup>-1</sup>	1 min	Eau potable	>99	[451]
11.3 μmol min <sup>-1</sup>		6 min (calculé)	Milli-Q	100	[465]	

## **Annexe 2**

**Tableau A2-1.** Pré-traitements des échantillons pour l'analyse des hormones dans l'eau

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
1) LLE; 2) SPE	Surface/Effluent	NORE	1) DCM; 2) Florosil	2) 2000	1) DCM; 2) évaporation	[466]
1) LLE; 2) SPE	Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	1) DCM; 2) Florosil	2) 2000	1) DCM; sonification; évaporation; sulfate de Na; 2) DCM	[467]
1) SPE; 2) LLE	Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	1) Speedisk-C18 (disque); 2) EtOAc		1) 10 mL acétone; 2) 20 mL MeOH; 3) 50 mL H <sub>2</sub> O	[468]
1) SPE; 2) LLE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis HLB	200	1) 6 mL iPrOH:MTBE (10:90, v/v); 6 mL MeOH; 3) 6 mL H <sub>2</sub> O	[469]
1) SPE; 2) LLE; 3) SPE	Effluent	E1, E2, E3, EE2	1) C18; 2) EtOAc + NaCl; 3) Supelclean LC-Florisil	1) 1000; 3) 1000	1) 5 mL hexane; 2) 5 mL EtOAc; 3) 5 mL MeOH; 4) 10 mL H <sub>2</sub> O	[292]
CPE	Effluent	E1, E2, E3, PROG	1) TritonX-114 + 0.4 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 2) Centri. 5 min 3500 rpm			[286]
DLLME	Potable/Surface	E1, E2, E3, EE2	1) 10 µL 1-undecanol; 2) 200 µL MeOH; 3) Centri. 3 min 4500 rpm			[470]
évaporation	Milli-Q:MeOH (70:30, v/v)	E1				[471]
HF-MMLLE	Potable/Usée	E1, E2, EE2	200 µm hauteur, 600 µm D.I., 0.2 µm pores		1) acetone; 2) di-n-hexyléther + oxide de tri-n-octylphosphine (10% p/v)	[472]

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
in-tube SPME	Surface/Usée	E2, E3, EE2	poly(AA-VP-bis) (1.59 mm D.E.*0.76 mm D.I.)			[473]
LLE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO	DCM		1) DCM; 2) évaporation	[466]
LLE	Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	DCM		1) 3*10-50 mL DCM; 2) évaporation; 3) sulfate de Na + florosil 5% (p/p)	[167]
SBSE	Surface	E2	PDMS	0.5 mm d'épaisseur	120 min, 300°C avec un flux d'He	[474]
SBSE	Usée (effluent et affluent)	E2, E3	PDMS	0.5 mm d'épaisseur	300 min, température pièce	[475]
SBSE	Effluent	E1, E2, EE2	PDMS	0.5 mm d'épaisseur	120 min, 300°C avec un flux d'He	[476]
SBSE	Souterraine	E1, E2, EE2	PDMS (120 min, pH = 7.2, < 20% NaCl)	20 mm*1.0 mm	ACN	[477]
SBSE	Milli-Q	PROG	poly(vinylpyridine-éthylène diméthacrylate) monolithique	30 mm*1.0 mm	n.d.	[478]
SBSE	Souterraine	NORE, PROG	PDMS (240 min, pH = 7.2, < 20% NaCl)	20 mm*1.0 mm	ACN	[477]
SPE	Surface/Usée (effluent et affluent)	E2	1) tC18; 2) aminopropyl (NH <sub>2</sub> )	1) 2000; 2) n.d.	1) 5 mL MeOH; 10 mL H <sub>2</sub> O; 2) 5 ml MeOH	[18]
SPE	Effluent/Affluent	LEVO	GracePure™ SPE C18-Low	n.d.	1) MeOH; 2) H <sub>2</sub> O	[175]
SPE	Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO	Lichrolut EN + Bondesil C-18	3000 + 4000	1) 15 mL MeOH; 2) 15 mL H <sub>2</sub> O	[479]
SPE	Surface	E1, E2, EE2	Oasis-HLB	200	1) 5 mL EtOAc; 2) 5 mL MeOH;	[480]

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
					3) 15 mL H <sub>2</sub> O	
SPE	Usée	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	500	1) 5 mL MTBE; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[481]
SPE	Surface/Synthétique	EE2	ENVI™-18 DSK (disque)		1) 50 mL MeOH; 2) 30 mL H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 3.0)	[482]
SPE	Milli-Q/Synthétique/ Effluent/Affluent	EE3	1) LiChrolut EN + LiChrolut RP-18; 2) silice	1) 100 + 250; 2) 1000	1) 24 mL hexane; 24 mL acétone; 24 mL H <sub>2</sub> O (pH = 2.0); 2) 10 hexane:acétone (65:35, v/v)	[483]
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2	Supelco Discovery SPE C18	n.d.	1) 5 mL hexane; 2) 5 mL EtOAc; 3) 5 mL MeOH; 4) 5 mL H <sub>2</sub> O	[224]
SPE	Usée (effluent et affluent)	E2, E3	Oasis-HLB	n.d.	1) 5 mL hexane:acétone (50:50, v/v); 2) 5 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[475]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Oasis-HLB	200	1) 6 mL MeOH; 2) 6 mL H <sub>2</sub> O	[171]
SPE	Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Bond Elute C-18	500	1) 3 mL MeOH; 2) 3 mL H <sub>2</sub> O	[484]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Bond Elute C-18	500	1) 3 mL MeOH; 2) 3 mL H <sub>2</sub> O	[485]
SPE	Surface	E1, E2, E3, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Bond Elute C-18	500	1) 3 mL MeOH; 2) 3 mL H <sub>2</sub> O	[486]
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2	ENV/124	n.d.	1) 10 mL acétone; 2) 10 mL H <sub>2</sub> O	[487]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2	1) SDB-XC (disque) (surface) ou 2) C18-ODS (effluent)	1) 47 mm; 2) 5000	1) 20 mL MeOH; 20 mL MeOH:ACN (1:1, v/v); 20 mL MeOH:H <sub>2</sub> O (4:1, v/v); 20 mL MeOH:H <sub>2</sub> O (2:3, v/v); 20 mL H <sub>2</sub> O; 2) 20 mL MeOH; 20 mL H <sub>2</sub> O	[159]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	1) Oasis HLB; 2) Silice	1) 500; 2) 500	1) 3 mL EtOAc; 3 mL MeOH; 3 mL H <sub>2</sub> O; 2) 5 mL EtOAc	[488]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, EE2	Oasis HLB	200	1) 5 mL EtOAc; 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O	[489]
SPE	Surface	E1, E2, E3	1) Speedisk C18XF (disque); 2) Silice	2) 500	1) 20 mL acétone; 20 mL MeOH; 20 mL H <sub>2</sub> O; 2) 2.5 mL hexane	[490]
SPE	Surface	E1, E2, EE2	Oasis-HLB	200	1) 5 mL EtOAc; 2) 5 mL MeOH; 3) 15 mL H <sub>2</sub> O	[480]
SPE	Milli-Q/Effluent	E1, E2, E3	ENVI-18	n.d.	1) 5 mL acétone; 2) 5 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[491]

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3	1) SDB-XC (disque); 2) C18 + NH <sub>2</sub>		2) MeOH:H <sub>2</sub> O; EtOAc	[146]
SPE	Souterraine/Effluent/Affluent	E1, E2, EE2	1) Lichrolut-EN + RP-C18; 2) Silice	1) 100 + 250; 2) 1000	1) 6 mL Hexane; 2 mL Acétone; 6 mL MeOH; 10 mL H <sub>2</sub> O (pH 3.0); 2) 10 mL hexane:acétone (35:65, v/v)	[137]
SPE	Souterraine/Lagon	E1, E2, EE2	Oasis HLB	600	1) 3 mL MTBE; 2) 3 mL MeOH; 3) 3 mL H <sub>2</sub> O	[492]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	1) Oasis HLB; 2) Silice	1) 500; 2) 500	1) 3 mL EtOAc; 3 mL MeOH; 3 mL H <sub>2</sub> O; 2) 5 mL EtOAc	[488]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis HLB	500	1) 6 mL éther diéthylique; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[493]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, EE2	Oasis HLB	200	1) 5 mL EtOAc 2) 5 mL MeOH 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[489]
SPE	Surface/Effluent/ Affluent/boues	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Supelclean LC-18	500	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O:MeOH (99:1, v/v)	[494]
SPE	Potable/Surface/ Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	LiChrolut RP-18	500	1) 7 mL ACN; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[495]
SPE	Surface	E2, EE2	PAC	5-15 (240 min)	n.d.	[496]
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	500	1) 10 mL MeOH; 2) 10 mL H <sub>2</sub> O	[497]
SPE	Effluent	E1, E2, EE2	1) Lichrolut EN + C18; 2) Immunosorbant	1) 200 + 500	1) 6 mL hexane; 2) 2 mL acétone; 3) 6 mL MeOH; 4) 10 mL H <sub>2</sub> O	[498]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Lichrolut RP-18	500	1) 7 mL MeOH; 2) 3 mL H <sub>2</sub> O	[177]
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Lichrolut RP-18	500	1) 7 mL ACN; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[499]
SPE	Effluent	E1, E2, E3, LEVO, NORE, PROG	1) StrataX; 2) Silice	1) 200; 2) n.d.	1) 3 mL MeOH; 3 mL H <sub>2</sub> O; 2) 3 mL heptane:acétone (65:35, v/v)	[179]
SPE	Milli-Q/Effluent	E1, E2, E3,	ENVI-18	n.d.	1) 5 mL acétone; 2) 5 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[491]
SPE	Potable/Synthétique/ Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Sep-Pak Vac tC18	n.d.	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O	[112]

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	250	1) 10 mL MeOH; 2) 10 mL H <sub>2</sub> O	[149]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	500	1) 6 mL MeOH; 2) 6 mL H <sub>2</sub> O	[500]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Oasis-HLB	500	1) 6 mL EtOAc; 2) 6 mL MeOH; 3) 6 mL H <sub>2</sub> O	[163]
SPE	Surface	E1, E2, E3	Oasis-HLB	200	1) 6 mL EtOAc; 2) 6 mL MeOH; 3) 6 mL H <sub>2</sub> O	[323]
SPE	Surface	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	LiChrolut RP-18	500	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O	[170]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	200	1) 6 mL MeOH; 2) 6 mL H <sub>2</sub> O	[501]
SPE	Surface	E1, E2, EE2	Oasis-HLB	200	1) 5 mL EtOAc; 2) 5 mL MeOH; 3) 15 mL H <sub>2</sub> O	[480]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, EE2	Oasis-HLB	500	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O	[502]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	ENVI-18 (disque, 47 mm)		1) 10 mL MeOH; 2) 10 mL H <sub>2</sub> O	[178]
SPE	Effluent	E1, E2, E3, EE2	Sep-Pak Vac C18	500	1) 15 mL MeOH; 2) 15 mL H <sub>2</sub> O	[503]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	DVB-phobic Speedisk (disque)		1) 15 mL MeOH; 2) 15 mL H <sub>2</sub> O	[275]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	500	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O	[504]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	200	1) 6 mL MeOH; 2) 6 mL H <sub>2</sub> O	[505]
SPE	Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	1) tC18; 2) aminopropyl (NH <sub>2</sub> )	1) 500; 2) 500	1) 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O; 2) EtOAc:hexane (90:10, v/v); hexane	[506]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis-HLB	200	1) 10 mL DCM:MeOH (50:50, v/v); 2) 5 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[143]
SPE	Surface/Usée (effluent et affluent)	E1, E2, E3, EE2	1) tC18; 2) aminopropyl (NH <sub>2</sub> )	1) 2000; 2) n.d.	1) 5 mL MeOH; 10 mL H <sub>2</sub> O; 2) 5 mL MeOH	[18]
SPE	Milli-Q/Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2	PolarPlus C18 Speedisks		1) 10 mL DCM:MeOH (50:50, v/v); 2) 10 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[164]
SPE	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2	PolarPlus C18 Speedisks		1) 10 mL DCM:MeOH (50:50, v/v);	[271]

Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
					2) 10 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	
SPE	Souterraine/Surface	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Strata C18-E	200	1) 3 mL MeOH; 2) 3 mL H <sub>2</sub> O	[507]
SPE	Effluent	LEVO	Oasis-HLB	200	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL H <sub>2</sub> O	[508]
SPE	Surface/Effluent	EE2, LEVO, NORE	Oasis MCX	60	1) 3 mL MTBE; 2) 3 mL MeOH; 3) 3 mL H <sub>2</sub> O; 4) H <sub>2</sub> O (FA, pH = 2)	[161]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	LEVO, NORE, MEDRO, PROG	1) Oasis-HLB; 2) Silice	500/ n.d.	1) 6 mL EtOAc; 6 mL ACN; 12 mL H <sub>2</sub> O; 2) 4 mL H <sub>2</sub> O + EtOAc; 4 mL hexane:EtOAc (90:10, v/v)	[509]
SPE	Milli-Q/Surface/Effluent	PROG, NORE	Oasis MCX	150	1) 6 mL ACN; 2) 6 mL H <sub>2</sub> O	[510]
SPE	Milli-Q/Effluent	E1, E2, E3	ENVI-18	n.d.	1) 5 mL acétone; 2) 5 mL MeOH; 3) 10 mL H <sub>2</sub> O	[491]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Carbograh 4	500	1) 10 mL DCM:MeOH (80:20, v/v); 2) 5 mL MeOH; 3) 20 mL H <sub>2</sub> O + HCl (pH 2); 4) 5 mL H <sub>2</sub> O	[139]
SPE	Surface (cotière)	E1, E2, E3, EE2	1) Oasis HLB; 2) Silice	1) 4000; 2) 3000	1) 150 mL ACN:MeOH (80:20, v/v); 2) 150 mL H <sub>2</sub> O	[511]
SPE	Surface	E2, EE2, PROG	Oasis HLB	500	1) 5 mL MTBE; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[329]
SPE	Potable/Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	1) RP-C18; 2) Silice (affluent)	1) 1000; 2) 500	1) 8 mL MeOH; 8 mL H <sub>2</sub> O; 2) hexane:acetone (65: 35,v/v) (affluent)	[512]
SPE	Surface/Usée (effluent et affluent)	E1, E2, E3, EE2	1) tC18; 2) aminopropyl (NH <sub>2</sub> )	1) 2000; 2) n.d.	1) 5 mL MeOH; 10 mL H <sub>2</sub> O; 2) 5 ml MeOH	[18]
SPE	Grise	E1, E2, E3, EE2	Strata-X	500	n.d.	[513]
SPE	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	Oasis HLB	500	1) 6 mL éther diéthylique; 2) 5 mL MeOH; 3) 5 mL H <sub>2</sub> O	[493]
SPE en-ligne	Potable/Souterraine/Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	PLRP-S		1) 4 mL ACN; 2) 4 mL H <sub>2</sub> O (2 mL min <sup>-1</sup> )	[253]
SPE en-ligne	Effluent/Affluent	E1, E2, EE2	Oasis-HLB (25 µm)		1) MeOH (2 min); 2) H <sub>2</sub> O (1 min)	[325]
SPE en-ligne	Usée	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Oasis HLB (2 en tandem)	20 µm; 2.1 mm × 30 mm	1) MeOH; acétone; hexane (1:1:1, v/v); 2) H <sub>2</sub> O (A.A. 0.5%, v/v)	[252]



Type d'extraction	Matrice d'eau	Composé	Détail sur l'extraction (cartouche, matériel, solvant)	Masse (mg) / conditions	Conditionnement	Référence
SPE en-ligne	Surface/Effluent	E1, E2, E3, EE2, LEVO, MEDRO, LEVO, PROG	Hypersil GOLD™ C18 (12 µm)		1) MeOH; 2) H <sub>2</sub> O à l'intérieur de 4 min	[98]
SPE en-ligne	Surface	E1, E2, E3, EE2	PLPR-S		1) 4 mL ACN; 2) 4 mL H <sub>2</sub> O	[324]
SPE en-ligne	Milli-Q/Surface/ Effluent/Affluent	E1, E2, E3, EE2	IonPac® NG1		1) ACN; 2) H <sub>2</sub> O	[322]
SPE en-ligne	Surface/Usée	E1, E2, E3, EE2	Strata C 18E	20 mm × 2 mm i.d., 25 µm	1) ACN; 2) H <sub>2</sub> O	[320]
SPE en-ligne	Surface	E1, E2, E3	CLEAN-UP C18 ou matériel de filtre à cigarette	200 ou 80	1) MeOH; 2) H <sub>2</sub> O	[300]
SPE en-ligne (MIP)	Surface	E2	MIP (6-ketoestradiol <i>template</i> )	30 mm*4.6 mm		[514]
SPME	Milli-Q/Synthétique/ Effluent/Affluent	EE2	Polyacrylate (85 µm)	60 min, pH = 2.0, NaCl		[483]
SPME	Surface/Effluent/Affluent	E1, E2, EE2	PA (85µm) (60 min)			[515]
SPME	Surface/Usée	E1, E2, EE2	PA (85µm) (45 min)		chambre de désorption 30 min	[516]

**Tableau A2-1.** Pré-traitements des échantillons pour l'analyse des hormones dans l'eau (*suite*)

<i>Volume d'extraction (mL)</i>	<i>Élution/solvant d'extraction/désorption</i>	<i>Volume final (mL)</i>	<i>FC</i>	<i>Recouvrement (%)</i>	<i>Référence</i>
40	n.d.	10	1200	>50 (SI)	[466]
40	2) 20 mL DCM; 20 ml acetone:DCM (30:70, v/v)	0.055	727	22-110	[467]
500	1) Acétone	0.200	2500	89-97 (effluent)	[468]
500	iPrOH:MTBE (10:90, v/v)	0.200	2500	84-100 (surface)	[469]
1000	1) EtOAc; 3) DCM:acetone (95:5, v/v)	0.200	5000	94-99 (0 E3)	[292]
10	TritonX-114 + 0.4 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25%, w/v)	0.02	99	81-98	[286]
5		2 µL surnageant + 35 µL DMSO	200	89-102/87-116	[470]
0.150		0.01 (injection)			[471]
100	di-n-hexyléther	0.03	1500-3400	45-95	[472]
	phase mobile	0.02 (injection)		101-107/86-91	[473]
12 000	n.d.	10	1200	>50 (SI)	[466]
40-500				>70	[167]
10	desorption thermique			93-98	[474]
1g (boue liquide)	desorption thermique			49-57 (théorique)	[475]
100	desorption thermique			n.d.	[476]
30	ACN	0.100	300	11-25 (Milli-Q)	[477]
50	MeOH	0.5	100	92-101 (eaux naturelles)	[478]
30	ACN	0.100	300	37-64 (Milli-Q)	[477]
1000	1) DCM; 2) MeOH	1 (dilution 1:10 dans PBST)	100	81 (Milli-Q)	[18]
500	MeOH	0.250 (diluée pour ELISA 1:20)	2000	95-124 (Milli-Q)	[175]
jusqu'à 25 000	Acetone:MeOH	0.100		78 (moyenne)	[479]
1000	MeOH	0.100	10000	72-119	[480]
400	DCM:acétone (70:30, v/v)	0.5	800	95-118	[481]
500	Acetone	0.200	5000	83 (Milli-Q)	[482]
1000	1) Acétone; 2) hexane:acétone (65:35, v/v)	0.200	~5000	n.d.	[483]
50	1) EtOAc:MeOH (80:20, v/v)	0.100	500	84-113	[224]
1000	1) 5 mL MeOH; 2) 5 mL hexane:acetone (50:50, v/v)	0.150	6667	96-120	[475]
1000	MeOH	0.06	1666	74-122/74-118	[171]
1000	MeOH	0.380	2632	86-101 (effluent)	[484]
3000	MeOH	0.380	7895	81-101	[485]
3000	MeOH	0.280		72-101 (Milli-Q)	[486]
200	Acétone	2.0	100	87-127	[487]
2500	1) MeOH:H <sub>2</sub> O (4:1, v/v); MeOH:ACN (1:1, v/v); 2) MeOH; MeOH:DCM (1:1, v/v)	0.5-1.0	5000-2500	84-116 (disque)	[159]

<i>Volume d'extraction (mL)</i>	<i>Élution/solvant d'extraction/désorption</i>	<i>Volume final (mL)</i>	<i>FC</i>	<i>Recouvrement (%)</i>	<i>Référence</i>
2000/2000/1000/1000	1) EtOAc; 2) EtOAc	0.400	12 500/12 500/2500/2500	87-108 (Milli-Q)/92-102 (effluent)	[488]
100	EtOAc	0.05	2000	90-99	[489]
2000	1) Acétone:MeOH (1:3, v/v); 2) Chloroforme:acétone (4:1, v/v)	0.025	80 000	105 (Milli-Q)	[490]
1000	MeOH	0.100	10000	72-119	[480]
1000	ACN	1.0	1000	n.d.	[491]
1000	1) MeOH; 2) EtOAc	0.05	20 000	88-98 (Milli-Q)	[146]
1000	1) Acétone; 2) hexane:acétone (65:35, v/v)	0.200	5000	77-90/76-82/84-88	[136]
500	MeOH:MTBE (10:90, v/v)	0.200	2500	82-128 (lagon)	[492]
2000/2000/1000/1000	1) EtOAc; 2) EtOAc	0.400	12 500/12 500/2500/2500	79-98 (affluent)	[488]
1000/250/250	MeOH:éther diéthylique (10:90, v/v)	0.550	1818/455/455	82-109 (Milli-Q)	[493]
100	EtOAc	0.05	2000	90-99	[489]
1000/100/100/1	MeOH	0.100	10000/1000/1000/10	90-100 (H <sub>2</sub> O)	[494]
500	ACN	0.500	1000	85-113 (Milli-Q)	[495]
1000	n.d.			90,95 (Milli-Q)	[496]
250	EtOAc	1.0	250	84	[497]
1000		0.200	5000	2-107	[498]
200	MeOH	1.0	200	>83	[177]
500	ACN	0.300	1667	83-94	[499]
700	1) ACN; 2) heptane:acétone (65:35, v/v)	0.250	2800	81-106 (Milli-Q)	[179]
1000	ACN	1.0	1000	n.d.	[491]
1000	ACN:H <sub>2</sub> O (7:3, v/v)	0.250	4000	93-100/87-103/74-98/74-87/67-89	[112]
1000	EtOAc	1.0	1000	81-116	[149]
1000/200	MeOH	0.200	5000/1000	81-140	[500]
2000/200/70	MeOH	0.500	4000/400/140	78-100	[163]
500	EtOAc	0.100	5000	88-105	[323]
500	MeOH	0.250	2000	80-110	[170]
1000/800/500	MeOH	1.0	1000/800/500	63-105/80-109 (affluent)	[501]
1000	MeOH	0.100	10000	72-119	[480]
1000	MeOH	1.0	1000	82-88	[502]
1000 (1:9, surface: Milli-Q)	ACN	0.100	1000	83 (effluent)	[178]
250	MeOH	2.0	125	67-91	[503]
1000	1) MTBE; 2) MeOH	1.0	1000	63-90 (affluent)	[275]
500/250/100	MeOH:ACN (95:5, v/v)	1.0	500/250/100	32-76/49-61/30-60	[504]
250/250/100	MeOH:ACN (70:30, v/v)	0.200	1250/1250/500	82-87/95-112/91-115	[505]
1000	1) MeOH; DCM; 2) MeOH:NH <sub>4</sub> OH (97:3, v/v)	0.200	5000	90-100/83-100	[506]

<i>Volume d'extraction (mL)</i>	<i>Élution/solvant d'extraction/désorption</i>	<i>Volume final (mL)</i>	<i>FC</i>	<i>Recouvrement (%)</i>	<i>Référence</i>
1000/250/100	1) 10 mL DCM:MeOH (50:50, v/v)	0.200	5000/1250/500	96-100/89-96/91-96	[143]
1000	1) DCM; 2) MeOH	1	1000	75-86 (Milli-Q)	[18]
1000	MeOH:DCM (50:50, v/v)	0.02	50000	65-79 (Milli-Q)	[164]
1000	MeOH:DCM (50:50, v/v)	adapté pour la dérivation	adapté pour la dérivation	65-79 (Milli-Q)	[271]
1000	MeOH	0.200	5000	98 (Milli-Q)	[507]
1000	MeOH	0.200	5000	99 (Milli-Q)	[507]
1000	MeOH	0.200	5000	96-99 (Milli-Q)	[507]
100	MeOH	1.0	100	92	[508]
150/100	MeOH:H <sub>2</sub> O (25:75, v/v)	0.200	750/500	59-87/61-76	[161]
2000/1000/500	1) EtOAc; 2) hexane:EtOAc (38:62, v/v)	0.500	4000/2000/1000	78-83/82-100/78-86	[509]
500	ACN	0.500	1000	104-106/93-114/84-107	[510]
1000	ACN	1.0	1000	n.d.	[491]
4000/400/150	DCM:MeOH (80:20, v/v)	0.02	200 000/20 000/7500	87-90/84-88/86-91	[139]
49 000	1) ACN:MeOH (80:20, v/v); 2) DCM:MeOH (90:10, v/v); DCM:MeOH (80:20, v/v)	0.400	122 500	75-90	[511]
1000	MeOH:MTBE (10:90, v/v)	1.0	1000	90-92	[329]
500/500/500/100	1) MeOH; 2) hexane:acetone (65: 35,v/v) (affluent)	1) 0.100; 2) 0.100	5000/5000/5000/500	98-105/96-103/93-96/101-107	[512]
1000	1) DCM; 2) MeOH	0.500	2000	75-86 (Milli-Q)	[18]
1000	n.d.	n.d.		79-102	[513]
1000/250/250	MeOH:éther diéthylique (10:90, v/v)	0.550	1818/455/455	82-109 (Milli-Q)	[493]
200	phase mobile			101-112 (Milli-Q)	[253]
1.0	phase mobile			80-95	[325]
1-5	1) MeOH; acétone; hexane (1:1:1, v/v); 2) H <sub>2</sub> O (A.A. 0.5%, v/v)			72-101	[252]

<i>Volume d'extraction (mL)</i>	<i>Élution/solvant d'extraction/désorption</i>	<i>Volume final (mL)</i>	<i>FC</i>	<i>Recouvrement (%)</i>	<i>Référence</i>
1.0	phase mobile			85-103/75-95	[98]
250	phase mobile			>70 (Milli-Q)	[324]
50	phase mobile			n.d./101-117/88-106/80-119	[322]
2.5	phase mobile			71-95 (Milli-Q)	[320]
50	phase mobile			85-105 (cigarette); 86-110 (C18)	[300]
50	phase mobile			93-96	[514]
9.5	280°C: 3 min, 5.4 cm profondeur			n.d.	[483]
100	désorption thermique 5 min, 280°C	0.05	2000	88-124 (calculé, Milli-Q)	[515]
3.5	désorption en mode static avec ACN (2 min)	n.d.		n.d.	[516]

**Tableau A2-2.** Méthodes analytiques pour l'analyse des hormones dans l'eau

<i>Méthode analytique</i>	<i>Source</i>	<i>Composé</i>	<i>Matrice d'eau</i>	<i>Conservation (°C)</i>	<i>Filtre</i>	<i>Type d'extraction</i>	<i>Référence</i>
ELISA ( $\lambda=450\text{nm}$ )		E2	Surface/Usée (effluent et affluent)		HVLP (Millipore)	SPE	[18]
ELISA ( $\lambda=450\text{nm}$ )		LEVO	Effluent/Affluent		Nylon	SPE	[175]
GC-HRMS	EI	E1, E2, E3, LEVO	Effluent		n.d.	SPE	[479]
GC-HRMS	EI	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Surface/Effluent		aucune	LLE	[466]
GC-HRMS	EI	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Effluent	Formaline 5%	aucune	1) LLE; 2) SPE	[467]
GC-IT-MS	EI	E1, E2, E3	Surface	Azide de sodium ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ )	GF	SPE	[480]
GC-MS	EI	E1, E2, EE2	Potable/Usée		GF	HF-MMLLE	[472]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Usée	MeOH (1% v/v)	GF	SPE	[481]
GC-MS	EI	EE2	Surface/Synthétique	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (pH = 3.0)	GF	SPE	[482]
GC-MS	EI	EE2	Milli-Q/Synthétique/Effluent/Affluent		GF	SPME	[483]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Surface		Nylon	SPE	[224]
GC-MS	EI	E2	Surface		n.d.	SBSE	[474]
GC-MS	EI	E2, E3	Usée (effluent et affluent)		centrifugation	SPE	[475]
GC-MS	EI	E2, E2	Usée (effluent et affluent)		centrifugation	SBSE	[475]
GC-MS	EI	E1, E2, EE2	Effluent		n.d.	SBSE	[476]

<i>Méthode analytique</i>	<i>Source</i>	<i>Composé</i>	<i>Matrice d'eau</i>	<i>Conservation (4°C)</i>	<i>Filtre</i>	<i>Type d'extraction</i>	<i>Référence</i>
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Effluent		n.d.	LLE	[167]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Surface/Effluent	Formaldéhyde (1% v/v)	GF	SPE	[172]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, LEVO, NORE	Effluent		NC	SPE	[484]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE	Effluent/Affluent		NC	SPE	[485]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface		NC	SPE	[486]
GC-MS	NICI (CH <sub>4</sub> )	E1, E2, E3, EE2	Surface		filtre non-spécifié	SPE	[487]
GC-MS	NICI (CH <sub>4</sub> )	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent		GF	SPE	[159]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent		Cellulose	SPE	[488]
GC-MS	EI	E1, E2, EE2	Effluent/Affluent	Azide de sodium (pH = 8.0)	GF	SPE	[489]
GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Effluent/Affluent		GF	1) SPE; 2) LLE	[468]
GC-MS	EI	E1, E2, E3	Surface		aucune	SPE	[490]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, EE2	Surface	Azide de sodium (2 mol L <sup>-1</sup> )	GF	SPE	[480]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, E3	Milli-Q/Effluent		n.d.	SPE	[491]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, E3	Surface/Effluent		filtre non-spécifié	SPE	[146]
GC-MS/MS	NICI (CH <sub>4</sub> )	E1, E2, EE2	Souterraine/Effluent/Affluent		GF	SPE	[137]
GC-MS/MS	NICI (CH <sub>4</sub> )	E1, E2, EE2	Souterraine/Lagon	Formaldéhyde 37% ajoutée à chaque 100 mL d'eau de lagon	GF	SPE	[492]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent		Cellulose	SPE	[488]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent	Formaldéhyde (1-3%, v/v)	CA	SPE	[493]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, EE2	Effluent/Affluent	Azide de sodium (pH = 8.0)	GF	SPE	[489]
GC-MS/MS	EI	E1, E2, EE2	Surface/Effluent/Affluent		filtre non-spécifié	SPME	[515]
LC-DAD (λ=200, 280nm)		E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface/Effluent/Affluent/boues		aucune	SPE	[494]
LC-DAD (λ=200nm)		E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Potable/Souterraine/Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE en-ligne	[253]
LC-DAD (λ=200nm)		E1, E2, EE2, NORE, PROG	Souterraine		aucune	SBSE	[477]
LC-DAD (λ=240nm)		PROG	Milli-Q		n.d.	SBSE	[478]
LC-DAD-MS (λ=197nm)	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, MEDRO, NORE, PROG	Potable/Surface/Effluent/Affluent	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 3.0, si plus de 24 h avant l'extraction)	GF	SPE	[495]
LC-ED (V=1.0 V; T=40°C;		E1, E2, EE2	Surface/Usée		Nylon	SPME	[516]

<i>Méthode analytique</i>	<i>Source</i>	<i>Composé</i>	<i>Matrice d'eau</i>	<i>Conservation (4°C)</i>	<i>Filtre</i>	<i>Type d'extraction</i>	<i>Référence</i>
Ag/AgCl)							
LC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}}=227\text{nm}$ ; $\lambda_{\text{em}}=315\text{nm}$ )		E2, E3, EE2	Surface/Usée		Nylon	<i>in-tube</i> SPME	[473]
LC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}}=280\text{nm}$ ; $\lambda_{\text{em}}=310\text{nm}$ )		E2, EE2	Surface		aucune	SPE	[496]
LC-IT-MS/MS	ESI(+)	E1, E2, E3, EE2	Surface	Formaldéhyde (1% v/v)	n.d.	SPE	[497]
LC-MS	ESI(-)	E1, E2, EE2	Effluent	Formaldéhyde (0.4% v/v)	GF	SPE	[498]
LC-MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Effluent/Affluent		aucune	SPE	[177]
LC-MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Surface		filtre non-spécifié	SPE	[499]

Méthode analytique	Source	Composé	Matrice d'eau	Conservation (4°C)	Filtre	Type d'extraction	Référence
LC-MS	ESI(+)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, PROG	Effluent	Acide formique (pH = 2.4)	GF + NC (Millipore)	SPE	[179]
LC-MS	ESI(-)	E1, E2, E3,	Milli-Q/Effluent		n.d.	SPE	[491]
LC-MS	ESI(-)	E2	Surface		aucune	SPE en-ligne (MIP)	[514]
LC-MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Potable/Synthétique/ Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE	[112]
LC-MS/MS	ESI(+)	E1, E2, E3, EE2	Surface	1 mL acide acétique	GF	SPE	[149]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent		GF	SPE	[500]
LC-MS/MS	ESI(+)	E1, E2, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface/Effluent/Affluent	Formaldéhyde (1% v/v)	GF	SPE	[163]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3	Surface	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 2.0)	n.d.	SPE	[323]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2,	Surface	HCl (pH = 5.0)	Nylon	SPE	[170]
LC-MS/MS	ESI(+)	LEVO, NORE, PROG	Surface	HCl (pH = 5.0)	Nylon	SPE	[170]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent	1 g L <sup>-1</sup> acide ascorbique	GF	SPE	[501]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, EE2	Surface	Azide de sodium (2 mol L <sup>-1</sup> )	GF	SPE	[480]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, EE2	Surface/Effluent	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 4.0) + EDTA	1) GF; 2) CA	SPE	[502]
LC-MS/MS	ESI(+)	E1, E2, EE2	Effluent/Affluent		Millipore	SPE en-ligne	[325]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface/Effluent		Nylon	SPE	[178]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE,	Usée	Acidification (pH = 3.0), espèce non-spécifiée	filtre non-spécifié	SPE en-ligne	[252]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Effluent	Acidification (pH = 3.0), espèce non-spécifiée	1) Papier 2) Millipore	SPE	[503]
LC-MS/MS	APCI(+)	E1, E2, EE2	Effluent/Affluent		n.d.	SPE	[275]
LC-MS/MS	ESI(-)	E3	Effluent/Affluent		n.d.	SPE	[275]
LC-MS/MS	APPI(+)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface/Effluent	Acide formique (1%, pH = 2.4)	MCE	SPE en-ligne	[98]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent	HCl (pH = 2.0)	Nylon	SPE	[504]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE	[505]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Effluent/Affluent		GF	SPE	[506]
LC-MS/MS	APCI(-)	E1	Milli-Q:MeOH (70:30, v/v)		n.d.	évaporation	[471]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE	[143]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Usée (effluent et affluent)		HVLP (Millipore)	SPE	[18]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Milli-Q/Surface/Effluent	Formaldéhyde (1% v/v)	PVDF	SPE	[164]
LC-MS/MS	ESI(+)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent		PVDF	SPE	[271]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Effluent		GF	1) SPE; 2) LLE; 3) SPE	[292]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface		HVLP (Millipore)	SPE en-ligne	[324]



<i>Méthode analytique</i>	<i>Source</i>	<i>Composé</i>	<i>Matrice d'eau</i>	<i>Conservation (4°C)</i>	<i>Filtre</i>	<i>Type d'extraction</i>	<i>Référence</i>
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2, LEVO, MEDRO, NORE, PROG	Souterraine/Surface	Acide formique (pH = 3.0)	GF + NC (Millipore)	SPE	[507]
LC-MS/MS	ESI(+)	LEVO	Effluent		Millipore	SPE	[508]
LC-MS/MS	ESI(-)	EE2, LEVO, NORE	Surface/Effluent	HCl (37%, pH = 2) + 50 mg acide ascorbique + 1 g azide de sodium	GF	SPE	[[161]
LC-MS/MS	ESI(+)	LEVO, NORE, MEDRO, PROG	Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE	[509]
LC-MS/MS	ESI(+)	PROG, NORE	Milli-Q/Surface/Effluent		n.d.	SPE	[510]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3	Milli-Q/Effluent		n.d.	SPE	[491]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent	Formaldéhyde (si plus de 24 h avant l'extraction)	GF	SPE	[139]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Milli-Q/Surface/Effluent/Affluent		GF	SPE en-ligne	[322]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Usée		Nylon	SPE en-ligne	[320]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface (cotière)		GF	SPE	[511]
LC-MS/MS	APCI(+)	E2, EE2, PROG	Surface	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 2.0)	aucune	SPE	[329]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent	MeOH (5%, v/v)	GF	1) SPE; 2) LLE	[469]
LC-MS/MS	ESI(-)	E1, E2, EE2	Potable/Surface/Effluent/Affluent		filtre non-spécifié (affluent)	SPE	[512]
LC-Q-TOF-MS	ESI(-)	E1, E2, E3, EE2	Surface/Usée (effluent et affluent)		HVLP (Millipore)	SPE	[18]
LC-UV (λ=200nm)		E1, E2, E3	Effluent		filtre non-spécifié	CPE	[286]
LC-UV (λ=220nm)		E1, E2, E3, EE2	Grise		n.d.	SPE	[513]
LC-UV (λ=230nm)		E1, E2, E3, PROG	Surface	Formaldéhyde (1%, v/v)	GF	SPE en-ligne	[300]
LC-UV (λ=280nm)		E1, E2, E3, EE2	Potable/Surface		Millipore	DLLME	[470]
LC-UV (λ=280nm)		E1, E2, EE2	Surface/Usée		Nylon	SPME	[516]
LVI-GC-MS	EI	E1, E2, E3, EE2	Surface/Effluent/Affluent	Formaldéhyde (1-3%, v/v)	CA	SPE	[493]

**Tableau A2-2.** Méthodes analytiques pour l'analyse des hormones dans l'eau (*suite*)

<i>Dérivatisation</i>	<i>Colonne</i>	<i>Phase mobile</i>	<i>Temps d'analyse (min)</i>	<i>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Méthode utilisée pour LOD et LOQ</i>	<i>Référence</i>
			142	2.5	2.5	10% de B(absorbance min.)/B <sub>0</sub> (absorbance max)	[18]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	60	0.7 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[175]
MSTFA + TMSI + DTE (1000:4:2, v/p/p) (30 min)	DB-5MS	He (20 psi)	10	0.05 (calculée)	1.0	S/N	[479]
n.d (voir [467])	DB-5 MS	He	n.d. (voir [467]2008)	0.82-2.68 (Surface)	n.d.	S/N	[466]
Pyridine + BSTFA:TCMS (99:1, v/v) (180 min)	DB-5 MS	He	33	1.5-84	n.d.	S/N	[467]
BSTFA (30min)	HP-5 (30 m)	He (1 ml min <sup>-1</sup> )	25	0.7-1.4	n.d.	3*ET (blanc, n=10)	[480]
MTBSA (60 min)	VF-1 ms (PDMS)	He (1.2 ml min <sup>-1</sup> )	20	2-10 (usée)	6-30 (usée)	S/N	[472]
Pyridine + BSTFA avec 1% of TMCS (30 min)	HP-5MS	He (1.5 ml min <sup>-1</sup> )	22	n.d.	0.8-4.0	S/N	[481]
1) Bromure de PFB + acetone (5:95; v/v); 2) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O (10:90 p/v) (60 min)	HP-5MS	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	36	0.2 (Milli-Q)	0.5 (Milli-Q)	S/N	[482]
Silanisation: Sylon BTZ (60 min)	HP-5MS	He (55 kPa)	20.5	20/30/40/n.d.	60/90/120/n.d.	S/N	[483]
Silanisation: Sylon BTZ (60 min)	HP-5MS	He (55 kPa)	35	10 (Effluent)	30 (Effluent)	S/N	[483]
BSTFA + 1% TMCS (30 min)	DB-5	He (40 psi)	17.8	n.d.	0.05-0.2	S/N	[224]
Acide acétique anhydre + BSTFA (120 min)	DB-5MS	He (1.2 ml min <sup>-1</sup> )	22.5	1-5	2.5-10	S/N	[474]
BSTFA (30 min)	DB-5MS	He (1.2 ml min <sup>-1</sup> )	40.1	1-5	n.d.	n.d.	[475]
BSTFA (30 min)	HP-5MS FSOT	He	31.9	n.d.	n.d.	n.d.	[476]
BSTFA + 10% TMCS (180 min)	DB5-HT	He (0.9 ml min <sup>-1</sup> )	34.2	1.5-84	n.d.	S/N	[167]
MSTFA (30-40 min)	HP-5MS	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	32.5	0.3-9.0(surface)	n.d.	S/N	[172]
Pyridine + BSTFA (1% dimethylchlorosilane) (15 min)	Pursuit DB-225MS	He (4.5 ml min <sup>-1</sup> )	128	0.1-10 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[484]
Pyridine + BSTFA (1% dimethylchlorosilane) (15 min)	Pursuit DB-225MS	He (4.5 ml min <sup>-1</sup> )	128	0.28-0.3 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[485]
Pyridine + BSTFA (1% dimethylchlorosilane) (15 min)	Pursuit DB-225MS	He (4.5 ml min <sup>-1</sup> )	128	0.03-3.21 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[486]
1) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10%) + Acétone avec PFBBr (5%) (60 min); 2) TMSI (30 min)	HP-5MS	He (1.2 ml min <sup>-1</sup> )	22.5	0.10-0.28	n.d.	S/N	[487]
ACN + TEA:ACN (5:95, v/v) + chlorure de pentafluorobenzoyl (180 min)	HP-5MS	He	15.7	0.03-0.2 (souterraine)	n.d.	S/N	[159]
MSTFA (100 min)	BP-5	He	58	n.d.	3-6 (usée)	S/N	[488]
BSTFA + pyridine (25 min)	HP-5 MS	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	70.3	4.0-17	n.d.	S/N	[489]
PFPFA (20 min)	HP-5MS	He	28	0.02-0.5 pg (1 µL d'injection) (surface)	0.08-0.32 (surface)	S/N	[468]
MSTFA+ NH <sub>4</sub> I + éthanethiol (60 min)	BPX-5	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	18.8	n.d.	0.25 (Milli-Q)	point le plus faible de la gamme linéaire	[490]
BSTFA (30min)	HP-5 (30 m)	He (1 ml min <sup>-1</sup> )	25	0.3	n.d.	3*ET (blanc, n=10)	[480]

<i>Dérivatisation</i>	<i>Colonne</i>	<i>Phase mobile</i>	<i>Temps d'analyse (min)</i>	<i>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Méthode utilisée pour LOD et LOQ</i>	<i>Référence</i>
Acide pentafluoropropionique anhydride (20 min)	DB-5MS	He	26.7 (Milli-Q)	1.6 (calculée)	5	S/N	[491]
Silanisation: SIL A (60 min)	DB-5MS	He	26.5	0.2-0.6/0.2-2.4	0.2-1.2/0.6-7.2 (calculée)	S/N	[146]
MFTSA + TMSI + DTE (1000:2:2, v/v/p) (30 min)	XTI-5	He (60 kPa)	48	0.5 (surface)/1 (Effluent)	n.d.	point le plus faible de la gamme linéaire	[136]
1) Acetone + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10%) + PFBFR (60 min); 2) TMSI (30 min)	DB5-XLB	He (30 psi)	60	0.2-0.6 (souterraine)	1 (souterraine)	t <sub>95</sub> *ET (conc. = LD estimée)	[492]
MSTFA (100 min)	BP-1	He	48	n.d.	1 (usée)	S/N	[488]
1) BSTFA (15 min); 2) Isooctane:acétone (99:1, v/v) (10 min)	BPX-5	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	67.1	n.d.	2-20	S/N	[493]
BSTFA + pyridine (25 min)	HP-5 MS	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	70.3	7.5-27.5	n.d.	S/N	[489]
sur fibre MSTFA (30 min)	BP-5	He (1.0 ml min <sup>-1</sup> )	53.5	n.d.	0.3-3.0 (Milli-Q)	S/N	[515]
	Supelcosil LC-18	H <sub>2</sub> O:ACN (65:35, v/v) + 10 mM cyclodextrine (isocratique)	30	0.22 (λ= 200nm, solvant)	n.d.	n.d.	[494]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	40	10 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[253]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	40	15 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[253]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	40	15 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[253]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	40	15-20 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[253]
	Tracer excel 120 OctaDecilSilica-A	A) H <sub>2</sub> O:ACN (90:10, v/v); B) ACN	40	0.3-1.0 (Milli-Q)	0.8-3.0 (Milli-Q)	S/N	[477]
	Supelcosil LC-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	20	0.11	0.38	S/N	[478]
	Supelcosil LC-18	H <sub>2</sub> O:ACN (65:35, v/v) + 10 mM cyclodextrine (isocratique)	30	0.44-2.30 (λ = 240nm, solvant)	n.d.	n.d.	[494]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	42	20-250	n.d.	S/N	[495]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O (A.A., 1% v/v) + KCl (0.5 g L <sup>-1</sup> ); B) ACN	35	70 (surface)	200 (surface)	courbe d'étalonnage	[516]
	Hypersil ODS	ACN + 0.02 mol L <sup>-1</sup> tampon phosphate (45:55, v/v; pH 4.5)	12	6-100	20-350	S/N	[473]

<i>Dérivatisation</i>	<i>Colonne</i>	<i>Phase mobile</i>	<i>Temps d'analyse (min)</i>	<i>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Méthode utilisée pour LOD et LOQ</i>	<i>Référence</i>
	LiChrosorb RP18	H <sub>2</sub> O (10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ): MeOH (55:45, v/v)	30	283-313 (Milli-Q)	n.d.	t <sub>99</sub> *ET (n=8; conc. = LD estimée)	[496]
En ligne, pré colonne: FBIBT dans DMSO	Luna Phenyl-hexyl	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) ACN	15	0.07-0.67	0.233-0.95	sb/slope	[517]
	Betacil C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	16	0.07-0.18	0.6-0.23	S/N	[498]
	Lichrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	30	20-500 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[177]
	Lichrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	43	90-100	n.d.	S/N	[499]
	Lichrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	51	90-200	n.d.	S/N	[499]
	Zorbax Eclipse XDB C18	A) H <sub>2</sub> O (F.A., pH = 3.4); B) ACN	34.5	0.2-4.3 (Milli-Q)	n.d.	S/N	[179]
	Luna column C18	A) H <sub>2</sub> O (A.A., 10 mM); B) MeOH:ACN (1:3, v/v)	20	200	600 (calculée)	S/N	[491]
	Inertsil ODS-3	H <sub>2</sub> O:ACN (55:45, v/v)	50	1.8	5.4	S/N	[514]
	Synergi Hydro-RP	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	65	0.1/n.d./1.2/1.1/2.4	n.d.	S/N	[112]
	Zorbax Extend-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN; C) 100 mM TEA dans H <sub>2</sub> O (pH 12.2)	17	0.1-1.5	0.5	S/N	[149]
	Zorbax SB-C18	A) H <sub>2</sub> O (0.1% NH <sub>4</sub> OH v/v); B) MeOH (0.1% NH <sub>4</sub> OH v/v)	7.0	0.1-1.0	0.3-3.1	S/N	[500]
	ACQUITY BEH C18	A) H <sub>2</sub> O (0.1% A.A. v/v); B) ACN	5.6	0.02-0.20/0.03-0.4/0.1-1.2	n.d.	S/N	[163]
Chlorure de dansyle	Luna C18	A) ACN (A.A., 5mM, pH 6.80, 95:5, v/v) B) ACN (A.A., 5mM, pH 6.80, 75:25, v/v)	25	0.038-0.13	0.2	t <sub>99</sub> *ET (faible conc. n=10)	[323]
	Purospher STAR-RP-18e	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	20	1.13-7.55	3.0-20	S/N	[170]
	Purospher STAR-RP-18e	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) ACN	20	0.39-3.59	1.0-9.5	S/N	[170]
	ACQUITY BEH C8	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	10	0.3-0.6	n.d.	3*ET (point min. de la courbe)	[501]
	Symmetry C18	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) ACN; C) MeOH	25	0.6	n.d.	3*ET (blanc, n=10)	[480]
	NUCLEODUR C-18 ISIS	A) ACN; B) H <sub>2</sub> O (A.A., 10mM)	21	0.3-2.0	1.0-6.0	S/N	[502]

<i>Dérivatisation</i>	<i>Colonne</i>	<i>Phase mobile</i>	<i>Temps d'analyse (min)</i>	<i>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Méthode utilisée pour LOD et LOQ</i>	<i>Référence</i>
En ligne, pré colonne: chlorure de dansyle + tampon carbonate	SunFire C18	A) H <sub>2</sub> O:ACN (20:80 v/v, 0.1% F.A.)	13	0.4-0.7	1.0	S/N	[325]
	ACQUITY BEH C18	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	10	0.5-2.8	1.0	n.a.	[178]
	ACQUITY BEH C18	A) H <sub>2</sub> O (0.1% ammonia v/v + 15 mM acétate d'ammonium); B) MeOH (0.1% ammonia v/v + 15 mM acétate d'ammonium)	9	0.9-1.3 (Milli-Q)	2.3-4.3 (Milli-Q)	S/N	[252]
	Pursuit XRs Ultra-C18	A) H <sub>2</sub> O (0.1% F.A. v/v + 15 mM A.A.); B) MeOH (0.1% F.A. v/v + 15 mM A.A.)	10	2.6-5.7	n.d.	(IDL*100)/(R%*FC)	[503]
	Synergi RP-MAX	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	35	0.6-2.4/1.2-11	2-15/4-35	S/N	[275]
	Hypersil GOLD™	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) MeOH	11	3-50 (surface)	n.d.	3*ET (n=7; conc. = LD estimée)	[98]
	Kromasil 100 C18	A) H <sub>2</sub> O (A.A., pH = 2.8); B) ACN	32	50-100 (effluent)	150	S/N	[504]
	Xbridge Waters C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	15	n.d.	0.4-1.2/0.4-1.2/1.0-3.0	S/N	[505]
	Gemini C18	A) H <sub>2</sub> O (0.1% NH <sub>4</sub> OH); B) MeOH (0.1% NH <sub>4</sub> OH)	16	0.1-0.2/0.1-0.2	n.d.	S/N	[506]
1) Bromure de PFB + ACN (5:95%; v/v); 2) KOH + éthanol (8:1000 p/v) (30 min)	YMCbasic	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	20	18.52 fmol	n.d.	S/N	[471]
	LC-18 Alltima	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	30	0.1-0.4/0.8-1.1/0.2-7	n.d.	S/N	[143]
	Purospher STAR-RP-18e	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	32	0.4-2.0 (usée)	n.d.	S/N	[18]
	BetaBasic C18	A) H <sub>2</sub> O + 10 mM N-methylmorpholine, pH = 9.6; B) ACN	13.5	0.78-7.65 (surface)/1.31-7.22 (effluent)	1.57-4.30 (surface)	S/N	[164]
Chlorure de dansyle	ACQUITY BEH C18	A) H <sub>2</sub> O (10mM F.A., pH = 2.9); B) ACN	2.3	0.56-0.91 (surface)/0.31-0.52 (effluent)	n.d.	S/N	[271]
	Hypersil BDS C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	25	1-2	n.d.	S/N	[292]
	Purospher STAR-RP-18e	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	45	0.07-0.38 (Milli-Q)	0.18-1.02 (Milli-Q)	S/N	[324]
	Zorbax Eclipse XDB C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	22	0.01-0.80 (souterraine)	n.d.	S/N	[507]

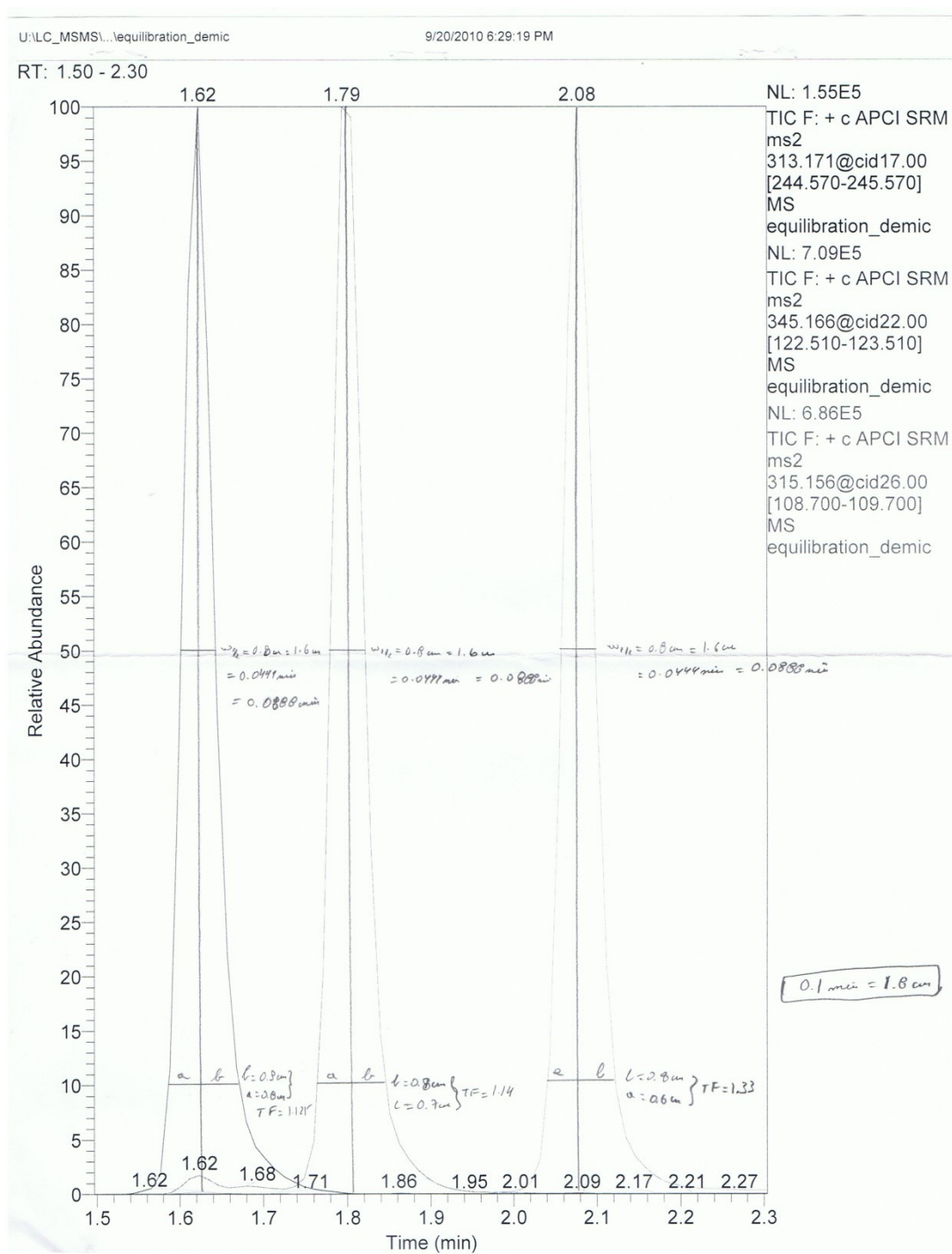
Dérivatisation	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse (min)	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Méthode utilisée pour LOD et LOQ	Référence
	LC Packings PepMap100	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) ACN (F.A., 0.1%)	5	n.d.	1	10*ET (blanc)	[508]
	ZORBAX Extend-C18	A) H <sub>2</sub> O (0.05% TrBA, pH = 10.5); B) ACN:MeOH (66:34, v/v)	15.1	100 (LDI)	31-46/22-162	t <sub>99</sub> *ET (n=7; conc. = LD estimée)	[161]
	Acquity UPLC BEH C18	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) MeOH (F.A., 0.1%)	8.1	0.01-0.30/0.04-0.60/0.16-0.5	n.d.	S/N	[509]
	BEH C18	A) F.A. (0.3%) dans H <sub>2</sub> O; B) ACN:MeOH (2:1, v/v)	6.5	8.8/0.8/1.4	n.d./2.6-7.6/4.6-4.7	t <sub>99</sub> *ET (n=5-7; conc. = LD estimée)	[510]
	Luna column C18	A) H <sub>2</sub> O (A.A., 10 mM); B) MeOH:ACN (1:3, v/v)	20	6.6 (calculée)	20	S/N	[491]
	Alltima C-18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	24	n.d.	0.008-0.03/0.2-1.0/0.2-0.9	S/N	[139]
	Acclaim® PA2	A) H <sub>2</sub> O (0.001% A.A.); B) ACN	29	0.1/0.5/0.5/0.5	1.0-2.0/1.0-5.0/1.0-5.0/1.0-2.0	S/N	[322]
	Kinetex XB-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH; C) ACN	10	0.15-0.95 (Milli-Q)	0.25-2.0 (Milli-Q)	S/N (LOD), point le plus faible de la gamme linéaire (LOQ)	[320]
	Synergi™ Hydro-RP	A) H <sub>2</sub> O (A.A.); B) MeOH (A.A.)	15	0.2-1.0	0.6-3.0 (calculée)	S/N	[511]
	Synergi Max-RP C12	A) F.A. (0.1%) dans H <sub>2</sub> O; B) MeOH	21	1.0	n.d.	IDL[(t <sub>99</sub> *ET (n=9; conc. = LD estimée)]/FC	[329]
	C18 Luna	A) H <sub>2</sub> O:ACN (A.A., 1 mM); B) ACN	28	1.0 (surface)	4.0 (surface)	S/N	[469]
	RP-C8 Hypersil MO5	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	45	n.d.	n.d./n.d./0.2/1.0	S/N	[512]
	Waters Acquity C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	12	5 (usée)	0.01 (calculée)	S/N	[18]
	Inertsil ODS-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	20	250	100	S/N	[286]
	RP-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	35	40-70	n.d.	t <sub>99</sub> *ET (n=7; conc. = LD estimée)	[513]
	Alltima-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) MeOH	45	5.6-78.1 (Milli-Q, cigarette)	n.d.	S/N	[300]
	Inertsil ODS-C18	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	20	5000	50000	S/N	[286]
	ACQUITY BEH phenyl	A) H <sub>2</sub> O; B) ACN	7	1400-1700/800-2700	5000-10 000	n.a.	[470]
	LiChrospher 100 RP-18	A) H <sub>2</sub> O (A.A., 1% v/v) + KCl (0.5 g L <sup>-1</sup> ); B) ACN	35	400-700 (surface)	1000-2000 (surface)	courbe d'étalonnage	[516]

<i>Dérivatisation</i>	<i>Colonne</i>	<i>Phase mobile</i>	<i>Temps d'analyse (min)</i>	<i>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Méthode utilisée pour LOD et LOQ</i>	<i>Référence</i>
1) BSTFA (15 min); 2) Isooctane:acétone (99:1, v/v) (10 min)	CP-Sil 8 CB	He (1.5 ml min <sup>-1</sup> )	67.1	n.d.	2-10	S/N	[493]

## **Annexe 3**



Équations pour le calcul des paramètres chromatographiques selon les données recueillis sur les chromatogrammes (exemple ci-dessous) :



1) *Résolution ( $R_s$ ):*

$$R_s = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (w_{b1} + w_{b2})$$

2) *L'asymétrie des pics (tailing factor, TF) :*

$$TF = b/a \text{ (à 10\% de la hauteur du pic)}$$

3) *Nombre de plateaux ( $N_{th}$ ) :*

$$N_{th} = 41.7 [(t_r/w_{0.01})^2 / (TF + 1.25)]$$

4) *Temps mort ( $t_0$ , min) :*

$$t_0 = V_m / F, \text{ avec } V_m = 3.14(d_c/2)^2 \times 2 \times \text{porosité}$$

5) *Facteur de capacité ( $k'$ )*

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Définition des termes des équations 1) à 5)

$t_r$  = temps de rétention (min)

$a$  et  $b$  = distances horizontale à 10% de la hauteur de chaque côté du centre du pic

$w$  = largeur du pic à la base calculer de  $w_{1/2}$  (largeur à la mi-hauteur du pic,  $w = 2 \times w_{1/2}$ )  
(min)

$V_m$  = volume mort (mL)

$F$  = débit de la phase mobile (mL min<sup>-1</sup>)

$d_c$  = diamètre interne de la colonne

## **Annexe 4**

Définition des acronymes pour les sources d'ionisation ambiantes de la **Figure 1-26** avec l'année à laquelle elles ont été présentées ainsi que la technique dont elle découle pris de [281].

**Table 1** Summary of major ambient MS techniques known to date, in chronological order

Acronym	Description	Basic technique <sup>a</sup>	Year	Key ref.
SESI	Secondary electrospray ionization	SESI	2000 <sup>b</sup>	[51]
DESI	Desorption electrospray ionization	ESI	2004	[24]
DART	Direct analysis in real time	GDI	2005	[92]
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	(AP)CI	2005	[86]
FD-ESI	Fused-droplet ESI	ESI	2002	[59]
DAPCI	Desorption atmospheric pressure chemical ionization	APCI (GDI) <sup>d</sup>	2006	[89]
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization	SSI	2006	[127]
EESI	Extractive electrospray ionization	ESI	2006	[58]
ELDI	Electrospray-assisted laser desorption ionization	ESI/LDI	2006	[76]
MALDESI <sup>f</sup>	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	MALDI + ESI	2006	[77]
ND-EESI	Neutral desorption EESI	ESI	2007	[72]
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photon ionization	APPI	2007	[120]
PADI	Plasma-assisted desorption/ionization	GDI	2007	[110]
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization	GDI	2007	[111]
LAESI	Laser-assisted ESI	LDI + ESI	2007	[128]
FA-APGDI	Flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge	GDI	2008	[109]
IR-LADESI	Infrared laser-assisted desorption ESI	LDI + ESI	2008	[129]
LTP	Low-temperature plasma ionization	PD	2008	[102]
PSI	Paper spray ionization	ESI	2010	[74]
V-EASI	Venturi easy ambient sonic-spray ionization	V-EASI	2010	[145]

## Reference List

Aboufadel, K., et al. "Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products, feminizing hormones and pesticides." Chem.Cent.J. 4 (2010): 10.

Auriol, M., et al. "Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge." Process Biochemistry 41.3 (2006): 525-39.

- Baronti, C., et al. "Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water." Environ.Sci.Technol. 34.24 (2000): 5059-66.
- Besse, J. P. and J. Garric. "Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment." Environ.Pollut. 157.12 (2009): 3485-94.
- Glaser, J. A., et al. "Trace analyses for wastewaters." Environ.Sci.Technol. 15.12 (1981): 1426-35.
- Han, J., et al. "Capturing hormones and bisphenol A from water via sustained hydrogen bond driven sorption in polyamide microfiltration membranes." Water Res. 47.1 (2013): 197-208.
- Havens, S. M., et al. "Stability, preservation, and quantification of hormones and estrogenic and androgenic activities in surface water runoff." Environ.Toxicol.Chem. 29.11 (2010): 2481-90.
- Long, G. L. and J. D. Winefordner. "Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition." Anal.Chem. 55.7 (1983): 712A-24A.
- Vanderford, B. J., et al. "Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Anal.Chem. 75.22 (2003): 6265-74.