

Université de Montréal

**Développement d'une méthode multi-résidu pour l'analyse de contaminants émergents
dans des échantillons solides et liquides à partir de la spectrométrie de masse à haute
résolution**

Par

Simon Comtois-Marotte

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

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

Avril 2016

© Simon Comtois-Marotte, 2016

Résumé:

L'analyse des contaminants émergents (ECs) suscite l'intérêt de la communauté scientifique, de sorte que plusieurs études ont rapporté leur présence dans les eaux usées et dans les eaux de surface. Toutefois, la plupart des études ont concentré leurs travaux principalement sur la phase dissoute, si bien que la concentration des ECSs dans les particules en suspension (SPM – *suspended particulate matter*) demeure peu connue. De plus, la plupart des méthodes traitant l'analyse des ECs sont basées sur le couplage de la chromatographie liquide couplée à un triple quadripôle (QqQ). Typiquement, ces QqQ fonctionnent à basse résolution, augmentant ainsi la probabilité d'obtenir des faux positifs. Afin de diminuer le taux de faux positifs un nouveau protocole permettant l'analyse de 31 ECs dans la fraction dissoute et la fraction solide a été développé à l'aide de la spectrométrie de masse à haute résolution. De plus, un dépistage du potentiel estrogénique par des levures a été effectué. Cela représente l'un des premiers rapports décrivant les concentrations en ECs dans les eaux usées et les SPM combiné avec un dépistage du potentiel estrogénique.

La séparation des particules en suspension a été réalisée via la filtration des échantillons liquides. Les ECs ont été extraits de la fraction solide à l'aide d'ultrasons en utilisant du MeOH : ACN (1:1, v/v) avec l'ajout de 1% de HCOOH. Par la suite, l'extrait de la fraction solide et de la phase aqueuse ont été soumis à la SPE (*solid phase extraction* – extraction sur phase solide) à l'aide d'une cartouche polymérique composé d'acide benzènesulfonique. Une colonne de type C-18 a été utilisée pour séparer les ECs sélectionnés. Un spectromètre de masse de haute résolution (Q-Exactive), constitué d'un quadripôle et d'une trappe ionique orbitale à haute résolution a été utilisé en mode balayage (*FS, full scan*) avec une résolution de 70 000 FWHM (FWHM– Largeur à mi-hauteur, *Full width at half maximum*) à m/z 200 pour l'analyse de la fraction solide et en mode suivi des réactions parallèles (*PRM, Parallel reaction monitoring*) à 17 500 FWHM à m/z 200 pour la fraction liquide. Une ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric pressure chemical ionisation*) en modes positif et négatif a été utilisée. La méthode a été appliquée sur des échantillons réels afin de déterminer non seulement la portion d'ECs sur les SPM, mais également leur devenir dans le traitement des eaux usées jusqu'à leur déversement dans les

eaux réceptrices. La récupération des composés d'intérêt a été de 27 à 102 % et de 43 à 122%, pour la fraction solide et liquide respectivement. Les limites de détections se situaient entre 0.5 à 104 ng L⁻¹ et de 0.3 à 2.3 ng g⁻¹. Les courbes d'étalonnages dans les matrices d'eaux usées et les solides ont montré une bonne linéarité ($R^2 > 0.991$) pour les analytes cibles ainsi qu'une précision acceptable avec des coefficients de variation inférieurs à 25%.

Mots clés : Contaminants émergents, Spectrométrie de masse à haute résolution, Analyse multi-résidus, Chromatographie liquides, extraction sur phase solide.

Abstract:

The trace analysis of emerging contaminants (ECs) is gaining more interest and several studies have widely reported their occurrence in waste and surface water. However, most studies found in the literature reported concentrations only in the dissolved phase often without considering the suspended particulate matter (SPM). Moreover, most of the methods dealing with the analysis of ECs are based on liquid chromatography tandem mass spectrometry with a triple quadrupole (QqQ). The majority of QqQ operate at low resolution, thus increasing the possibility of false positive identification. The current study presents a new protocol to quantify 31 emerging contaminants not only in the effluent wastewater, but also from SPM of municipal wastewater samples using high-resolution mass spectrometry, an improvement to reduce false positives. Furthermore, Yeast estrogen screen assay (YES-assay) adapted from direct measurement of estrogenic activity was tested on filtered wastewater samples. This represents one of the first reports describing ECs in wastewater and SPM with direct measurement of estrogenic activity.

The separation of suspended particulate matter was realized using filtered water samples. The ECs were extracted from the matrix by sonication using MeOH:ACN (1:1, v/v) with 1% HCOOH. Thereafter, the extracts of the solid fraction and the aqueous phase were subjected to an off-line solid phase extraction (SPE) with a Strata-X-C cartridge to concentrate and clean-up the extracts. A C18 chromatography column was used to separate ECs. A Q-Exactive mass spectrometer, which combines a quadrupole analyser with a high resolution orbital ion trap (OrbitrapTM) was used in full scan (FS) mode with 70 000 FWHM (Full width at half maximum) at m/z 200 for analysis of the solid fraction, while analysis of the liquid fraction was realised using parallel reaction monitoring (PRM) with 17 500 FWHM at m/z 200. An APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) source in positive and negative mode was used for the ionization of target compounds. The method was successfully applied to real samples allowing us to determine the proportion of ECs in suspended particulate and the fate of the selected ECs during wastewater-treatment processes and their release into receiving surface waters. Recoveries of target compounds ranged from 27 to 102 % and from 43 to 122 % for the liquid and the solid fraction respectively. The limits of detection ranged

from 0.5 to 104 ng L⁻¹ and from 0.3 to 2.3 ng g⁻¹. Calibration curves in wastewater and solid matrix showed good linearity ($R^2 > 0.991$), for all target analytes, and precision (intraday and interday) showed coefficients of variation below 25%.

Keywords: Emerging contaminants, High-resolution mass spectrometry, Multi-residue analysis, Liquid chromatography, solid phase extraction.

Table des matières

RÉSUMÉ:	II
ABSTRACT:	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTES DES FIGURES	IX
LISTES DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	XI
REMERCIEMENTS :	XIV
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	3
1.1 OBJECTIF DU PROJET DE MAÎTRISE	4
1.2 STRUCTURE DU MÉMOIRE DE MAÎTRISE	5
1.3 PRINCIPALES CATÉGORIES DE CONTAMINANT ÉMERGENTS.....	6
1.3.1 <i>Produits pharmaceutiques et de soins personnels</i>	6
1.3.2 <i>Drogues illicites</i>	7
1.3.3 <i>Pesticides</i>	9
1.3.3 <i>Contaminants émergents sélectionnés pour l'étude</i>	10
CHAPITRE 2. DESCRIPTION DES MÉTHODES COURAMMENT UTILISÉES POUR LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	21
2.1 EXTRACTION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES (MAE)	24
2.2 EXTRACTION ASSISTÉE PAR ULTRASONS (UAE)	25
2.3 DISPERSION DE LA MATRICE SUR PHASE SOLIDE (MSPD).....	25
2.4 EXTRACTION LIQUIDE SOUS PRESSION (PLE).....	26
2.5 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE (LLE).....	26
2.6 MICRO-EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPME).....	26
2.7 POLYMÈRES À EMPREINTES MOLÉCULAIRES (MIPs).....	27
2.8 EXTRACTION SUR BARREAU D'AGITATION (SBSE)	27
2.9 EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE)	28
CHAPITRE 3. INSTRUMENTS COURAMMENT UTILISÉS POUR L'ANALYSE DE CONTAMINANTS ÉMERGENTS	30
3.1 COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	30
3.2 SOURCES D'IONISATION	32
3.3 ANALYSEURS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE	34
3.4 SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION.....	36
.....	37

CHAPITRE 4. L'ANALYSE DE CONTAMINANTS ÉMERGENTS PRÉSENTS DANS DES ÉCHANTILLONS SOLIDES ET LIQUIDES PAR L'ENTREMISE DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION.41

ABSTRACT	43
4.1. INTRODUCTION	43
4.2. MATERIALS AND METHODS.....	48
4.2.1. <i>Sample Collection and preparation</i>	48
4.2.2. <i>Chemicals and reagents</i>	49
4.2.3 <i>Ultrasonic Solvent extraction</i>	50
4.2.4 <i>Solid phase extraction</i>	50
4.2.5 <i>LC parameters</i>	51
4.2.6 <i>HRMS parameters</i>	51
4.2.7 <i>Data analysis and method validation</i>	52
4.2.8 <i>Yeast estrogen screen assay</i>	54
4.2.9 <i>Statistical analysis</i>	55
4.3. RESULTS AND DISCUSSION	55
4.3.1 <i>Sample filtration</i>	55
4.3.2 <i>Extraction and clean-up procedure</i>	56
4.3.3 <i>LC parameters</i>	58
4.3.4 <i>HRMS optimization</i>	59
4.3.5 <i>Data analysis and validation</i>	61
4.3.6 <i>Application of chemical analytical methods to real samples</i>	63
4.3.7 <i>Evaluation of YES Assay on real samples</i>	68
4.3.7.1 <i>Method validation</i>	68
4.3.8 <i>Application of YES-assay to real wastewater samples</i>	69
4.4. CONCLUSION.....	72
ACKNOWLEDGEMENTS.....	72
CHAPITRE 5. CONCLUSION.....	87
RÉFÉRENCES.....	90

Liste des tableaux

Table 2-1. Récapitulatifs des différentes méthodes d'extraction/d'enrichissent, ainsi que les méthodes analytiques couramment employé pour l'analyse des composés sélectionnés pour cette études.....	23
Table 2-1. (Suites)	24
Table 4-1. Physicochemical properties of the studied compound.	46
Table 4-2. Method validation parameters for the selected MS modes for each matrix including coefficient correlation (R^2), the MLD, the recovery and the matrix effect.	62
Table 4-3. Mean concentration and standard deviations of the selected CECs in surface waters (n=6), in the effluents of two municipal wastewater treatment plant in Quebec (i.e WWTP-1 (n=19) and WWTP-2 (n=20)) for a period of five months, the corresponding SPM and nearby sediments (n=6). ...	64
Table 4-4. Spearman's correlation coefficient between YES-assay and chemical analysis (*P<0.1; **P<0.05; ns = none significant).....	71
Table S1. Average physicochemical analysis of the wastewater matrix for the year 2013.....	74
Table S2. Parameters for FS and MS ² detection.....	75
Table S3. Accuracy (%), and method intra-day / inter-day precision of selected compounds measured at two different concentration levels for each matrix on the selected MS mode.	76
Table S4. Recovery values (mean \pm SD, n=4) on different filter materials.	77
Table S5. MS ² optimized parameters for the analysis of selected steroid hormone with a TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer.	78
Table S6. Average logarithms of solid water distribution coefficients, K_d of selected compounds in WWTP-1(n=19) and WWTP-2 (n=20) over a period of five months. Values in parentheses represent standard deviation (SD).	79

Listes des figures

Fig. 1-1. Structure des hormones stéroïdiennes sélectionnées.	12
Fig. 1-2. Structure des drogues illicites sélectionnées pour le projet de maîtrise.....	13
Fig. 1-3. Structure des pesticides sélectionnés pour le projet de maîtrise.	14
Fig. 1-4. Structure des marqueurs d'une contamination anthropique des eaux de surface sélectionnée pour le projet de maîtrise.	15
Fig. 1-5. Structure des marqueurs des produits de soins personnels sélectionnés pour le projet de maîtrise.	16
Fig. 1-6. Structure des marqueurs des produits de soins personnels sélectionnés pour le projet de maîtrise.	16
Fig. 1-7. Structure de la fluoxétine, du venlafaxine et de la desvenlafaxine sélectionnés pour le projet de maîtrise.....	17
Fig. 1-8. Structure du diazépam et de l'oxazépam préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.	18
Fig. 1-9. Structure du diclofénac et de la carbamazépine préalablement sélectionnée pour le projet de maîtrise.....	19
Fig. 1-10. Structure du tamoxifène préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.....	19
Fig. 1-11. Structure du Fentanyl et du Norfentanyl préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.	20
Fig. 2-1. Phase Stata X-C.....	29
Fig. 3-1. Ionisation à pression atmosphérique par ionisation chimique (APCI)	34
Figure 3-2. Spectromètre de masse en tandem (MS/MS) effectué à partir d'un QQQ	35
Figure 3-3. Spectre de masse de la caféine en mode balayage à un pouvoir de résolution de 70 000 FWHM (m/z 200)	37
Figure 3-4. Analyseur Orbitrap.....	39
Figure 3-5. Spectre de masse de la caféine en mode PRM à une résolution de 17 500 FWHM (m/z 200).....	40

Figure 4-1. Solid particulate matter sorption coefficient (K_d) in wastewater are illustrated using box plots with $n=39$. The center horizontal lines marks the median of the samples, the length of each box shows the range within 75% of the values fall, and the whisker represent the limits of the inner fence and outliers are shown as asterisks. 66

Figure 4-2. Comparison of concentrations of progesterone (PRO) and testosterone (TES) in wastewater effluents measured using a Q-Exactive orbital ion trap (QE) in t-MS² mode and a TSQ-Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (QQQ) illustrated using box plots with $n=39$. The center horizontal lines marks the median of the samples, the length of each box shows the range within 75% of the values fall, and the whiskers represent the maximum and the minimum. 68

Figure 4-3. Estradiol equivalent concentrations measured with YES-assay for wastewater effluents (ng L^{-1}) in WWTP-1 and WWTP-2 for a period of 5 months. 64

Figure S-1. LC gradient..... 74

Figure S-2. Chromatogram of E2 at 50 ng L^{-1} in wastewater effluent matrix on t-MS² (17,500 FWHM at m/z 200) (a) and FS (70, 000 FWHM at m/z 200) (b)..... 80

Figure S-3. Chromatogram of E2 at 20 ng g^{-1} in SPM matrix t-MS² (17,500 FWHM at m/z 200) (a) and FS (70, 000 FWHM at m/z 200) (b). 81

Figure S-4. Chromatogram of E3 at 20 ng g^{-1} in SPM matrix FS (70, 000 FWHM at m/z 200) negative (a) and positive (b). 81

Figure S-5. Chromatogram of MP at 20 ng g^{-1} in SPM matrix on FS (70, 000 FWHM at m/z 200) negative (a) and positive (b). 82

Figure S-6. CECs concentrations in wastewater effluents (ng L^{-1} , Log Scale) in WWTP-1 (left) and WWTP-2 (right) for a period of 5 months. Data points represent average concentration values ($n=2$). For 89% of the average values, the RSD values where $< 25\%$ 83

Figure S-7. CECs concentration on the SPM (ng g^{-1} , Log Scale) in WWTP-1(left) and WWTP-2 (right) for a period of 5months. Data points represent average concentration values ($n=2$). For 64% of the average values, the RSD values where $< 25\%$ 84

Figure S-8. Dose response curves of yeast strain BJ3505, hER; estrone (E1), 17β -estradiol (E2), estriol (E3) and 17α -ethinylestradiol (EE2)..... 85

Figure S-9. Linear regression showing the linearity zone of the measurement among calculated concentration and the ligand concentration of 17β -estradiol (E2)..... 86

Listes des abréviations, des sigles et des acronymes

Les mots dans la langue anglaise sont indiqués entre parenthèses en italique.

4-MMC	Méphédronne
4-MP	4-méthylephedrine
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (<i>Atmospheric pressure chemical ionisation</i>)
ATZ	Atrazine
CAF	Caféine
BPA	Bisphénol A
BZE	Benzoylécgonine
CBZ	Carbamazépine
CECs	Contaminants d'intérêt émergents (<i>Contaminants of emerging concern</i>)
CHO	Cholestérol
COC	Cocaïne
COP	Coprostan-3-ol
DES	Desvenlafaxine
DCF	Diclofénac
DIA	Diazépam
ECs	Contaminants émergents (<i>Emerging contaminant</i>)
E1	Estrone
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -éthinyloestradiol
E3	Estriol
ESI	Ionisation par électronébulisation (<i>Electrospray ionisation</i>)
DCF	Diclofénac
DEA	Déséthylatrazine

DES	Desvenlafaxine
F.A	Acide formique (<i>formic acid</i>)
FEN	Fentanyl
FLUO	Fluoxetine
FWHM	Largeur à mi-hauteur (<i>Full width at half maximum</i>)
FS	Mode balayage (<i>Full scan</i>)
GC	Chromatographie gazeuse (<i>Gas chromatography</i>)
HCD	Cellule de dissociation à énergie supérieure de collision (<i>Higher energy collisional dissociation cell</i>)
HRMS	Spectromètres à haute résolution (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
LC	chromatographie liquide (<i>liquid chromatography</i>)
LOEC	Plus petite concentration où un effet est observable (<i>Lowest observed effect concentration</i>)
LEVO	Levonorgestrel
LLE	Extraction liquide-liquide (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
Kd	Coefficient de partage
Kow	Coefficient de partage octanol-eau
MAE	Extraction assistée par microonde
MDMA	3,4-méthylènedioxy-méthamphétamine
MIPs	Extraction par des polymères à empreintes moléculaires
MLD	Method limit of detection
MLQ	Method limit of quantification
MP	Méthylparabène
MSPD	Dispersion de la matrice sur phase solide
m/z	rapport masse sur charge

MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass spectrometry</i>)
MS ²	Spectrométrie de masse en tandem (<i>Tandem mass spectrometry</i>)
NOR	Norfentanyl
NORE	Norethindrone
OXA	Oxazépam
PLE	Extraction liquide sous pression
PPCPs	Produits pharmaceutiques et de soins personnels (<i>Pharmaceuticals and personal care products</i>)
PRM	Suivi des réactions parallèles (<i>Parallel reaction monitoring</i>)
PRO	Progestérone
QqQ	Triple quadripôle (<i>Triple quadruple</i>)
SBSE	Extraction sur barreau d'agitation
SMX	Sulfaméthoxazole
SPE	Extraction sur phase solide (<i>Solid phase extraction</i>)
SPM	Particules en suspensions (<i>Suspended particulate matter</i>)
SPME	Microextraction sur phase solide
SRM	Selective reaction monitoring
TES	Testostérone
TAM	Tamoxifen
UAE	Extraction assistée par ultrason
V _{DC}	Tension continue
VEN	Venlafaxine
V _{RF}	Tension alternative
YES	Test de dépistage du potentiel estrogénique par une levure (<i>Yeast estrogen screen (YES) assay</i>)

Remerciements :

Je tiens à remercier le professeur Sébastien Sauvé, mon directeur de recherche, de m'avoir permis de poursuivre mes études aux cycles supérieurs d'autant plus sur un sujet des plus passionnant et enrichissant au sein de son groupe de recherche.

Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire, respectivement Hermann Kabore, Juan Manuel Montiel, Ken Goeury, Gabriel Munoz et Thomas Chappuis. Plus particulièrement Sung Vo Duy, pour sa précieuse collaboration, son enseignement scientifique et technique, mais également Morgan Sollicec et Audrey Roy-Lachapelle pour leur aide, mais également pour les moments et les bières partagés en franche camaraderie.

Je tiens également à remercier mes amis, Jérémie Labrecque-Carbonneau, Elizabeth-Ann Kranjec et Audrey Gosselin Janelle pour avoir partagé avec moi le café du matin et pour leurs discussions enrichissantes. Je remercie également Maxime Bergeron, pour ses commentaires et ses corrections.

Bien sûr, je remercie également ma conjointe, Alexandra Gibeault, pour sa personnalité extraordinaire, pour son support à la rédaction française et pour m'avoir épaulé durant toutes ces années d'études. Je remercie également ma famille pour leurs encouragements.

Chapitre 1. Introduction

La présence de micropolluants, polluants à faibles concentration, dans l'environnement dont une fraction de ceux-ci fait partie d'une catégorie particulière nommée contaminant d'intérêt émergent (CECs, de l'anglais *contaminants of emerging concern*), suscite de plus en plus d'inquiétudes auprès de la communauté scientifique. Ces composés de fabrication récente ou présents depuis longtemps dans l'environnement par leurs utilisations, mais nouvellement détectés (ex.; métaldéhyde (Lapworth et al., 2012a)) suite à un perfectionnement analytique, sont susceptibles de causer des effets néfastes connus ou suspectés sur la faune, la flore et la santé humaine (Fent et al., 2006; Bolong et al., 2009; Burkhardt-Holm, 2010; Sauvé and Desrosiers, 2014). Typiquement, plusieurs de ces composés ont comme caractéristiques de s'accumuler, d'être persistants dans l'environnement, d'être toxiques ou d'avoir le potentiel d'affecter l'intégrité de l'environnement (Boles and Wells, 2010). De plus, ces composés ne sont généralement pas sujets à des réglementations ou à des normes environnementales (Bolong et al., 2009; Sauvé and Desrosiers, 2014). Ainsi, ils se distinguent des «vieux» contaminants dont on dispose des informations quant au devenir environnemental, au transport et à leur toxicité (Sauvé and Desrosiers, 2014). Ce groupe de composés regroupe notamment différents pesticides (Campo et al., 2013), des produits pharmaceutiques (Rivera-Utrilla et al., 2013) des hormones, des produits cosmétiques et de soins personnels, des agents de préservations, des surfactants, ainsi que divers produits industriel. (Sauvé and Desrosiers, 2014). Parmi ces substances, certaines voient leur dégradation et leur transformation contrebalancées par leur introduction continue au sein de l'environnement (Barceló and Petrovic, 2007). Par exemple, les composés pharmaceutiques consommés qui ne sont pas entièrement éliminés par le corps sont excrétés légèrement transformés sous forme de métabolites généralement plus polaires (ex.; glucuronide) ou inchangés (Sorensen et al., 1998) et acheminés vers les stations d'épuration des eaux usées. Ces mêmes stations ne possèdent généralement pas les équipements nécessaires afin de traiter ces composés et leurs différents métabolites présents à de faibles concentrations (généralement dans la gamme des $\mu\text{g L}^{-1}$ et des ng L^{-1}). Il a ainsi

été démontré que les stations d'épuration d'eaux usées sont l'une des principales sources d'introduction de contaminants émergents dans l'environnement (Heberer, 2002; Martin et al., 2012).

1.1 Objectif du projet de maîtrise

La présence des CECs dans l'environnement est bien démontrée. Toutefois, le devenir de ces composés durant le processus de traitement des eaux usées jusqu'à leur déversement dans les eaux réceptrices est mal compris et nécessite des études plus approfondies. De plus, dans l'optique où un nombre croissant de municipalités et de communautés puisent leur source d'eau potable directement ou indirectement à partir de l'effluent des eaux usées, il est primordial de surveiller et d'être en mesure de fournir un bilan de masse raisonnable pour ensuite pouvoir établir des normes environnementales.

L'objectif de ce projet de maîtrise a été de développer et de valider une méthode multi-résidus par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution, (LC-MS) pour quantifier 31 CECs possédant un large éventail de propriétés physicochimiques. Les molécules ciblées proviennent de différentes classes thérapeutiques et sont normalement présentes dans les effluents municipaux d'eaux usées. Au vu de la complexité de la matrice à analyser et des niveaux traces des analytes à détecter, l'approche analytique demandait un travail préalable pour mettre au point une méthode de purification et de préconcentration par SPE. Ensuite, afin d'obtenir un bilan de masse raisonnable, une méthode d'extraction pour l'analyse de ces mêmes composés dans la fraction solide a été développée et validée. Ces méthodes ont ensuite été appliquées sur des échantillons d'eaux usées, échantillonnés sur une période de cinq mois provenant de deux stations d'épuration des eaux usées du Québec. Finalement, afin d'évaluer le devenir de ces composés jusqu'à leur déversement dans les eaux réceptrices, des échantillons d'eaux de surfaces, les particules en suspensions correspondantes et les sédiments sous la colonne d'eau ont également été analysés. L'intérêt de développer ces méthodes est de permettre l'analyse de plusieurs classes de contaminants organiques présents dans les fractions

liquide et solide d'effluents municipaux, et ainsi de fournir des informations importantes sur leur devenir environnemental.

1.2 Structure du mémoire de maîtrise

Ce mémoire de maîtrise débute avec une revue de la littérature des principales catégories de CECs et une courte description des composés ciblés dans le cadre de cette étude (Chapitre 1). Ensuite, une brève description des méthodes couramment utilisées pour la préparation des échantillons solides est présentée au Chapitre 2 : l'extraction assistée par micro-ondes (MAE – *microwave-assisted extraction*), par ultrason (UAE – *ultrasound-assisted extraction*), la dispersion de la matrice sur phase solide (MSPD – *matrix solid phase-dispersion*) et l'extraction liquide sous pression (PLE – *pressurized liquid extraction*). Ensuite, différentes techniques pour l'extraction et la préconcentration d'analytes dans la phase aqueuse sont présentées au chapitre 2 : l'extraction liquide-liquide (LLE – *liquid-liquid extraction*), la microextraction sur phase solide (SPME – *solid-phase microextraction*), l'extraction par des polymères à empreintes moléculaires (MIPs – *Molecular-imprinted polymers*), l'extraction sur barreau d'agitation (SBSE – *stirbar sorptive extraction*) et l'extraction sur phase solide (SPE – *Solid phase extraction*). Ensuite, le choix des méthodes d'extraction et d'enrichissement qui ont été utilisé pour le développement d'une méthode multi-résidus (présenté au Chapitre 4) sera justifié. Par la suite, une courte description de deux méthodes d'ionisation couramment utilisées en LC-MS, deux analyseurs ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS – *High resolution mass spectrometry*) seront présentés au Chapitre 3. Au Chapitre 4, les résultats portant sur le développement d'une méthode multi-résidus pour l'analyse de contaminants d'intérêts émergents présents dans les effluents municipaux, les particules en suspension, les sédiments ainsi que dans les eaux réceptrices sont présentés en format d'un article scientifique. Finalement, au Chapitre 5, une conclusion présentant une synthèse de cette étude sera présentée.

1.3 Principales catégories de contaminant émergents

1.3.1 Produits pharmaceutiques et de soins personnels

Les produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs) regroupent une panoplie de composés de différentes classes thérapeutiques (Boxall et al., 2012). Les produits pharmaceutiques (ex.; antibiotiques, anti-inflammatoires, régulateurs de lipides, analgésiques, hormones stéroïdiennes, etc.) sont développés typiquement dans l'objectif d'obtenir un effet biologique (Fent et al., 2006) afin de soigner ou de prévenir différentes maladies et infections (Sorensen et al., 1998; Boxall et al., 2012). Les PPCPs, sont pour leur part généralement conçus afin de «faciliter la vie au quotidien» (Boxall et al., 2012) et regroupent notamment différents ingrédients et constituants (ex.; filtres UV, agents de conservations) de différents produits couramment utilisés (Pietrogrande and Basaglia, 2007; Boxall et al., 2012).

Ces deux catégories de composés sont principalement acheminés vers les eaux usées municipales (Buchberger, 2011) suite à leur ingestion, leurs excrétions (pharmaceutiques) et leurs dispositions (pharmaceutiques et PPCPs) et sont typiquement sous une forme plus polaire suite à différentes transformations métaboliques. Ensuite, certains de ces composés, en fonction de leurs propriétés physicochimiques et du traitement de l'eau utilisé, seront éliminés, transformés et/ou adsorbés sur les particules et les boues d'épuration. Une majorité de ces substances sont persistantes et récalcitrantes aux traitements des eaux usées et sont ainsi déversées dans les eaux de surface (Ellis, 2006; Ying et al., 2008). Par ailleurs, plusieurs de ces substances ne sont pas facilement biodégradées dans l'environnement (Zwiener et al., 2000) et ont ainsi été détectées dans les eaux souterraines (Lapworth et al., 2012b) et dans l'eau potable (Jones et al., 2005). Toutefois, sauf exception, les concentrations en PPCPs variant de plusieurs ng L^{-1} à quelques $\mu\text{g L}^{-1}$ dans l'environnement sont largement inférieures (10^3 - 10^7) à leurs concentrations létales médianes (Fent et al., 2006). Ainsi, ces substances sont peu susceptibles de présenter un risque de toxicité aiguë, cependant des effets chroniques et synergiques sont possibles, conduisant notamment à des perturbations dans l'homéostasie hormonale en mimant l'action des hormones endogènes

par exemple. De plus, plusieurs études ont rapporté que les PPCPs n'ont pas besoin d'être persistants dans l'environnement pour causer différents effets néfastes (troubles de reproductions, résistances microbiennes) puisqu'ils sont continuellement déversés vers les eaux réceptrices (Ellis, 2006; Gros et al., 2006).

Ensuite, il faut additionner à l'usage en santé humaine, l'utilisation de différents produits pharmaceutiques pour les besoins vétérinaire ou à titre de promoteur de croissance en agriculture. En outre, l'épandage de biosolides municipaux dans l'objectif d'améliorer et soutenir la productivité des sols est une pratique courante et répandue dans plusieurs pays (Walters et al., 2010) qui peut néanmoins entraîner l'introduction de différents PPCPs et produits pharmaceutiques dans les sols (Xia et al., 2005; Sabourin et al., 2009), dans les eaux de ruissellement, et mener par la suite à une translocation et à une bioaccumulation de différents contaminants organiques dans différentes plantes (Wu et al., 2010; Sabourin et al., 2012).

1.3.2 Drogues illicites

Les drogues illicites qui regroupent notamment les opioïdes, la cocaïne, le cannabis, et les dérivés des amphétamines sont des substances psychotropes qui s'apparentent aux produits pharmaceutiques et produits de soins personnels, cependant leurs usages non médicaux sont typiquement prohibés par la loi. Ces composés sont déversés continuellement vers les eaux réceptrices (à moindres concentration) (Jones-Lepp et al., 2004; Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Boles and Wells, 2010; Metcalfe et al., 2010b; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011c, b; González-Mariño et al., 2012; Valcarcel et al., 2012; Vazquez-Roig et al., 2012; Lai et al., 2013; Pal et al., 2013; Bade et al., 2015; Hernández et al., 2015), avec une concentration maximale observée les fins de semaine, (van Nuijs et al., 2009) suite à leur consommation ou occasionnellement suite à leur disposition et leurs acheminements vers les eaux usées municipales par les laboratoires clandestins (Pal et al., 2013). Leurs concentrations sont corrélées à la quantité collectivement consommée, elles peuvent donc être utilisées pour estimer la quantité de drogues illicites consommées par la population d'une municipalité (Castiglioni et al., 2008). Il est admis, que la consommation

de drogues illicites cause de lourds dommages à la population et à l'économie (van Nuijs et al., 2011a), il existe toutefois peu de données quant à leurs effets chroniques, notamment sur les organismes aquatiques (Campo et al., 2013).

Les drogues illicites sont typiquement excrétées sous forme inaltérée ou peu changée. En effet, la cocaïne est excrétée via les selles et l'urine soit de façon inchangée (1-9%), sous forme de benzoylecgonine (35-54%) et en ecgonine methyl ester (32-49%). Pour leur part, les amphétamines sont excrétées entre 30 et 40% sous forme inaltérée (Pal et al., 2013). Il est également pertinent de mentionner qu'une augmentation du ratio cocaïne/benzoylecgonine est observée l'hiver (dans les pays du Nord) possiblement parce que la vitesse d'hydrolyse est moins rapide en eau froide (van Nuijs et al., 2009).

La persistance de certains de ces composés a été démontrée dans les sols (Pal et al., 2011). En effet, une étude a démontré qu'il n'y a pas de changements quantifiables de la concentration en méthamphétamine et en 1-benzyl-3-methylnaphthalène dans un sol aride sur une période d'un an (Pal et al., 2011). Il a également été démontré que plusieurs drogues illicites et leurs métabolites correspondants sont résistants aux traitements physicochimiques et biologiques des stations d'épurations municipales (Valcarcel et al., 2012). Toutefois, dans les eaux de surface, certaines drogues sont rapidement dégradées (van Nuijs et al., 2012), mais peuvent être considérées comme étant pseudo-persistantes, comme pour plusieurs PPCPs qui sont relâchés en continu (Rosi-Marshall et al., 2015). De cette manière, ces substances ont été détectées dans l'effluent des eaux usées (Jones-Lepp et al., 2004) et dans les eaux de surface (Zuccato et al., 2005). L'intérêt auprès de la communauté scientifique pour les drogues illicites dans l'environnement vient aussi du fait que les eaux de surface contaminées peuvent être utilisées comme source pour l'approvisionnement en eaux potables (Boleda et al., 2009). De plus, il n'existe pas de norme environnementale pour ces composés, tout en sachant que des études ont démontrées des effets néfastes comparables à ceux causés par la présence de produits pharmaceutiques (van Nuijs et al., 2011b; Pal et al., 2013).

Peu de données sont disponibles quant à la présence de drogues illicites dans l'atmosphère, toutefois ces molécules ont le potentiel de s'y trouver suite à leur consommation et leurs manipulations. En effet, il a été démontré que les drogues illicites et leurs différents métabolites correspondants sont généralement associés aux particules en suspensions dans l'air (Cecinato and Balducci, 2007; Pal et al., 2013) à des concentrations variant entre plusieurs pg m^{-3} à quelques ng m^{-3} soit à des niveaux comparables à d'autres contaminants présents dans l'air (ex.; polychlorobiphényle) (Cecinato and Balducci, 2007). Toutefois, ces concentrations sont largement inférieures à la quantité de drogue administrée correspondant à une dose quotidienne, mais l'effet chronique associé à une exposition continue peut-être associé à différents impacts néfastes pour la santé publique (Cecinato and Balducci, 2007; Pal et al., 2013).

1.3.2 Pesticides

Les pesticides sont les ingrédients et composants actifs des insecticides, des herbicides et des fongicides (Mostafalou and Abdollahi, 2013). Ces composés peuvent être classifiés selon leurs cibles, leurs modes d'action ou encore selon leurs propriétés physicochimiques (Arias-Estévez et al., 2008).

L'utilisation de pesticides a augmenté considérablement suite à la Deuxième Guerre mondiale, initialement sans connaissance de leur toxicité et sans protection adéquate lors de leurs manipulations. C'est à la fin des années 1940 que des dommages ont été répertoriés dans l'environnement (Gay, 2012). Par contre c'est uniquement suite à la publication du livre de Rachel Carson, *Silent Spring* qu'une prise de conscience a eu lieu, suite à sa démonstration que l'utilisation massive de DDT était associée à la mort et à la disparition de plusieurs espèces d'oiseaux, d'où le titre de son livre (Sauvé and Desrosiers, 2014).

Les pesticides sont conçus pour éliminer et limiter la croissance de différents organismes considérés comme nuisibles. Les pesticides sont utilisés majoritairement en zone agricole, mais également dans les zones urbaines où ces composés sont appliqués sur

différentes surfaces gazonnées (Horton et al., 2011). Il a également été démontré qu'environ 0.1% des pesticides appliqués atteignent la cible visée (Pimentel and Levitan, 1986). Par conséquent, une fois appliqué, les pesticides peuvent contaminer les sols, les produits agricoles, les eaux de surface, les eaux souterraines et l'atmosphère (Arias-Estévez et al., 2008).

L'utilisation massive et l'exposition aux pesticides sont associées à un taux élevé de différentes maladies chroniques dont différents types de cancers, de diabètes, de maladies neurodégénératives (ex., Parkinson) (Van Maele-Fabry et al., 2012) et différents troubles de reproduction (Mostafalou and Abdollahi, 2013). Des études ont également démontré que plusieurs pesticides sont bioaccumulables et persistants dans l'environnement. Par exemple, des organophosphorés ont été répertoriés dans le sang et l'urine de femmes et de nouveau-nées (Huen et al., 2012). Aussi, plusieurs pesticides organochlorés persistants, bannis depuis les années 1970 et 1980, ont été détectés dans le sérum (Neta et al., 2010; Waliszewski et al., 2012), dans les sédiments (Sarkar et al., 2008; Arienzo et al., 2015), dans les sols et dans l'air (Syed et al., 2013). Différentes études ont également montré que plusieurs pesticides peuvent s'accumuler dans différentes plantes, dans la viande (Bœufs, moutons, porcs, lapins, poisson, poulets) et dans différents produits provenant des animaux tels les produits laitiers (LeDoux, 2011).

1.3.3 Contaminants émergents sélectionnés pour l'étude

Afin d'obtenir plus d'information quant au devenir et à la présence des différentes classes de contaminants émergents précédemment décrits et sachant qu'il est impossible d'analyser toutes les molécules qui y sont rattachées, des représentants des différentes classes précédemment décrite ont été sélectionnés. Le choix des composés cibles a été effectué selon leurs fréquences d'utilisation, la disponibilité des standards, leurs toxicité, mais également selon la compatibilité de la méthode LC-MS utilisé. En effet, certains composés dont le nonylphénol qui est toxique, bioaccumulable et persistant n'était pas compatible avec la méthode d'extraction et d'enrichissement utilisé.

Plusieurs composés choisis pour cette étude sont des perturbateurs endocriniens connus ou suspectés et peuvent ainsi causer une féminisation, une réduction de la fertilité, des anomalies au niveau des organes reproducteurs et induire différents changements sur le comportement sexuel de plusieurs organismes aquatiques (ex.; poissons, grenouilles, organismes benthiques etc.) (Pal et al., 2010). Ainsi, afin d'obtenir plus d'information quant aux effets synergiques et additifs qui ne sont pas considérés lors des analyses «chimiques», des essais biologiques peuvent être utilisés pour mettre en évidence la contamination par les perturbateurs endocriniens dans les systèmes aquatiques (Dias et al., 2015). L'un des tests biologiques *in-vitro* le plus couramment utilisé est le test de dépistage du potentiel estrogénique par des levures (YES – *Yeast estrogen screen assay*) (Dias et al., 2015). Ce test biologique est effectué avec une levure génétiquement modifiée (ex.; *Saccharomyces cerevisiae*) qui contient le gène humain pour les récepteurs œstrogènes (hER) couplé à un gène reporteur (ex.; LacZ) codant pour l'enzyme β -galactosidase (Schultis and Metzger, 2004; Zubarev and Makarov, 2013). L'activation du gène pour les récepteurs oestrogènes conduit à l'expression du gène rapporteur qui permet la libération de l'enzyme en présence d'un substrat (ex.; Gal-Screen™) conduisant à une émission de lumière (Balsiger et al., 2010).

Les hormones stéroïdiennes naturelles (excrétés naturellement par les mammifères à différents niveaux, en fonction de l'âge, de l'état de santé, de l'alimentation et du sexe (Zheng et al., 2008)) ou synthétiques sont un sous-groupe des produits pharmaceutiques possédant une structure similaire au cholestérol (Ying et al., 2002). Ces composés exercent leurs effets en passant la membrane plasmique et en se liant à différents récepteurs intracellulaires (Ying et al., 2002). Ces molécules sont utilisées notamment comme contraceptifs oraux et pour le traitement hormonal substitutif. Leur présence dans l'environnement a été démontrée (Routledge et al., 1998; Ying et al., 2002; Fayad et al., 2013) et il y a une forte évidence de leurs impacts sur la physiologie de la reproduction à très faible concentration (0.1-10 ng L⁻¹) (Routledge et al., 1998; Fayad et al., 2013) ainsi que d'un risque potentiel de persistance et de bioaccumulation (Carlsson et al., 2006). Pour ces motifs, 4 estrogènes (estriol; (E3), estrone; (E1), estradiol; (E2) et 17- α -

éthynylestradiol; (EE2)), 3 progestagènes (progestérone, levonogestrel et norethindrone) et 1 androgène (testostérone) ont été sélectionnés. La **Figure 1-1** montre la structure des hormones sélectionnées.

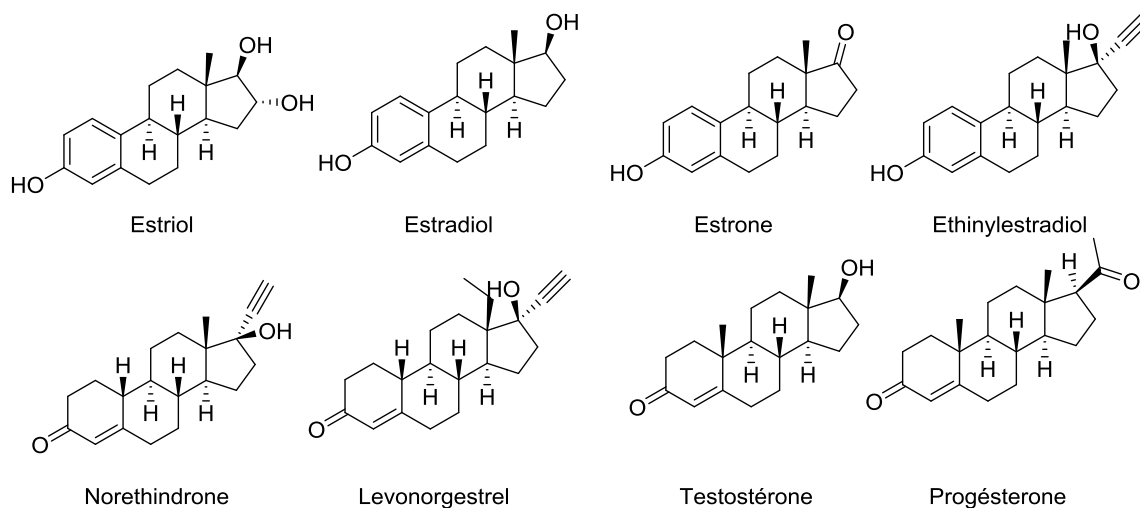


Fig. 1-1. Structure des hormones stéroïdiennes sélectionnées.

Selon le «World Drug Report 2014» de l'Office des Nations unies contre la drogue et le crime, entre 162 et 324 millions de personnes ont consommé des drogues illicites en 2012, ce qui représente de 3.5 à 7% de la population mondiale. De plus, selon ce même rapport, approximativement entre 16 et 39 millions de personnes seraient des usagers réguliers ou pris avec des problèmes de dépendance (UNODC, 2014). Les drogues illicites sont continuellement déchargées vers les eaux usées municipales où leurs éliminations sont incomplètes et sont ainsi acheminées vers les eaux réceptrices. Comme représentant des drogues illicites la cocaïne, son métabolite principal la benzoylecgonine, la méphédronne son métabolite principal la méthylephedrine, ainsi que la 3,4-méthylènedioxy-méthamphétamine (MDMA) ont été sélectionnés pour notre étude et leurs structures sont présentées à la Figure 1-2. La consommation en cocaïne a été estimée à 463 mg par jour par millier d'habitants dans une ville d'Espagne (González-Mariño et al., 2012) et est couramment détecté dans les eaux de surface (Gheorghe et al., 2008). Il a ensuite été démontré que son métabolite, le benzoylecgonine est persistant au traitement de l'eau potable (89% d'élimination) et a ainsi été détecté dans l'eau potable à une concentration

moyenne de 45 ng L⁻¹ avec un maximum observé de 130 ngL⁻¹ (Huerta-Fontela et al., 2008). La méphédronne est une nouvelle substance psychoactive qui est récemment devenue une substance de choix pour le marché des drogues illicites (Castiglioni et al., 2015). Bien que sa consommation soit largement inférieure comparativement à d'autres drogues usuelles, sa présence dans les eaux usées a été observée dans plusieurs pays dont l'Espagne (Castiglioni et al., 2015), le Royaume-Unis (Mwenesongole et al., 2013) et l'Australie (Chen et al., 2013). Finalement, la MDMA est couramment détectée en eau de surface (Huerta-Fontela et al., 2008; Zuccato et al., 2008).

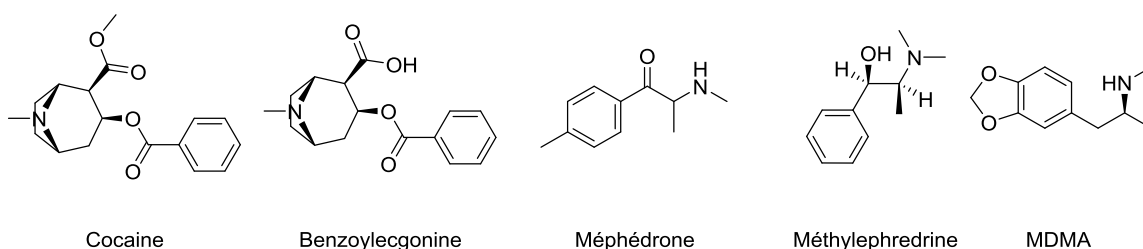


Fig. 1-2. Structure des drogues illicites sélectionnées pour le projet de maîtrise.

Pour représenter les pesticides, l'atrazine et son métabolite principal, le déséthylatrazine ont été sélectionnés pour cette étude. (Leurs structures sont présentées à la **Figure 1-3**) L'intérêt d'analyser non seulement l'atrazine, mais également l'un de ses métabolites vient du fait que selon une étude de (Kolpin et al., 2004) la fréquence de détection d'un herbicide était de 17 % lorsque celui-ci était ciblé seul, tandis que sa fréquence de détection était de 53 % lorsque ce composé et son métabolite étaient ciblés simultanément (Kolpin et al., 2004). De cette façon, le transport et le devenir d'herbicides, notamment dans les eaux souterraines peut être significativement sous-estimé dans le cas où uniquement la molécule parent est ciblé (Richardson, 2006). L'atrazine, l'un des herbicides les plus utilisés au Canada et aux États-Unis (Mudhoo and Garg, 2011) est principalement utilisé pour le traitement en pré-émergence (Avril-Mai) et post-émergence (fin juin) des plantes considérées comme nuisibles dans différents types de cultures, mais principalement pour la cultures du maïs et des légumineuses (Byer et al., 2011). La

présence d'atrazine (Solomon et al., 2008) a été relevée dans les eaux souterraines (Pucarevic et al., 2002) et dans les eaux de surface (Byer et al., 2011). Ensuite, il a été démontré que l'utilisation d'atrazine pouvait être associée au déclin d'insectes pollinisateurs (Helmer et al., 2015), qu'il est rapidement assimilée par l'embryon du poisson-zèbre et amplifié par un facteur de 19 (Wiegand et al., 2000) en plus d'inhiber de 25% le métabolisme de l'androsténone dans le poisson (Thibaut and Porte, 2004).

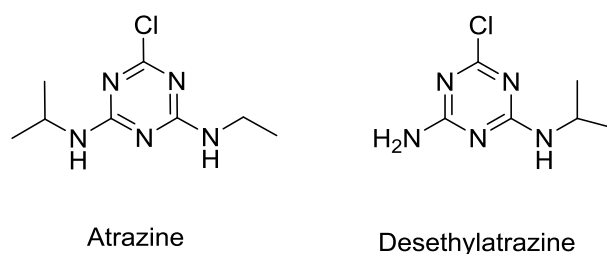


Fig. 1-3. Structure des pesticides sélectionnés pour le projet de maîtrise.

Comme marqueurs d'une contamination anthropique, des eaux de surface, la caféine, le cholestérol et le coprostanol ont été sélectionnés et leurs structures sont présentées à la **Figure 1-4**. La caféine a été sélectionnée pour cette étude car il a été démontré que sa concentration était corrélée avec la présence de coliformes fécaux ($R^2 = 0.558$) et qu'une concentration de plus de 400 ng L^{-1} est associée à une contamination fécale élevée, défini par plus de 200 unités formant des colonies pour 100 mL (Sauvé et al., 2012). De plus, il a été démontré que la caféine est persistante au traitement de l'eau potable (Huerta-Fontela et al., 2008) et qu'elle a un temps de demi-vie estimé entre 3 jours et plus de trois mois dans l'environnement (Benotti and Brownawell, 2009). De plus une étude a démontré qu'elle est détectée approximativement dans 13% des eaux souterraines (Barnes et al., 2008) et l'un de ses métabolites, le 1,7-diméthylxanthine, dans plus de 27% des eaux de surfaces aux États-Unis (Focazio et al., 2008). Pour ces raisons, plusieurs études ont suggéré qu'elle peut être utilisée comme marqueur d'une contamination anthropique des eaux de surfaces par l'effluent municipal (Buerge et al., 2003; Sauvé et al., 2012). Ensuite, le cholestérol et son métabolite le coprostanol ont été sélectionnés, notamment parce qu'ils ont été détectés à une fréquence, respective de 59 et 18 % dans les

eaux de surfaces (Focazio et al., 2008) et qu'ils peuvent être présents à haute concentration dans les particules en suspensions (Andrási et al., 2013).

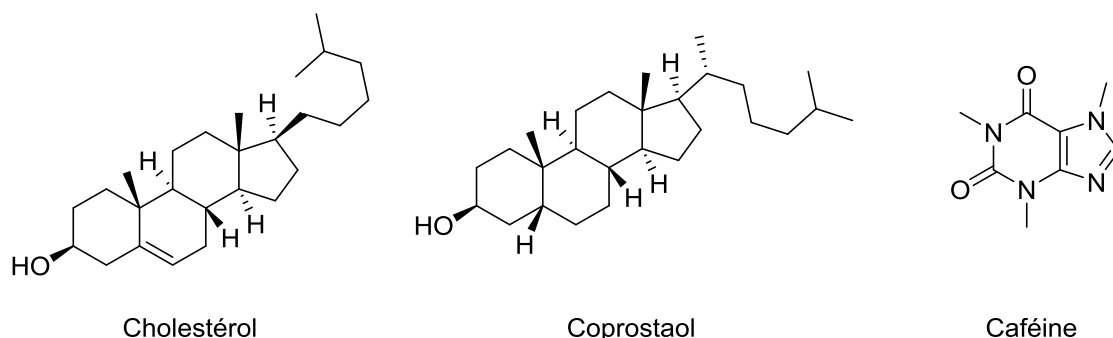


Fig. 1-4. Structure des marqueurs d'une contamination anthropique des eaux de surface sélectionnée pour le projet de maîtrise.

Ensuite, comme représentant des produits de soins personnels, le bisphénol A (BPA) et le méthylparabène ont également été sélectionnés. Leurs structures sont présentées à la **Figure 1-5**. Le BPA est un composé organique largement utilisé comme monomère pour la conception de polycarbonate et de résines époxy dont la demande mondiale en 2006 était estimée à plus de 3.9 millions de tonnes (Ballesteros-Gómez et al., 2009). Le BPA a été détecté dans plus de 30% des eaux souterraines aux États-Unis (Barnes et al., 2008), et dans les eaux de surfaces (Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Renz et al., 2013) en plus d'avoir été détecté dans différents tissus cérébraux de poisson où une corrélation entre la concentration et l'oestrogénicité a été déterminée (Renz et al., 2013). De plus, des études ont établi que le BPA a un effet sur les fonctions cellulaires à une concentration aussi faible que 1 pM ($0,23 \text{ ngL}^{-1}$) (Wozniak et al., 2005). Ensuite, il a été démontré que le BPA peut perturber l'action des hormones thyroïdiennes (Zoeller et al., 2005), augmenter la prolifération du cancer de la prostate (Prins et al., 2008), du sein (Dairkee et al., 2008) et inhiber la synthèse de la testostérone (Akingbemi et al., 2004). Les parabènes sont utilisés notamment comme préservatifs dans différents produits cosmétiques et alimentaires et ont été détectés dans les eaux de surface (Renz et al., 2013). Ces composés ont la réputation d'exercer un effet ostéogénique. En effet, une étude a démontré

que suite à l'ingestion de butylparabène chez les rats, la quantité de testostérone et de sperme produite quotidiennement était significativement inférieure comparativement aux contrôles (Oishi, 2001). De plus, une étude a démontré que la présence de parabènes dans les tissus mammaires favorisait le développement de cellules cancéreuses (Byford et al., 2002). Ainsi, le méthylparabène a également été sélectionné pour cette étude.

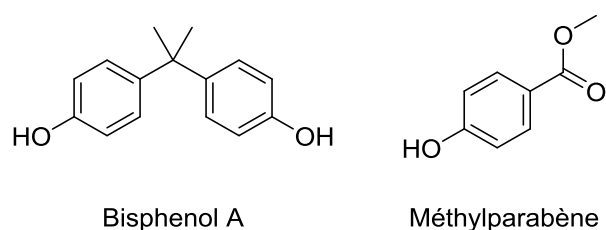


Fig. 1-5. Structure des marqueurs des produits de soins personnels sélectionnés pour le projet de maîtrise.

Dans l'optique où l'utilisation accentuée d'antibiotiques peut mener à une promotion de gènes résistants aux antibiotiques, le sulfaméthoxazole a également été sélectionné (O'Brien, 2002). Le sulfaméthoxazole, un antibactérien sulfamidé, est l'un des antibiotiques les plus détectés (à une fréquence de plus de 23% et à une concentration maximale observée de plus de 1.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) dans les eaux souterraines aux États-Unis où sa présence a été corrélée à une diminution de la croissance bactérienne et ainsi également à une diminution de 47 % de la réduction du nitrate (Underwood et al., 2011).

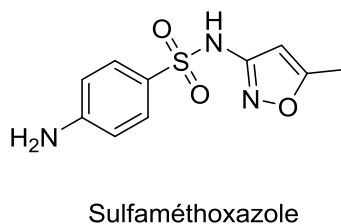


Fig. 1-6. Structure du sulfaméthoxazole sélectionné pour ce projet de maîtrise.

Ensuite, 2 antidépresseurs (fluoxétine et venlafaxine) et le métabolite de la venlafaxine (desvenlafaxine) ont été sélectionnés pour l'étude. Leurs structures sont

présentées à la **Fig. 1-7**. Ces composés ont tous été détectés dans la rivière Grand en Ontario, et la venlafaxine et deux de ses métabolites déméthylés ont été détectés dans des poissons à têtes de boule (Metcalfé et al., 2010c).

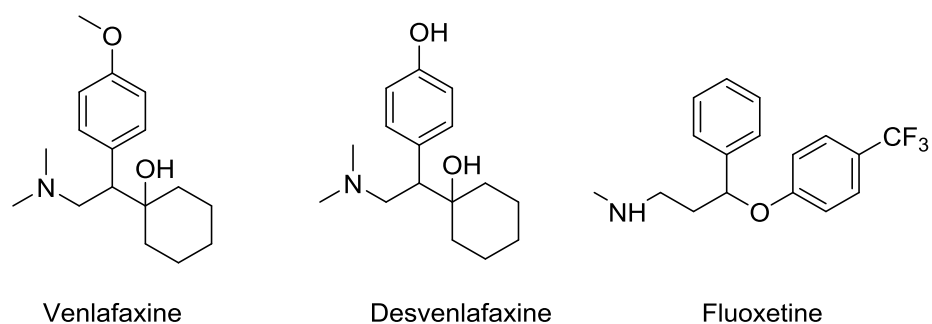


Figure 1-7. Structure de la fluoxétine, du venlafaxine et de la desvenlafaxine sélectionnés pour le projet de maîtrise.

Le diazépam et son métabolite principal, l'oxazépam de la famille des benzodiazépines, couramment utilisés pour leurs propriétés anxiolytiques (utilisés contre l'anxiété) (Brodin et al., 2013) ont également été sélectionnés pour cette étude. Leurs structures sont présentées à la **Fig. 1-8**. Il est admis que l'oxazépam est bioaccumulé. En effet, la concentration répertoriée dans le muscle de perchaudes européennes était 6 fois supérieure à la concentration préalablement déterminée dans l'eau de rivière (Brodin et al., 2013). De plus, l'oxazépam peut persister dans l'environnement pendant plusieurs décennies. En effet, l'analyse de carottes de sédiments a démontré que l'oxazépam utilisé dans les années 1970 est toujours présent tandis qu'en eau froide, l'oxazépam pouvait persister pendant plusieurs mois (Klaminder et al., 2015).

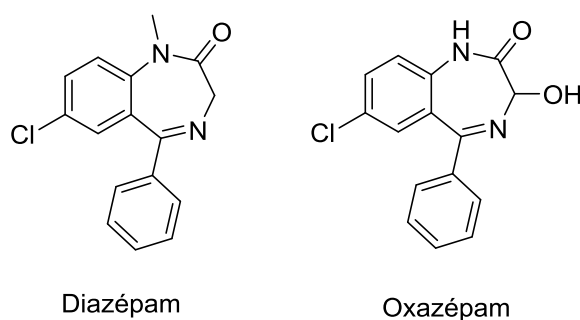


Fig. 1-8. Structure du diazépam et de l'oxazépam préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.

La carbamazépine, utilisée pour soigner l'épilepsie et réguler l'humeur et le diclofénac, un anti-inflammatoire utilisé depuis les années 1970 ont également été sélectionnés. Leurs structures sont présentées à la **Fig. 1-9**. Dans les stations d'épurations des eaux usées, la carbamazépine est typiquement éliminée à moins de 10%, tandis que l'élimination du diclofénac se situe généralement entre 21-40% (Clara et al., 2004; Zhang et al., 2008) Ainsi, leur présence et leurs persistance dans l'environnement est bien démontrée (Metcalfé et al., 2003; Clara et al., 2004; Zhang et al., 2008). De plus, la présence de leurs différents métabolites est également une préoccupation environnementale (Zhang et al., 2008). Ensuite, un déclin de la population de vautour au Pakistan a été associé au diclofénac (Risebrough, 2004). Tandis qu'il a été estimé que la consommation annuelle mondiale en diclofénac est de 1443 ± 58 tonnes avec une concentration médiane estimée dans les écosystèmes d'eau douce de 21 ± 722 ng L⁻¹ (moyenne couvrant 38 pays) (Acuña et al., 2015). Ainsi, il est probable que des effets associés au diclofénac soient rapportés dans différents écosystèmes, sachant que le 5^e percentile de la plus petite concentration où un effet est observable (*LOEC, Lowest observed effect concentration*), estimé à 30 ngL⁻¹, est dépassé par plus de 42% des échantillons analysés (Acuña et al., 2015).

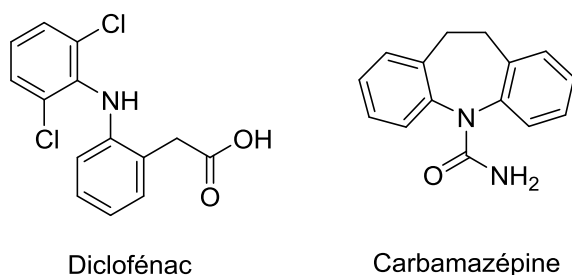


Fig. 1-9. Structure du diclofénac et de la carbamazépine préalablement sélectionnée pour le projet de maîtrise.

Le tamoxifène, dont la structure est présentée à la **Fig. 1-10**, est un modulateur sélectif des récepteurs œstrogènes et est utilisé pour le traitement du cancer du sein et a été détecté dans l’effluent municipal et dans l’eau de surfaces (Mater et al., 2014). Ce composé a le potentiel de se bioaccumuler dans le corps humain et dans différents organismes aquatiques (Jean et al., 2012). De plus, une étude a démontré que suite à une exposition de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, une perturbation du ratio male/femelle se produisait chez le Médaka tandis qu’une augmentation de la concentration en vitellogénine dans le plasma des poissons males était observée (Jean et al., 2012).

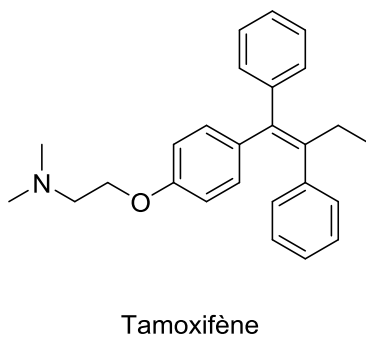


Fig. 1-10. Structure du tamoxifène préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.

Le fentanyl est un opioïde synthétique dont le potentiel analgésique se situe entre 50-100 fois supérieure à celui de la morphine (Fareed et al., 2015). Typiquement, il est utilisé en timbre transdermique pour atténuer la douleur chronique, mais également en

utilisation récréative (Denton et al., 2008) où on l'associe approximativement à un décès tous les trois jours selon le Centre canadien de lutte contre les toxicomanies. Une fois administré, entre 26-55% du fentanyl est excrété sous forme de norfentanyl (Rodayan et al., 2015), tandis qu'approximativement 8 % est éliminé de façon inchangé via les selles (75%) et l'urine (12%) (Lane, 2013). Cependant, plusieurs études ont détecté le fentanyl dans les eaux usées (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011b; Rodayan et al., 2015), dans les particules en suspensions (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011b) et également dans une usine d'eau potable (Rodayan et al., 2015).

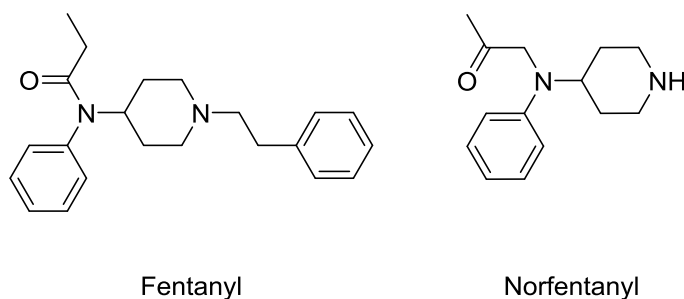


Fig. 1-11. Structure du Fentanyl et du Norfentanyl préalablement sélectionné pour le projet de maîtrise.

Chapitre 2. Description des méthodes couramment utilisées pour la préparation des échantillons

Les principaux défis en analyse environnementale sont directement associés à la complexité des matrices à analyser qui combinent l'ensemble des espèces à déterminer (analytes) et le reste des constituants de la matrice à des concentrations variables. Lorsqu'il s'agit de quantifier une espèce parmi d'autres composés des millions ou des milliards de fois plus abondants, il est probable que les résultats soient directement influencés par la composition de la matrice (Rouessac and Rouessac, 1992; Farré et al., 2012). Il est admis ainsi que l'analyse de pesticides dans une herbe aromatique comme l'estragon est en soi plus complexe que l'analyse du même pesticide dans le concombre (Kaufmann et al., 2010) tandis que l'analyse d'antibiotiques dans le muscle ou dans l'urine est moins demandant en terme de sélectivité que l'analyse dans le miel ou encore dans le foie (Kaufmann et al., 2010). Lorsque la détection se fait par MS l'effet matrice peut causer la suppression d'ions ou causer une accentuation du signal par la présence de coélutants durant l'étape chromatographique qui affecte l'ionisation des analytes et ainsi, la précision et la sensibilité de la méthode (Taylor, 2005).

Plusieurs études ont rapporté le besoin d'évaluer l'effet matrice lors du développement et lors de la validation des méthodes analytiques afin de s'assurer que la précision, la sélectivité et la sensibilité ne seront pas compromises. Toutefois, il n'y a pas de méthode unique et standardisée afin d'évaluer et déterminer si une méthode analytique est sélective ou compromise à cause d'un effet matrice (Matuszewski et al., 2003). Ceci est d'autant plus important puisque la décision concernant la présence ou l'absence d'un composé exogène est directement associée à la composition de la matrice (Kaufmann et al., 2010). Typiquement, dans l'objectif de minimiser l'effet matrice, différents isotopes comme étalons internes peuvent être employés (Richardson and Ternes, 2005). De plus, une modification de la méthode d'extraction ou encore une amélioration de la séparation chromatographique peut être nécessaire (Taylor, 2005). Dans le développement d'une méthode analytique, le prétraitement de l'échantillon, qui fait suite à l'étape

d'échantillonnage est probablement l'étape la plus exigeante en terme de temps, particulièrement lorsque des échantillons solides sont impliqués (Luque de Castro and García-Ayuso, 1998). Cette étape va généralement affecter le résultat au même titre que la mesure et la précision de l'instrument employé (Rouessac and Rouessac, 1992). De cette façon, différentes techniques de prétraitement des échantillons dont l'objectif est de minimiser la présence d'interférent et de d'enrichir les analytes seront présentées dans la prochaine section.

Tout d'abord, on peut caractériser les différentes techniques de traitement des échantillons, selon celles destinées à des échantillons solides ou liquides. Pour les échantillons solides, différentes techniques existent notamment : l'extraction de Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrason (UAE), la dispersion de la matrice sur phase solide (MSPD) et l'extraction liquide sous pression (PLE). La méthode «traditionnelle» pour l'analyse d'une grande variété de composés dans une matrice solide est l'extraction de Soxhlet. Cette méthode est une technique dans laquelle l'échantillon est placé dans un corps en verre continuellement en contact avec un solvant précédemment condensé provenant d'un ballon de distillation (Luque de Castro and García-Ayuso, 1998). L'avantage de l'extraction de Soxhlet est que l'échantillon est exposé continuellement avec une nouvelle quantité de solvant favorisant le déplacement de l'équilibre dû au transfert des analytes (Luque de Castro and García-Ayuso, 1998). Toutefois, cette technique est parfois inefficace, lente et consomme de grandes quantités de solvant (Carabias-Martinez et al., 2005). Dans l'objectif de surmonter ces limitations, les autres techniques précédemment mentionnées sont généralement privilégiées tel que démontrés à la **Table 2-1**. Une technique d'extraction récemment commercialisée et de plus en plus populaire mais non pas élaboré dans ce travail est la méthode QuEChERS, pour *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*. Cette technique s'effectue par l'extraction d'acétonitrile suivi par une étape d'extraction/partition suite à l'ajout de sels basé sur le principe de la SPE dispersive (D-SPE) (Paya et al., 2007).

Table 2-1. Récapitulatifs des différentes méthodes d'extraction/d'enrichissent, ainsi que les méthodes analytiques couramment employé pour l'analyse des composés sélectionnés pour cette études.

Compounds	Matrix	Extraction/ Clean up	LOD	Analytical Method	References
Pharmaceuticals, Pesticides and Hormones	Sediment			LC-MS ²	
	SPM	UAE-SPE	0.7-121 ngg ⁻¹	LDTD-MS ²	(Darwano et al., 2014a)
41 illicit drugs	Sediment				
	Sludge	UAE-SPE	<1.32 ngg ⁻¹	LC-MS ²	(Álvarez-Ruiz et al., 2015)
Steroids	SPM	UAE-SPE	Low ngL ⁻¹	GC-MS ²	(Andrási et al., 2013)
	Wastewater	QuEchERS	Low ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Campo et al., 2013)
More than 40 pesticides	Sludge	d-SPE	Low ngg ⁻¹	LC-MS ²	
	Wastewater	SPE	0.5-10.7 pg	LC-MS ²	(Gracia-Lor et al., 2012)
17 PPCPs	Wastewater	SPE	Low ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Yuan et al., 2013)
22 Pharmaceuticals	Wastewater	SPE	Low ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Walters et al., 2010)
72 PPCPs and Pharmaceuticals	Biosolids	UAE-SPE	0.3-54.6 ngg ⁻¹	LC-MS ²	
Cocaine and Benzoylcegonine	Waste water	SPE	0.3 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(van Nuijs et al., 2009)
	Surface water	SPE	0.28-2.31 ngL ⁻¹	GC-NPD	(Pucarevic et al., 2002)
Atrazine and its metabolites	Groundwater	SPE	< 0.5 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Kasprzyk-Hordern et al., 2009)
55 Pharmaceuticals	Wastewater	SPE	10 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Clara et al., 2004)
	Wastewater	SPE	0.1-3.8 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Boleda et al., 2009)
Carbamazepine	Groundwater	SPE	0.4-24.3 ngL ⁻¹	GC-MS	(Atkinson et al., 2012b)
	Wastewater	SPE	n.a	LC-MS ²	(Bade et al., 2015)
Illicits drugs	Surface water	SPE	0.02-1.31 ngg ⁻¹	LC-MS ²	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011c)
	Finished water	SPE	n.a ^a	LC-MS ²	(Barco-Bonilla et al., 2013b)
Steroidal estrogens	Wastewater	PLE	0.15-6 ngg ⁻¹	LC-MS ²	(Berlizo-Barbier et al., 2014b)
	Waste and Surface water	SPE	0.015-150 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Bijlsma et al., 2009)
Pharmaceuticals and illicit drugs	SPM	PLE	≈10 ngL ⁻¹	GC-MS	(Buerge et al., 2003)
	SPM	SPE	0.3µg L ⁻¹	GC-MS ²	(Byer et al., 2011)
204 emerging contaminants	Wastewater	SPE	7 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Chen et al., 2013)
	Wastewater	On-line SPE	8-60 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Fayad et al., 2013)
15 emerging contaminants	Sediment	QuEchERS	0.14-6 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Fedorova et al., 2013b)
	Wastewater	SPE	0.3-15 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(González-Mariño et al., 2012)
11 illicit drugs	Surface water	SPE	-	LC-MS ²	(Hernández et al., 2015)
	Waste and Surface water	SPE	-	LC-MS	
Caffeine	Surface water	-	0.3µg L ⁻¹	ELISA	(Byer et al., 2011)
Atrazine and Metolachlor	Surface water	-	7 ngL ⁻¹	GC-MS	(Chen et al., 2013)
Illicit drugs	Wastewater	SPE	8-60 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Fayad et al., 2013)
	Wastewater	On-line SPE	0.14-6 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Fedorova et al., 2013b)
Steroid hormones	Wastewater	SPE	0.14-6 ngL ⁻¹	LC-MS	(Fedorova et al., 2013b)
	Wastewater	SPE	0.3-15 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(González-Mariño et al., 2012)
Illicit drugs	Wastewater	SPE	-	LC-MS ²	(Hernández et al., 2015)
	Surface water	SPE	-	LC-MS ²	(Hernández et al., 2015)

^a n.a; not available

Table 2-2. (Suites)

Compounds	Matrix	Extraction/ Clean up	LOD	Analytical Method	References
10 licit and illicit drugs	Drinking water	SPE	0.03-60 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Huerta-Fontela et al., 2008)
50 emerging contaminants	Waste and Surface water	SPE	≈10-100 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
13 illicit drugs	Wastewater	SPE	Low ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Lai et al., 2013)
6 basic antidepressant	Wastewater	SPE	0.05-0.1 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Lajeunesse et al., 2008b)
22 Pharmaceuticals	Wastewater Sludge	SPE	0.001-0.323 µg L ⁻¹	LC-DAD/F1	(Martin et al., 2012)
5 illicit drugs	Wastewater	SPE	1-6 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Metcalfé et al., 2010a)
9 emerging contaminants	Wastewater	SPE	0.5-115 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Morissette et al., 2015b)
Parabens and Bisphenol A	Surface water Fish Brain	SPE LLE	0.1-0.3 µg L ⁻¹ Low pgg ⁻¹	LC-MS ²	(Renz et al., 2013)
17 illicit drugs	Wastewater	SPE	0.5-20 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Rodayan et al., 2015)
Lidocaine, tradamadol ,venlafaxine And theirs metabolites	Wastewater	SPE	15-28 ngL ⁻¹	GC-MS	(Rúa-Gómez and Püttmann, 2012)
Caffeine and carbamazepine	Wastewater	SPE	0.2 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Sauvé et al., 2012)
Steroid hormones	Wastewater	SPE	0.8-332 µgL ⁻¹	LC-F1 RIA	(Snyder et al., 1999a)
14 emerging contaminants	Biosolids Water	SPE UAE	2-6 ngg ⁻¹ 2-8 ngL ⁻¹	LC-MS ²	(Sabourin et al., 2009)
Phtalates, alkylphenols, BPA, PBDEs PCBs and PAHs	Wastewater	SPE	0.4-833 ngL ⁻¹	GC-MS	(Sánchez-Avila et al., 2009)
43 Pharmaceuticals	Wastewater	SPE	≈100 ngL ⁻¹	LC-MS	(Vergeynst et al., 2015)
11 PPCPs and EDCs	Soil	UAE SPE	0.2-4 ngg ⁻¹	GC-MS	(Xu et al., 2008)
4 Pharmaceuticals	Wastewater	SPE	n.a ^a	GCSMS ²	(Zwiener et al., 2000)

2.1 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

La MAE est une technique employant les micro-ondes afin de chauffer rapidement le solvant en contact avec un échantillon dans l'objectif de répartir les analytes de la matrice vers le solvant (Eskilsson and Björklund, 2000). L'avantage d'employer la MAE est la diminution du temps d'extraction et la réduction de solvant organique employé (Eskilsson and Björklund, 2000). Le principe de chauffage par micro-ondes est directement associé à la conduction ionique et à la rotation des dipôles du solvant (l'alignement des dipôles avec le champ appliqué). Ceci permet de chauffer directement la solution tandis que les méthodes conventionnelles de chauffage nécessitent d'allouer du temps pour chauffer le récipient avant que cette chaleur soit transférée à la solution (Eskilsson and Björklund, 2000). Les molécules polaires et les solutions ioniques vont absorber fortement l'énergie des micro-ondes puisqu'ils ont un moment dipolaire permanent, inversement les solvants

^a n.a; not available

apolaires tels que l'hexane ne sont pas compatibles avec la MAE (Eskilsson and Björklund, 2000).

2.2 Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les fréquences des ultrasons sont comprises entre 20 kHz et 10 MHz tandis que la fréquence audible chez l'humain se situe entre 16 et 20 kHz. L'UAE emploie ainsi des ultrasons qui exercent une pression acoustique permettant un contact efficace entre l'échantillon et le solvant employé principalement suite à la formation de cavitation (génération et effondrement de cavités) (Romanik et al., 2007). En effet, sous l'action d'ultrasons, des microbulles sont formées dans le liquide et vont croître durant les périodes de pression négative et se compresser durant les périodes de pression positive. L'expansion et la compression des bulles permettent la formation d'une pulsation constante ou l'effondrement des microbulles (Pan et al., 2008) à l'interface solide/liquide, permettant ainsi l'érosion du solide, la désorption de l'analyte et la diffusion de celui-ci vers la phase liquide. Cette technique a été employée avec succès pour l'extraction d'une multitude de composés dans différentes matrices (Aydin et al., 2006; Pan et al., 2008; Xu et al., 2008) L'UAE est la méthode utilisée dans ce mémoire.

2.3 Dispersion de la matrice sur phase solide (MSPD)

La dispersion de la matrice sur phase solide (MSPD) est une technique d'extraction introduite la première fois en 1989 pour l'extraction d'échantillons solides et semi-solides. Cette technique est une alternative à la SPE lorsque l'échantillon n'est pas homogène et n'est pas sous phase liquide (Barker, 2000). Le principe de cette technique consiste à mélanger et homogénéiser l'échantillon avec un support solide tel la silice précédemment dérivée notamment avec du octadécylsilyle afin de former une pâte homogène (Barker, 2000). Ensuite, cette pâte est lavée avec une série de solvants afin de désorber les analytes.

2.4 Extraction liquide sous pression (PLE)

La PLE est une technique introduite en 1995 (Mustafa and Turner, 2011) employant des solvants organiques à haute température (ambiante à 200°C) et à haute pression (35-200 bars) permettant typiquement une augmentation du rendement d'extraction comparativement à d'autres techniques réalisées à température ambiante et pression normale (Mustafa and Turner, 2011). En effet, l'utilisation de solvants à des températures supérieures à leurs points d'ébullition favorise la solubilité et le transfert de masse des analytes (Mustafa and Turner, 2011). Il y a aussi plusieurs méthodes possibles pour l'extraction des échantillons liquides. En effet, l'extraction liquide-liquide (LLE), la micro-extraction sur phase solide (SPME), les polymères à empreintes moléculaires (MIPs), l'extraction sur barreau d'agitation (SBSE) sont couramment utilisés, néanmoins l'extraction sur phase solide (SPE) est la technique la plus utilisée et c'est pourquoi une attention particulière lui sera apportée.

2.5 Extraction liquide-liquide (LLE)

Le principe de la LLE repose sur la différence de solubilité d'un analyte entre deux solvants non miscibles typiquement, une phase organique et une phase liquide. À l'équilibre, la concentration relative de l'analyte dans les deux phases est déterminée par le coefficient de partage K_D , qui dépend de la nature des deux solvants de l'analyte, mais également de la température et du pH (Rubinson, 2000).

2.6 Micro-extraction sur phase solide (SPME)

La SPME est quant à elle une technique d'extraction ne nécessitant pas de solvant et combinant l'étape d'échantillonnage, d'extraction et d'introduction d'échantillons en une seule étape (Pietrogrande and Basaglia, 2007; Sarafraz-Yazdi et al., 2014). La SPME est effectuée à partir d'une seringue particulière dans laquelle l'aiguille est attaché à une fibre constituée de silice fondue et recouverte d'un adsorbant polymérique ou d'une phase stationnaire de type C-18 (Rouessac and Rouessac, 1992; Prosen and Zupancic, 1999).

Cette fibre, protégée par la seringue avant son utilisation, est ensuite introduite dans la solution aqueuse ou encore dans l'espace de tête de la solution à analyser pendant plusieurs minutes (Rouessac and Rouessac, 1992) jusqu'à la distribution de l'analyte dans la phase liquide ou gazeuse et la fibre (Sarafraz-Yazdi et al., 2014). Finalement, la fibre est introduite dans l'injecteur d'un chromatogramme ou dans un solvant pour la désorption des analytes (Rouessac and Rouessac, 1992) aux fins d'analyse. Cette technique est plus souvent couplée à la chromatographie gazeuse pour la détection de composés volatils, semi-volatils et non polaires (Pietrogrande and Basaglia, 2007). La principale limitation de cette technique est le faible choix de revêtements disponibles commercialement, causant généralement des limites de détection non adaptées (Pietrogrande and Basaglia, 2007) pour l'analyse de traces (concentration de l'ordre du $\mu\text{g L}^{-1}$) et d'ultra-traces (concentration de l'ordre du ng L^{-1}).

2.7 Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

Les MIPs sont des polymères synthétiques constitués de sites à reconnaissance spécifique qui sont complémentaires dans la forme, la taille et dans les groupes fonctionnels à l'analyte d'intérêt (Farré et al., 2012). Afin d'obtenir une reconnaissance hautement spécifique d'une certaine molécule, celle-ci est incorporée durant la synthèse du matériel MIP pour ensuite être extraite, laissant une empreinte tridimensionnelle d'elle-même (Spegel et al., 2002). La sélectivité est suffisamment élevée qu'on peut distinguer entre le glabridin et le 2,4-dimethylglabridin (Chen et al., 2014).

2.8 Extraction sur barreau d'agitation (SBSE)

L'extraction sur barreau d'agitation est une technique permettant la sorption et la préconcentration d'un large éventail de contaminants d'intérêt émergent basé sur les mêmes principes que la SPME précédemment décrite en offrant davantage de matériel de sorption (Gilart et al., 2014). Le principe d'extraction de cette technique est basé sur un barreau aimanté couvert typiquement d'un revêtement polymérique permettant la distribution des analytes entre l'échantillon et le matériel d'extraction (Gilart et al., 2014). Cependant,

jusqu'à récemment le seul revêtement disponible commercialement était le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Prieto et al., 2010) limitant ainsi l'extraction au composé ayant typiquement un $\log K_{ow} > 3$ (Gilart et al., 2014).

2.9 Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide (SPE) est la technique de choix pour l'étude de ce mémoire et la plus utilisée pour purifier et/ou concentrer un extrait ou un échantillon préalablement au dosage d'un ou de plusieurs constituants (Rouessac and Rouessac, 1992; Pietrogrande and Basaglia, 2007; Richardson and Ternes, 2014). Le principe de la SPE est de laisser passer un volume connu d'échantillon à travers une cartouche de plastique ressemblant à un corps de seringue de 1-6 ml (Buszewski and Szultka, 2012) contenant un adsorbant approprié (Rouessac and Rouessac, 1992). Le principe d'extraction est ainsi basé sur la distribution sélective entre la phase stationnaire et le solvant et est décrit par la loi de distribution de Nernst (Buszewski and Szultka, 2012) plus connu comme la loi de Partage. Ces interactions peuvent suivre des mécanismes de sorption, d'échange et/ou de partage. Le mode d'utilisation le plus couramment utilisé consiste à retenir les différents analytes sur l'adsorbant et ensuite, par rinçage, éliminer les constituants de la matrice ayant pas de partage avec le sorbant, à l'aide de solvants de faible force d'élution. Finalement, récupérer les composés d'intérêts par élution à l'aide d'un volume minimum de solvant (Rouessac and Rouessac, 1992) compatible avec les analytes d'intérêts afin d'enrichir (préconcentrer) les analytes, Le second mode d'utilisation, moins fréquent est de purifier l'échantillon sans le concentrer, en le filtrant sur l'adsorbant pour retenir les interférents et laisser passer les analytes (Rouessac and Rouessac, 1992). Typiquement, le processus d'extraction se traduit par quatre étapes distinctes, respectivement, le conditionnement (activation et rinçage de l'adsorbant), le chargement de l'échantillon (rétention), le rinçage (élimination des interférents) et finalement l'élution (désorption des composés ciblés) (Buszewski and Szultka, 2012).

Plusieurs avantages sont associés avec l'utilisation de la SPE. L'un des avantages d'employer la SPE est la possibilité d'automatiser cette technique permettant de réduire le

temps de manipulation des échantillons, de réduire le volume d'échantillon nécessaire et d'obtenir une meilleure précision. De plus, il est possible d'utiliser cette technique «en ligne» permettant ainsi un couplage direct avec l'étape d'analyse. Ensuite, une grande diversité d'adsorbants solides sont disponibles sur le marché, allant des adsorbants traditionnels en phase inverses (C8, C18), en phase normale (silice, alumine), échangeurs d'ions, en mode mixte et des résines fonctionnalisées à base de copolymère styrène-divinylbenzène (SDVB) (Buszewski and Szultka, 2012). Ces adsorbants solides peuvent être divisés en trois groupes distincts selon (Poole, 2003) : les oxydes inorganiques, les adsorbants faiblement «spécifiques» et ceux «spécifiques» à un composé ou à un groupe de composés. Finalement, beaucoup d'efforts sont mis de l'avant sur le développement et la caractérisation de nouveaux adsorbants, notamment les adsorbants basés sur la reconnaissance moléculaire avec des MIPs, aptamères, immunoadsorbants toujours dans l'objectif d'augmenter la sélectivité et la capacité d'adsorption (Augusto et al., 2013). Pour cette étude, les méthodes d'extractions et d'enrichissement privilégiées furent la UAE et la SPE. Pour les échantillons solides, la UAE a été utilisée puisque cette technique avait précédemment été utilisée avec succès pour l'extraction de plusieurs analytes sélectionnés pour cette étude (Darwano et al., 2014a). De plus, cette technique est peu coûteuse, nécessite peu de solvant et est rapide comparativement à d'autres techniques traditionnelles (Albero et al., 2015b). Pour les échantillons liquides, la SPE a été utilisée, plus spécifiquement la phase Strata X-C dont la structure est présentée à la **Fig. 2-1**. Cette phase polymérique est constituée d'un «squelette» styrène-divinylbenzène à lequel est greffé une fonctionnalité sulfonique qui permet la rétention de composés basiques. Il est ainsi possible d'effectuer un rinçage 100% organique ou d'éluer avec plus d'un solvant pour obtenir un extrait plus «propres» (Huq et al., 2005).

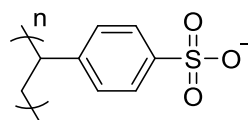


Fig. 2-1. Phase Strata X-C.

Chapitre 3. Instruments couramment utilisés pour l'analyse de contaminants émergents

Comme il a été précédemment mentionné, le terme contaminant «émergent» ne fait pas nécessairement et exclusivement référence aux «nouveaux composés» c'est-à-dire aux composés nouvellement synthétisés, leurs produits de dégradation et/ou leurs métabolites. Mais également aux composés, notamment les composés naturellement présents dans l'environnement, dont les effets indésirables sont méconnus sur les écosystèmes. De cette façon, le terme «contaminant émergent» a été défini par Petrovic et al. comme les composés qui ne sont pas inclus dans les analyses de routine et qui sont de futurs candidats potentiels pour la mise en place de réglementations et de normes environnementales (Petrovic and Barcelo, 2006). Ainsi, l'enjeu des contaminants émergents est étroitement relié aux méthodes analytiques (Petrovic and Barcelo, 2006; Pietrogrande and Basaglia, 2007) en effet, l'amélioration des limites de détections passant du microgramme par litre au nanogramme par litre, ou encore au picogramme par litre a permis la détection de produits pharmaceutiques dont la présence était soupçonnée, mais non confirmée. La mise en place de méthodes de routine pour plusieurs composés organiques au femtogramme a été rapportée (Petrovic et al., 2010) et peut être associée à la détection de plusieurs composés dont la présence était insoupçonnée, tel le 3-chloro-4-(dichlorométhyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone; un sous-produit de la désinfection de l'eau par chloration (Augusto et al., 2013) et un puissant mutagène (170 fois plus puissant que le chloroforme (Melnick et al., 1997)). Ces progrès sont principalement associés au couplage de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (Farré et al., 2012) qui a remplacé avantageusement plusieurs techniques conventionnelles (ex.: Fluorescence, électrochimie) qui souffrait d'un manque de sélectivité.

3.1 Couplage de la chromatographie à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est sans aucun doute l'outil de prédilection pour la détection et la quantification d'espèces élémentaires au niveau de traces (ICP-MS, –

Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) et de micropolluants organiques présents dans des mélanges complexes à condition de séparer les composés en amont du spectromètre. Ainsi, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenue l'outil de prédilection (**Table 2-1**) pour l'analyse de drogues et de leurs métabolites dans les matrices biologiques (Matuszewski et al., 2003) et pour l'analyse de contaminant dans l'environnement (Petrovic and Barcelo, 2006). En effet, plusieurs composés d'intérêts sont très polaires et sont thermosensibles (i.e. parabènes, DEET et différents filtres UV) et nécessite donc une dérivation pour les rendre plus volatils et donc compatibles avec la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Peck, 2006).

La chromatographie liquide est une méthode de séparation qui repose sur la distribution à l'équilibre des constituants d'un échantillon entre une phase stationnaire (solide ou liquide) et la phase mobile (liquide). Parmi les techniques où la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) dont la séparation repose sur les coefficients de partage ou d'adsorption est la plus utilisée. L'une des variantes de la HPLC est la chromatographie liquide ultra performante (UPLC) commercialisé par Waters Corp. (Richardson, 2009) qui emploie des particules de taille inférieure à 2 μm (typiquement 1.7 μm) pour permettre une meilleure résolution et cela grâce à une meilleure efficacité, avec des pics plus fins (5-10 s) (Wu et al., 2006; Richardson and Ternes, 2014). En effet, il a été démontré que la coélution avec des interférents était significativement diminuée, ce qui permet de réduire l'effet matrice (Van De Steene and Lambert, 2008).

Typiquement, la séparation en chromatographie liquide peut être effectuée en mode normal (NPLC – *normal phase liquid chromatography*) ou en mode inverse (RPLC). En mode normal, la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile, les solutés plus polaires sont ainsi, préférentiellement retenus et/ou adsorbé tandis qu'en mode inverse la phase stationnaire est généralement apolaire et la phase mobile plus polaire (Snyder et al., 2009). Différents désavantages sont associés à l'utilisation de la phase normale, notamment une mauvaise reproductibilité de séparation, une trainée des pics et une lente équilibration de la colonne lorsque la phase mobile est modifiée (Snyder et al., 2009). Ainsi, suite à

l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance en mode inverse (RPLC) et la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC) l'utilisation de la NPLC est devenue moins fréquente (Snyder et al., 2009). La RPLC est typiquement la méthode préférentielle pour la séparation d'espèces neutres et ionisées par l'entremise d'une phase stationnaire apolaire composée de silice poreuse sur laquelle des fonctions alkyles sont greffées (ex.; C-18, C-8) (Snyder et al., 2009). La phase mobile est quant à elle généralement constituée d'une combinaison d'eau et d'acétonitrile et/ou de méthanol, dans une moindre mesure d'isopropanol et de tétrahydrofurane (Snyder et al., 2009). Comparativement aux autres variantes de HPLC, la séparation par la RPLC est généralement plus reproductible et efficace et disponible dans un large éventail de choix de dimensions de colonnes, de tailles de particules et de type de phase stationnaire (C1-C30, phényl, cyano, etc.) (Snyder et al., 2009).

Plusieurs détecteurs sont compatibles avec la chromatographie liquide, mais l'un des détecteurs les plus puissant est la spectrométrie de masse (MS) (**Table 2-1**) qui permet la détection et la quantification d'analytes à des concentrations très faibles, à l'état de traces et d'ultra trace (Rouessac and Rouessac, 1992). Le principe de cette technique repose sur la formation et la séparation d'ions en phase gazeuse selon leurs différents ratios masse sur charge (m/z). (Snyder et al., 2009; Hernández et al., 2012) . De cette façon l'échantillon dans la phase mobile passe de la phase liquide à la phase gazeuse et la pression est considérablement réduite; de la pression atmosphérique (760 torr) à une pression de 10^{-5} à 10^{-6} torr (Snyder et al., 2009). Les différents analytes sont ensuite ionisés, focalisés et accélérés pour ensuite être «filtrés» par l'analyseur et finalement détectés qualitativement et quantitativement selon l'abondance de leurs ratios m/z (Rouessac and Rouessac, 1992).

3.2 Sources d'ionisation

Les deux sources d'ionisations les plus utilisées en chimie environnementale sont l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation par électronébulisation (ESI) (Byrdwell, 2001; Snyder et al., 2009). Typiquement l'ESI est utilisée pour l'ionisation de molécules de polarité élevée à moyenne et de hauts poids

moléculaires. L'APCI est quant à elle employée pour les composés de polarités faibles à moyennes et de poids moléculaires plus faibles; généralement inférieurs à 1 000 Da (Snyder et al., 2009). L'APCI est une technique moins «douce» que l'ESI, pouvant causer la dégradation des analytes thermosensibles (Byrdwell, 2001; Snyder et al., 2009) toutefois l'APCI est moins sensible aux effets matrices pouvant affecter l'ionisation des analytes (Byrdwell, 2001; Snyder et al., 2009). L'ionisation en ESI se produit suite à l'application d'un potentiel élevé (e.g. 3-5 Kv) à l'extrémité de l'émetteur (un fin capillaire couvert d'une couche métallique). À l'extrémité de l'émetteur, un brouillard, constitué de gouttelettes chargées est observé. Ces gouttelettes sont rapidement dispersées et leurs tailles diminuées suite à l'évaporation de solvant et à la collision avec les molécules environnantes. À la limite de Rayleigh, où leur densité de charge excède les tensions de surface maintenant l'intégrité des gouttelettes, elles explosent (explosion Coulombienne) en libérant les ions non fragmentés et ionisés à raison d'un nombre de charges variables (typiquement 1 charge pour 1000 Da en masse) (Rouessac and Rouessac, 1992; Snyder et al., 2009). Le principe d'ionisation de l'APCI présenté à la **Fig. 3-1** est quant à lui basé sur la vaporisation de la phase mobile à pression atmosphérique suite à un chauffage très court à 350 °C jusqu'à atteindre un gaz réactant généralement constitué de diazote et de vapeur d'eau préalablement ionisé à l'aide d'une décharge Corona. Suite à de nombreuses collisions ions/molécules en phase gazeuse, principalement avec des clusters d'eau de type $H^+(H_2O)_n$, un transfert de charge se produit (électrons et de protons). Les ions sont ensuite focalisés, désolvatés et transférés dans le vide de l'analyseur (Rouessac and Rouessac, 1992; Byrdwell, 2001; Snyder et al., 2009). En mode positif, les mécanismes menant à la formation des ions sont la protonation, la formation d'adduits et le transfert de protons, tandis qu'en mode négatif, la capture d'électrons et la fixation d'ions sont les mécanismes privilégiés (Byrdwell, 2001).

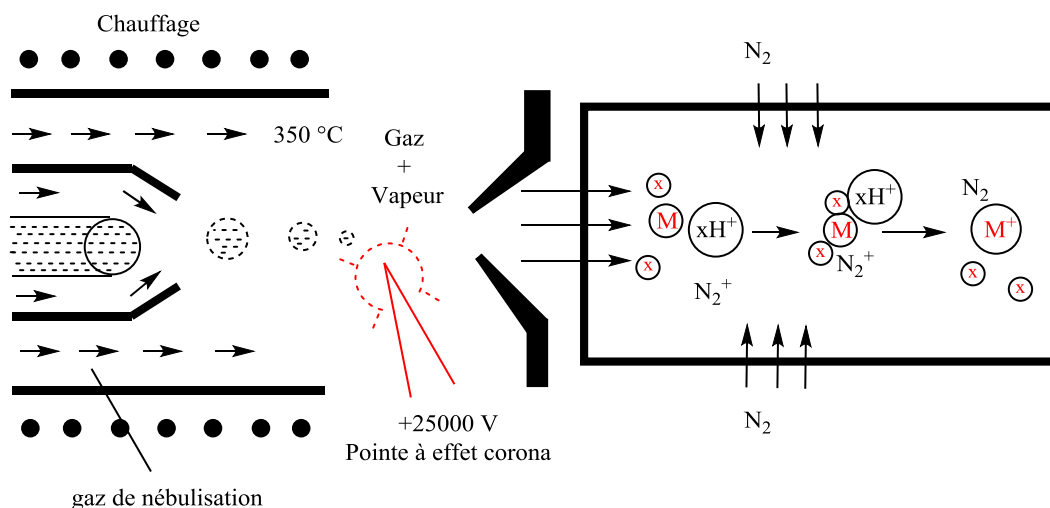


Fig. 3-1. Ionisation à pression atmosphérique par ionisation chimique (APCI) où X est le solvant et M est l'analyte.

3.3 Analyseurs en spectrométrie de masse

Différents analyseurs sont disponibles en spectrométrie de masse afin de séparer les ions préalablement formés selon leurs ratios m/z . L'analyseur le plus utilisé pour l'analyse de matrice complexe est probablement le triple quadripôle (QqQ) (Ibáñez et al., 2012; Sollic et al., 2015b) constitué de trois quadripôles, eux-mêmes constitués de quatre tiges métalliques parallèles (Rouessac and Rouessac, 1992) ayant une section circulaire ou hyperbolique. La superposition d'une tension continue (V_{DC}) à une tension alternative (V_{RF}) aux deux paires d'électrodes donne lieu à un champ comportant une partie fixe et une partie variable, qui permet ainsi de soumettre les ions à une force variable en intensité et en direction. De cette façon, seuls les ions possédant un ratio m/z spécifique auront une trajectoire stable, tandis que les autres ions vont suivre une trajectoire instable et ne seront pas transmis (Rouessac and Rouessac, 1992). L'avantage de l'utilisation du triple quadripôle provient principalement du balayage en multiples fragmentations sélectives (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*) permettant une sensibilité et une sélectivité accrue. Ce type de balayage est présenté à la **Fig. 3-2**. Un ou plusieurs ions précurseurs sont

d'abord sélectionnés par le premier quadripôle qui joue le rôle de filtre. Ils sont ensuite acheminés vers le second quadripôle, utilisé comme chambre de collision (CID, *Collision-induced Dissociation*) dans lequel un gaz de collision (Ar, N₂) est introduit pour fragmenter les ions préalablement sélectionnés. Finalement, les ions fragments sont analysés par le troisième quadripôle. L'association de ces quadripôles en mode MRM permet de réaliser la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS²) – où à partir d'un premier analyseur (Q1) les ions sont isolés (ions précurseurs), tandis que le second analyseur (Q3) permet de déterminer la relation entre l'ion préalablement isolé et ceux générés (ions fragments). Ces deux «filtres» en masse permettent une réponse sensible et sélective pour le composé préalablement sélectionné, (à Q1) qui peut ensuite être utilisé pour permettre une «spécificité structurale», mais permet également une quantification absolue de la concentration de l'analyte avec des étalons internes (*Internal Standard*) (Richardson and Ternes, 2005; Anderson and Hunter, 2006).

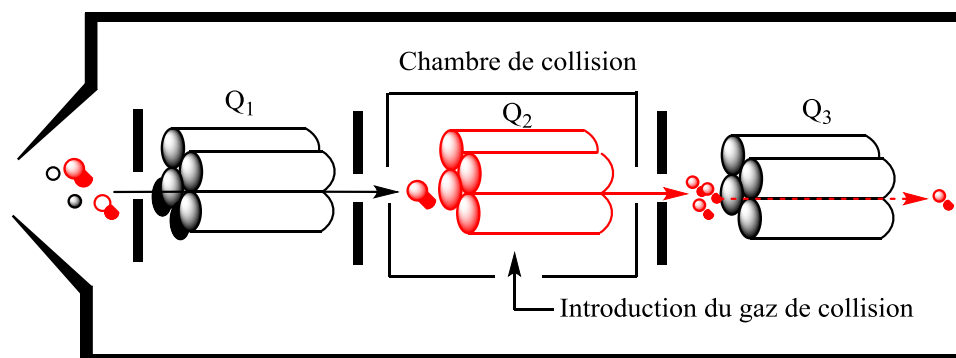


Fig. 3-2. Analyseur de type triple quadripôle (QqQ).

La confirmation de la présence de composés exogènes est typiquement obtenue lorsqu'un certain nombre critères sont obtenus (Kaufmann et al., 2010). Pour une méthode LC-MS² cela implique généralement le «suivi» de deux transitions (fragmentations) précurseurs-produits caractéristiques du composé cible. En effet, l'utilisation de transitions non-spécifiques, telles que celles associées à une perte d'une molécule d'eau ou encore d'ammoniaque peut-être sporadiquement associée à de faux positifs (Pozo et al., 2006). De plus, le temps de rétention chromatographique pour l'analyte présent dans un échantillon

doit correspondre à celui de l'étalon (Petrovic and Barcelo, 2006) et finalement, le rapport de surface entre les deux transitions MRM sélectionnées pour le standard et l'échantillon doit être égal (Kaufmann et al., 2010). Toutefois, en dépit de la haute sélectivité des QqQ, des faux positifs et négatifs sont possibles (Petrovic and Barcelo, 2006). Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de matrices biologiques ou environnementales, où la présence de coéluant peut notamment altérer le ratio des transitions MRM (Ratio des deux intensités des ions fragments sélectionnés) (Sollic et al., 2015b). De plus, pour certains analytes de faible m/z, tels les amphétamines, il n'est pas toujours possible d'obtenir deux transitions de hautes intensités requises lors d'une quantification (Castiglioni et al., 2008). De cette façon, une alternative aux QqQ est l'utilisation des spectromètres à haute résolution (*HRMS, High resolution mass spectrometry*) (ex.; Temps de vol (TOF), quadripôle-temps de vol (QTOF), trappe orbitale) (Sollic et al., 2015b) qui permettent de significativement diminuer la probabilité d'obtenir des faux positifs (surestimation de la concentration mesuré) lors d'une quantification. (Kaufmann et al., 2010).

3.4 Spectrométrie de masse à haute résolution

L'utilisation de la HRMS dans les matrices environnementales est de plus en plus employée (Richardson and Ternes, 2011), notamment parce qu'elle permet l'analyse simultanée de plus d'un millier de contaminants émergents connus (*targeted analysis*) et la découverte de contaminants inconnus, ou dont la présence était insoupçonnée, que ce soit des produits de dégradation ou encore de transformation (*untargeted analysis*) (Hernández et al., 2012; Sollic et al., 2015a). De plus, il a été démontré qu'elle permet un gain significatif en terme de sélectivité (Richardson, 2008; Kaufmann et al., 2010) et une analyse rétrospective. Pour l'analyse environnementale, ceci est d'autant plus important sachant que pour un échantillon donné, le nombre de contaminants émergents est élevé (Hernández et al., 2012) et il est fort probable de co-ioniser des interférents de valeur m/z très proche (Hernández et al., 2012). Ainsi, à partir de la masse exacte, et du mode balayage (*FS, Full scan*) il est possible d'analyser un nombre pratiquement illimité d'analytes sans perte de sensibilité (Richardson and Ternes, 2011). En comparaison les

QqQ qui fonctionnent à basse résolution (Sollicet et al., 2015b) en mode MRM, sont limités entre 100 et 150 composés, dépendamment de la séparation chromatographique (Farré et al., 2012). De plus, la haute résolution permet de discerner des ions avec une valeur m/z très proche (ex.; isotopes) tel que démontré à la **Fig. 3-3**. en plus de déterminer la charge et ainsi déterminer précisément la masse de «grosses» molécules (Zubarev and Makarov, 2013) (ex.; protéine).

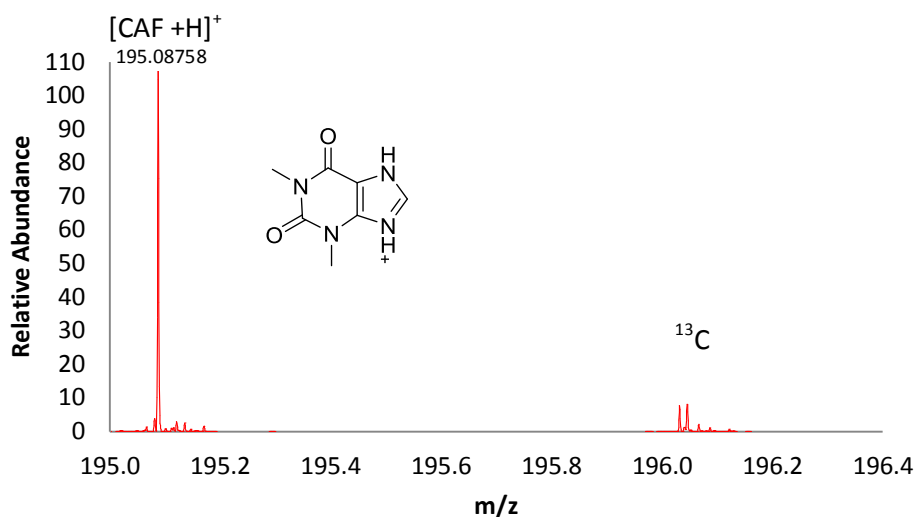


Fig. 3-3. Spectre de masse de la caféine en mode balayage à une de résolution de 70 000 FWHM (m/z 200) où on observe son profil isotopique,

La résolution est la capacité d'un instrument à distinguer deux signaux voisins. En spectrométrie de masse, la résolution est généralement employé afin d'illustrer la performance d'un analyseur et est défini par $\Delta m/m$, où m est la masse nominale d'une molécule donnée et Δm la largeur du pics m/z (Hernández et al., 2012). La distinction entre deux m/z proche est ainsi directement liée à la résolution sachant que les pics sont d'autant plus faciles à séparer lorsqu'ils sont étroits. Toutefois, ces définitions peuvent varier. En effet, elles peuvent être exprimées en terme de pourcentages de vallées entre deux pics voisins, mais également exprimés à la largeur à mi-hauteur (*FWHM*) (Hernández et al., 2012; Xian et al., 2012) de sorte que le pouvoir de résolution peut être significativement différent dépendamment de la façon dont il a été exprimé (Hernández et al., 2012). Pour la HRMS, la valeur la plus commune et généralement acceptée en terme de pouvoir de

résolution doit être supérieur à 10 000 FWHM (Xian et al., 2012). Cette valeur est facilement atteinte par bon nombre d'instruments (Hernández et al., 2012) dont la trappe orbitale, présentée pour la première fois à la conférence de l'American Society for Mass Spectrometry et commercialisé en 2005 sous le nom Orbitrap (Kumar et al., 2013; Zubarev and Makarov, 2013). La trappe orbitale est le second appareil MS commercialisé employant la transformation de Fourier suite au FTICR-MS (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass spectrometer*) (Zubarev and Makarov, 2013). L'OrbitrapTM est formé d'un dispositif électrostatique (Michalski et al., 2011), constitué de trois électrodes, respectivement une électrode centrale et de deux électrodes «externes» opposées (Zubarev and Makarov, 2013) présentées à la **Fig. 3-4**. Les ions sont comprimés en paquets et introduits perpendiculairement (la ligne rouge en pointillés, Fig. 3-4) dans «l'orbite» de la trappe. Les ions «tournent» selon une trajectoire elliptique d'un rayon r . Ensuite un potentiel est appliqué entre les électrodes afin de forcer les ions à se diriger de la zone étroite à la zone élargie (le long de l'axe z) de la trappe orbitale, initiant ainsi des oscillations axiales (Lange et al., 2014). Finalement, le courant image de leurs fréquences d'oscillations axiales est mesuré par les électrodes externes en utilisant la transformation de Fourier (Zubarev and Makarov, 2013). Un pouvoir de résolution, proportionnel au ratio du temps de détection et de la période d'oscillation (Zubarev and Makarov, 2013) de 450, 000 (FWHM) à m/z 200 a été rapporté pour l'Orbitrap FusionTM de la compagnie *Thermo Fisher Scientific*.

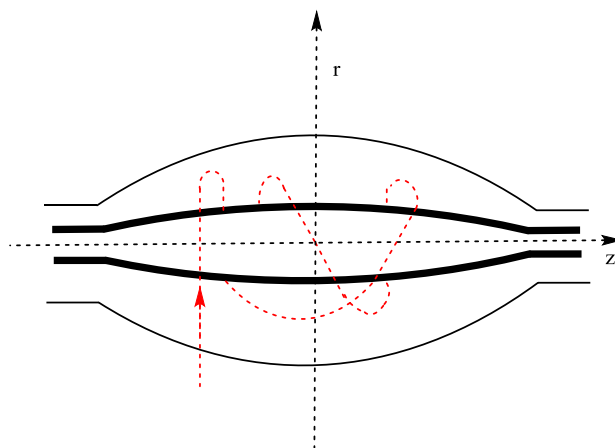


Fig. 3-4. Analyseur Orbitrap™ selon une coupe axiale adapté de Thermo Fisher Scientific.

En 2011, la combinaison d'une trappe orbitale à un quadripôle et à une cellule de dissociation à énergie supérieure de collision (*HCD cell, Higher-energy collisional dissociation cell*) a été réalisée (Zubarev and Makarov, 2013) et commercialisée par *Thermo Fischer Scientific* sous l'appellation de Q-Exactive™. Ce type d'appareil permet l'obtention de RP à plus de 140, 000 à FWHM et une précision en masse inférieure à 3 ppm ($\text{Diff ppm} = \left(\frac{\frac{m_{\text{calcul.}} - m_{\text{Expe}}}{z}}{\frac{m_{\text{Expe}}}{z}} \right) \times 10^6$) (Roy-Lachapelle et al., 2015). De plus, la combinaison d'une cellule HCD et d'un quadripôle à une trappe orbitale permet de réaliser un mode de fragmentation analogue à la MS², le suivi réactions parallèles (*PRM, Parallel reaction monitoring*) tel que présenté à la **Fig. 3-5**. De manière générale, en PRM on substitue le troisième quadripôle d'un QqQ par un analyseur à haute résolution (Peterson et al., 2012). Ce mode d'analyse permet de minimiser le temps en amont de l'analyse, facilite l'analyse automatisée des données (Peterson et al., 2012) et permet une meilleure sélectivité (Fedorova et al., 2013a).

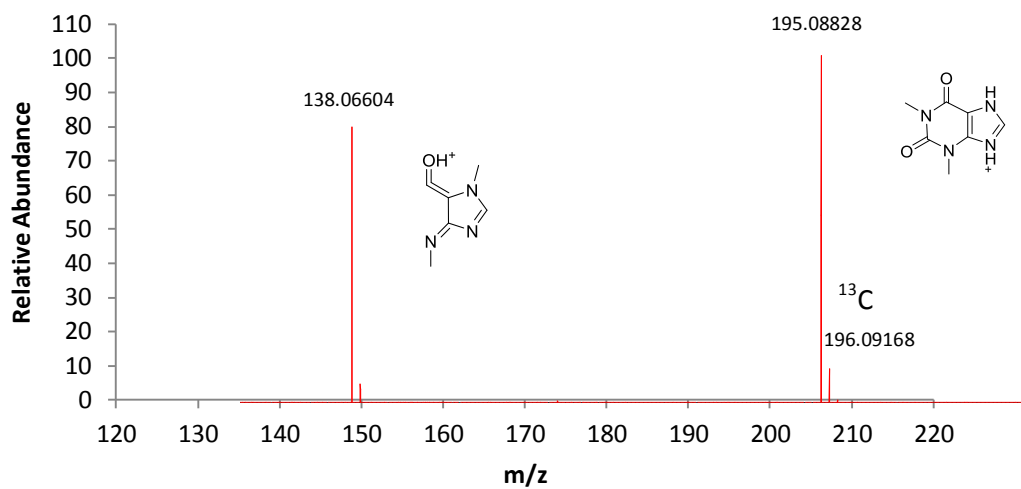


Fig 3-5. Spectre de masse de la caféine en mode PRM (le suivi réactions parallèles) à une résolution de 17 500 FWHM (m/z 200).

Chapitre 4. L'analyse de contaminants émergents présents dans des échantillons solides et liquides par l'entremise de la spectrométrie de masse à haute résolution.

Avant-propos : L'article ci-dessous présente le développement d'une méthode d'extraction assistée par ultrason (UAE) pour les sédiments et les particules en suspension et le développement d'une méthode d'extraction et de préconcentration en phase solide (SPE) pour la fraction liquide et l'extrait de la fraction solide. L'analyse a ensuite été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution et appliquée sur des échantillons réels d'eau de surface, de sédiments, de particules en suspensions ainsi que sur l'effluent de deux stations d'épurations échantillonnées sur une période de cinq mois.

La recherche bibliographique, les manipulations en laboratoire, l'analyse et l'interprétation des résultats pour les analyses de spectrométrie de masse ont été entièrement effectuées par l'auteur de ce mémoire. Les coauteurs ont principalement agi à titre de conseillers scientifiques pour la rédaction de cet article. La Section YES-ASSAY a été effectuée par Mélanie Desrosiers, Éloïse Veilleux et Salma Taktek chez le partenaire CEAEQ.

Les références spécifiquement reliées à cet article sont présentées à la fin de ce mémoire, sous un format uniforme. De plus, certaines figures et tableaux ne sont pas présentés à l'endroit où ils ont été mentionnés la première fois et figure à la section «Supporting Information».

Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high resolution mass spectrometry with a Q-Exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay

Simon Comtois-Marotte^a, Thomas Chappuis^a, Sung Vo Duy^a, Nicolas Gilbert^b, André Lajeunesse^b, Salma Taktek^c, Mélanie Desrosiers^c, Éloïse Veilleux^c and Sébastien Sauvé^{a}*

^aDepartment of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

^b Department of Chemistry, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

^c Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Québec, QC, Canada.

Chemosphere 166 (2017) 400-411

Abstract

Trace emerging contaminants (ECs) occur in both waste and surface waters that are rich in particulates that have been found to sorb several organic contaminants. An analytical method based on offline solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis was developed for the detection and quantification of 31 ECs from surface water, wastewater, suspended particulate matter (SPM) as well as sediments. Lyophilized sediments and air-dried SPM were subjected to ultrasonic extraction. Water samples and extracts were then concentrated and cleaned up by off-line SPE. Quantification was realized using a Q Exactive mass spectrometer in both full scan (FS) and MS² modes. These two modes were optimized and compared to determine which one was the most suitable for each matrix studied. Yeast estrogen screen assay (YES-assay) adapted from the direct measurement of estrogenic activity without sample extraction was tested on filtered wastewater samples. An endocrine disrupting effect was detected in all effluent samples analyzed with estradiol equivalent concentrations ranging from 4.4 to 720 ng eq E2 L⁻¹ for the WWTP-1 and 6.5–42 ng eq E2 L⁻¹ for the WWTP-2. The analytical methods were also applied on six samples of surface water, the corresponding SPM, the sediments and thirty-nine effluent samples from two wastewater treatment plants (WWTPs) sampled over a period of five months (February to June 2014).

Keywords: Emerging contaminants; High-resolution mass spectrometry; Multi-residue analysis; Liquid chromatography; YES-assay

4.1. Introduction

Urban sanitary wastewaters are a recognized source of contaminants of emerging concern (Lapworth et al., 2012a; Luo et al., 2014) which are often shortened to “emerging contaminants” (ECs) (Sauvé and Desrosiers, 2014). Such ECs in wastewaters are of different origins: pharmaceuticals, hormones (both synthetic and natural), personal care products, disinfectants, drugs of abuse, plasticizers, pesticides, insect repellents, sun screens, surfactants, antiadhesives and many others. We can expect to find this whole suite of compounds but many will also appear as their transformation products and we cannot simply seek the parent compounds since many transformation products could still have

some significant biological activity. Many ECs and their transformation products can act as endocrine disruptors (EDCs) and as such, could have significant impacts on fish, amphibian or other exposed populations (Fent et al., 2006; Pomati et al., 2006; Burkhardt-Holm, 2010). If present in urban wastewater effluents, these compounds are continually introduced to the receiving aquatic environment. Their presence comes from an incomplete degradation or removal through wastewater treatment plants (WWTPs), defective septic systems, leaking underground sewage, and surface run-off or directly via release from the skin during swimming, bathing or showering (Burkhardt-Holm, 2010; Ratola et al., 2012). The presence of ECs in the environment (at trace concentrations, ranging from a few ng L⁻¹ to several µg L⁻¹) has become an emerging issue since little is known about the long term risk and the potential ecological or human health risk associated with chronic exposure to trace levels of multiple chemical compounds (Stackelberg et al., 2004). Analysing the effluents of wastewater treatment plants allows the quantification of the environmental release of such emerging contaminants into receiving water bodies. It can also be used to estimate drug consumption (Lai et al., 2013), to measure the removal efficiency of WWTP (Martin et al., 2012) or to better understand the toxicity of wastewater effluents (Smital et al., 2011). However, most of the published data on the analysis of ECs in WWTPs focus on dissolved water concentrations and often neglect the fraction of contaminants that is associated with suspended particulate matter (SPM) (Gracia-Lor et al., 2012; Fayad et al., 2013; Lai et al., 2013; Ferrando-Climent et al., 2014).

However, wastewater is characterized by the presence of SPM in different amounts, which have been found to contain a significant proportion of ECs (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011c; Barco-Bonilla et al., 2013a). The lack of information on the solid-bound fraction of contaminants in wastewater could lead to an underestimation of the concentration and overall releases of several compounds. Considering that wastewaters are a complex multiphase matrix allows a better mass balance and a better understanding of the fate of the ECs during all stages of the wastewater-treatment process and the transformations into the receiving water. Our objective is to propose a multi-residue analytical method to detect and quantify a panel of suspected or known EDCs in the wastewater effluents, surface waters, sediments and SPM from surface water and WWTPs,

targeting: steroidal hormones (estradiol, estriol, estrone, levonorgestrel, norethindrone, ethinylestradiol, progesterone, testosterone), pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) (caffeine, carbamazepine, desvenlafaxine, venlafaxine, diazepam, fentanyl, norfentanyl, oxazepam, tamoxifen, sulfamethoxazole, diclofenac, fluoxetine), illicit drugs along with their main metabolites (cocaine, benzoylecgonine, MDMA, mephedrone, methylephedrine), two sterols (cholesterol and coprostanol), a herbicide and its metabolite (atrazine, desethylatrazine), a plastic by-product (bisphenol A) and a preservative agent (methylparaben). Selected chemical properties of each molecule are presented in **Table 4-1**. The presence of these 31 molecules in different matrices has been shown in different studies using different analytical techniques (Bijlsma et al., 2009; Sanchez-Avila et al., 2009; Martín et al., 2010; Metcalfe et al., 2010a; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011c; Daneshvar et al., 2012; Gracia-Lor et al., 2012; Rua-Gomez and Puttmann, 2012; Andrásí et al., 2013; Barco-Bonilla et al., 2013a; Campo et al., 2013; Fayad et al., 2013; Mwenesongole et al., 2013; Yuan et al., 2013; Darwano et al., 2014b; Ferrando-Climent et al., 2014; Kostich et al., 2014; Álvarez-Ruiz et al., 2015; Vergeynst et al., 2015). Nevertheless, only a few methods allow the simultaneous quantification of series of compounds with such a range of physicochemical properties in different matrices.

Table 4-3. Physicochemical properties of the studied compound.

Compound	Class	Chemical Formula	Log K _{ow} ^a	Log D ^a (pH 7.4)	pKa ^b	Internal standards
Sulfamethoxazole	Antibiotics	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	0.89	-0.56	0.25; 1.97; 6.16	[¹³ C ₆]-SMX
Caffeine	Stimulant	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	-0.13	0.28	-0.92	[¹³ C ₃]-CAF
Benzoylcegonine	Illicit drugs	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	2.71	-0.21	3.15; 9.54	[² H ₃]-BZE
Methylparaben	Preservative agent	C ₈ H ₈ O ₃	1.87	2.09	8.50	[¹³ C ₆]-MP
Desethylatrazine	Herbicides	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	0.18	0.27	-0.16; 4.10; 8.66	[¹³ C ₃]-DEA
MDMA	Illicit drugs	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	1.81	-0.77	10.14	[² H ₅]-MDMA
Estriol	Estrogens	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	2.94	2.71	10.33	[¹³ C ₆]-E2
Mephedrone	Illicit drugs	C ₁₁ H ₁₇ NO	1.74	0.11	8.86	[² H ₃]-4-MP
Desvenlafaxine	Antidepressant	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	2.26	0.89	8.87; 10.11	[² H ₃]-4-MP
Diclofenac	Anti-inflammatory	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	4.06	1.37	4.00	[² H ₄]-DCF
Norfentanyl	Opioid analgesic	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	1.59	-0.38	10.03	[² H ₅]-NOR
Methylephedrine	Illicit drugs	C ₁₁ H ₁₅ NO	1.86	1.59	8.05	[² H ₃]-4-MMC
Carbamazepine	Anticonvulsant	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	2.67	2.28	15.96	[² H ₁₀]-CBZ
Bisphenol A	Plastic by-product	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	3.43	3.63	9.78; 10.39	[¹³ C ₁₂]-BPA
Atrazine	Herbicides	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	1.53	1.27	3.49; 6.33; 7.57	[¹³ C ₃]-ATZ
Oxazepam	Anxiolytic	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	2.31	2.06	10.61; 12.47	[² H ₅]-OXA
Cocaine	Illicit drugs	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	3.08	1.22	8.85	[² H ₃]-COC
17β-estradiol	Estrogens	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	4.13	3.62	10.33	[¹³ C ₆]-E2
17α-ethinylestradiol	Estrogens	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	4.52	3.87	10.33	[¹³ C ₆]-E2
Estrone	Estrogens	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	3.69	3.38	10.33	[¹³ C ₆]-E2
Norethisterone	Progestogens	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	3.38	2.98	-	[¹³ C ₆]-E2
Diazepam	Anxiolytic	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	2.91	2.92	2.92	[² H ₅]-DIA
Testosterone	Androgen	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	3.47	3.16	-0.88	[¹³ C ₆]-E2
Levonorgestrel	Progestogens	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	3.92	3.32	-	[¹³ C ₆]-E2
Venlafaxine	Antidepressant	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	2.91	1.43	8.91; 14.42	[² H ₅]-FEN
Fentanyl	Opioid analgesic	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	3.89	3.01	8.77	[² H ₅]-FEN
Progesterone	Progestogens	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	4.04	3.72	-	[² H ₉]-Pro
Fluoxetine	Antidepressant	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	4.09	1.75	9.80	[² H ₅]-FEN
Tamoxifen	Anticancer drug	C ₂₆ H ₂₉ NO	7.88	5.51	8.76	[¹³ C ₃]-CHO
Cholesterol	Sterol	C ₂₇ H ₄₆ O	9.85	8.10	-	[¹³ C ₃]-CHO
Coprostanol	Sterol	C ₂₇ H ₄₈ O	10.22	8.94	-	[¹³ C ₃]-CHO

^a Calculated with ACD/labs (Toronto, Ontario, Canada) available on Chemspider.^b Calculated with ChemAxon available on Chemspider.

To date, the instrument of choice for the analysis of ECs in complex matrices is based on liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS²). However gas chromatography (GC) methods usually require a primary treatment for high molecular weight and low-volatility compounds, thus liquid chromatography (LC) was preferred – especially to integrate many polar compounds which are resilient to GC methods. Moreover, the triple quadrupole (QqQ) is certainly one of the most used type of mass spectrometer allowing sensitivity and selectivity advantage with the multiple reaction monitoring (MRM) (Kaufmann et al., 2010). However, the QqQ could not distinguish precisely a target compound and an interfering compound within a decimal difference, and thus could generate false positive. It has been demonstrated that the selectivity and reliability of the detection process of a high resolution mass spectrometer exceeds the performance of a tandem mass spectrometer at a resolution of 50,000 full width at half maximum (FWHM) and at corresponding mass windows (Kaufmann et al., 2010; Fedorova et al., 2013b). Thus to improve performances, we used an Orbitrap-based orbital ion trap high resolution mass spectrometer, a Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with resolving power up to 140, 000 FWHM at m/z 200. Furthermore, the Q-Exactive system combines the Orbitrap with a high-performance quadrupole and high-energy collisional induced dissociation (HCD) cell which allows the possibility of precursor ion fragmentation providing high sensitivity and selectivity – in a manner not unlike what can be performed using tandem mass spectrometry. The aim of this study was to develop a sensitive and selective multi-residue analytical method for a wide range of compounds in different matrices with the use of a SPE sorbent allowing different retention processes and multiple elution steps with different organic solvents. The Q-Exactive analyses were carried out in two different modes: full-scan MS and targeted MS² using a polarity-switching atmospheric pressure chemical ionization source (APCI), allowing acquisition of all analytes in a single run. An innovative mobile phase for the separation step, containing ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃), has proven useful for the optimal ionisation in both positive and negative mode. After development and validation, the method was successfully applied to sediments, surface waters, wastewater effluents samples and SPM

coming from two different wastewater treatment plants along the St. Lawrence River, in the province of Québec, Canada.

Chemical measurements can only provide the concentrations of endocrine disruptors, the actual effects and impacts will vary according to the target biological species or mechanisms studied and chemical measurements cannot integrate potential interactions of EDCs. To better accommodate such limitations, we have chosen to also evaluate the performance of a Yeast estrogen screen assay (YES-assay) adapted for direct measurement of estrogenic activity without sample extraction (Balsiger et al., 2010). This method can represent a rapid and potential sensitive screening method for impact of EDCs from wastewater for surveillance or monitoring projects and would hopefully help interpret the results.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Sample Collection and preparation

Wastewater effluent samples were collected each week in clean amber glass bottles from WWTP facilities along the St. Lawrence River (Quebec, Canada) i.e. WWTP-1 and WWTP-2 for a period of 5 months. Surface water samples were collected in the St. Lawrence River with clean amber glass bottles upstream and downstream of the WWTP-1 and in the overflow area for WWTP-2 in September 2014. All samples were taken in duplicate and filtered through 47 mm fiberglass filters (0.3 μm , Sterlitech, Kent, WA) previously dried and weighed. Once filtered, the samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before applying the SPE procedure. The filters used to retain SPM or solid sample were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilized. Some standard physicochemical characterization of the wastewater matrix is shown in Supporting Information (**Table S1**).

The analyses were carried out weekly for a period of 5 months. This represented 19 effluent samples and the corresponding SPM for the WWTP-1 and 20 samples for the WWTP-2. All samples were prepared in duplicate. To follow the fate of the selected

compounds in the receiving surface water, 6 surface water samples, their corresponding SPM and the sediments were also analysed.

Sediments were collected in the St. Lawrence River at the same site as surface water with an Eckman Grab and surficial sediments (0–3 cm) were placed in clean amber glass bottles and were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before chemical analysis for trace organics, sediments were lyophilized and subsequently homogenised and ground using a mortar and pestle and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before being extracted and analysed.

4.2.2. Chemicals and reagents

All selected compound standards were obtained at a purity $\geq 97\%$. 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA), mephedrone (4-MMC), 4-methylephedrine (4-MP), fentanyl (FEN), norfentanyl (NOR), oxazepam (OXA), cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), diazepam (DIA), MDMA-d5 (purity), 4-MMC-d3, 4-MP-d3, COC-d3, NOR-d5, OXA-d5, BZE-d9 and FEN-d5 were purchased from Cerilliant (Round Rock, Texas, USA). Estrone (E1), 17β -estradiol (E2), estriol (E3), 17α -ethinylestradiol (EE2), levonorgestrel (LEVO), norethindrone (NORE), progesterone (PRO), caffeine (CAF), cholesterol (CHO), coprostan-3-ol (COP), carbamazepine (CBZ), venlafaxine (VEN), desvenlafaxine (DES), tamoxifen (TAM), bisphenol A (BPA), methylparaben (MP), testosterone (TES), fluoxetine (FLU), atrazine (ATZ), desethylatrazine (DEA), sulfamethoxazole (SMX) and diclofenac (DCF), were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). $[^{13}\text{C}_3]$ -CAF, $[^{13}\text{C}_6]$ -MP, CBZ-d10, $[^{13}\text{C}_{12}]$ -BPA, PRO-d9, $[^{13}\text{C}_3]$ -DEA, $[^2\text{H}_4]$ -DCF, $[^{13}\text{C}_3]$ -ATZ, $[^{13}\text{C}_6]$ -E2 and $[^{13}\text{C}_3]$ -CHO were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, Massachusetts, USA). All solvents used were of high performance liquid chromatography (HPLC) grade from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and HPLC grade H_2O was used for dilution. Individual stock solution was prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1000 mg L^{-1} . All solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in amber glass bottles and kept for a maximum of 6 months. A mixture of all standards was prepared in methanol at a concentration 5 mg L^{-1} by dilution in MeOH of individual stock solution aliquots. Subsequent working solutions were prepared daily in

water to yield solutions of desired concentrations. Formic acid (HCOOH, purity $\geq 95\%$), ammonium hydroxide solution (NH₄OH, 28.0-30.0%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ammonium bicarbonate (NH₄CO₃, purity $\geq 95\%$) was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH, USA).

4.2.3 Ultrasonic Solvent extraction

For the analysis of solid samples, such as sediments or the filters used to retain SPM, we precisely weighted about 500 mg of freeze-dried material that was successively extracted with 2.5 mL of methanol and acetonitrile (1:1, v/v) with 1% formic acid into a glass conical-bottom centrifuge tube (Kimble Chase, USA). In each extraction cycle, the sample was shaken vigorously for 30s, placed into an ultrasonic bath (Branson 5510, USA) for 20 min at 30 °C and centrifuged at 4500 rpm for 10 min. After each extraction step, the supernatant was collected, combined and evaporated to 500 μ L under a nitrogen stream at 30 °C and diluted to 100 mL of water for the solid phase extraction (SPE) step. The extraction procedure was optimised using triplicate samples of sediments spiked at 50 ng g⁻¹.

4.2.4 Solid phase extraction

The SPE was carried out using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). Strata® X-C (strong cation-exchange functionalized polymeric sorbent, 200mg/6mL, Phenomenex, Torrance, CA, USA) cartridges were used to extract the compounds of interest. SPE was performed with 100 mL aliquots of SPM and sediment extract or wastewater while 1000 mL of surface water was used and acidified with 1% of concentrated phosphoric acid. The cartridges were conditioned with 2 x 3mL of MeOH followed by 2 x 3 mL of HPLC grade water containing 1% H₃PO₄ (v/v). The samples were loaded onto the cartridges at an approximate flow rate of 10 mL min⁻¹ using a vacuum pump. After the loading step, the cartridges were rinsed with 2 mL of a 0.1 mol L⁻¹ HCl solution and dried under vacuum for 30 min to eliminate the residual water. A first elution step was carried out with 2 x 1.5 mL of ethyl acetate. 1 mL of methanol was used to

wash the cartridges before the next step. A second elution was done twice with 1.5 mL methanol containing 5% NH₄OH (v/v). The eluted fractions were collected in glass centrifuge tubes and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen, at room temperature, using a six-port Reactiv-vap unit from Pierce (Rockford, IL). The extracts were reconstituted with 200 µL of H₂O/MeOH (85:15 v/v), vortexed for 1 min and placed for 15 min in an ultrasonic bath. The solutions were centrifuged at 4500 RPM for 15 min. The supernatant was collected, transferred into a 200 µL plastic conical vial and aliquots of 25 µL of clear supernatant samples were injected into the HPLC system.

4.2.5 LC parameters

A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series RS pump coupled with a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments and a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS auto sampler controlled by Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH - Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) were used for analysis. A Hypersil GOLD™ C18 (100 × 2.1 mm, 1.9 µm particle size) column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used for chromatographic separation of target compounds. The mobile phase consisted of aqueous eluent (A) with 5 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ and the organic eluent (B) consisted of MeOH. Flow rate was set at 0.5 mL min⁻¹, injection volume at 25 µL, and column inlet temperature at 55 °C. Chromatographic gradient elution conditions were as follows: gradual increase of B from 15 to 70% (0–3.5 min) and then from 70 to 100% (3.5–5 min). The 0:100 A:B ratio was held for 3 min (5–8 min), then quickly returned to the 85:15 initial mobile phase condition which was kept constant for 2 min to allow the system to equilibrate (**Fig. S1**).

4.2.6 HRMS parameters

Detection of compounds was performed using a Q Exactive mass spectrometer controlled by the Xcalibur 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The exact mass of the compounds was calculated using Qualbrowser in Xcalibur 2.3. Instrument

calibration in positive and negative mode was done every 5 days with a direct infusion of a LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution and an ESI Negative Ion Calibration Solution (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). The targeted MS² and the Full-scan MS (FS) modes were optimized and compared to determine which one gave the best results for each matrix. The MS² parameters were optimized by infusing individual standards at 1 mg L⁻¹ at a flow rate of 25 μL min⁻¹. The most abundant product ion was obtained by increasing the normalized collision energy (NCE) using the Q Exactive Tune 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The MS² parameters were an automatic gain control at 5×10^5 , an injection time of 200 ms, and a resolution power of 17,500 FWHM at m/z 200. The isolation window of the quadrupole was set at ± 2 m/z except for CHO and COP where the isolation window was set at ± 1 m/z given the small difference between their precursor ion mass. An inclusion list was used, containing the precursor ion m/z of each compound along with internal standard, the acquisition window (between 2 min and 30 s depending on the width of each chromatographic peak), and the normalized collision energy. The scanning range of FS modes was within 150–500 m/z for the positive mode and 100–420 m/z for the negative mode. In FS mode, precursor ion m/z values were used for quantification (**Table S2**) and the second most abundant ion of the isotopic pattern was used as confirmation ion for each compound. The data were acquired at a resolving power of 70,000 FWHM at m/z 200. The AGC was set at 3×10^6 ions for a maximum injection time of 200 ms. An APCI source was used alternatively in positive or negative ionisation mode during one analytical run for the ionization of the compounds. The capillary temperature was set to 350 °C, the discharge current at 4.0 (μA) and the S-lens RF level at 55 arbitrary units. Vaporized temperature was set at 400°C. Sheath gas and auxiliary gas were set at respectively 40 and 30 arbitrary units.

4.2.7 Data analysis and method validation

To evaluate the potential loss of target compounds and to avoid that a portion of the ECs in the dissolved fraction could be wrongly associated with the particulate phase if retained onto the filters during the filtration step, we evaluated the impact of the filter material. Six

different filter materials were tested (all 0.22 μm with a 25 mm diameter except for glass fiber at 0.3 μm with a 47 mm diameter), i.e. cellulose acetate (CA), mixed cellulose acetate (MCE), nylon (NYL), polycarbonate (PC), polyester (PE) and glass fiber (GF) were obtained from Sterlitech, Kent, USA). A 20 mL HPLC grade water aliquot spiked with the selected compounds (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) was passed through each filter ($n = 4$). The filtrate aliquots added with IS (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) were analysed and their peak ratio were compared to the non-filtered solution. Recovery values were reported as percentage.

For the quantification, 20 ng of the IS were added in all water samples and 10 ng in solid samples. They were added before the extraction step. The analytical signal was defined as the ratio of the analyte area to that of the corresponding IS. The mass tolerance window was set to 5 ppm in both positive and negative mode. For every matrix, six-point calibration curves were obtained by standard addition. The standards were spiked after the extraction protocol and before the evaporation step. The quantification of the selected compounds in wastewater was performed with three ranges of concentration to obtain suitable calibration curves for the analysis of the 31 compounds. The first one between 0 and 50 mg L^{-1} was used for caffeine, the second range from 0 to 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ for cholesterol, coprostanol, venlafaxine and desvenlafaxine and the third ranged between 0 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the remaining compounds. For the sediments and the SPM, a calibration ranging from 0 to 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ was used. Matrix effects were determined by comparing the slope of the standard addition calibration curve in matrix to that in the HPLC grade water and expressed as percentage. Intra-day precision was assessed likewise and corresponded to the relative standard deviation (RSD) of five replicates analyzed ($n = 5$) at two concentration levels on a same work day. The analysis was repeated on a second and third work day and inter-day precision derived from the overall RSD ($n = 15$). Method accuracy was evaluated at two concentration levels (**Table S3**) ($n = 5$) by spiking standards jointly with ISs to samples at the beginning of the preparation procedure and was expressed as a percentage of the expected value.

The method limit of detection (MLD) and method limit of quantification (MLQ) were determined as respectively 3 and 10 times the standard deviation of the y-intercept

divided by the slope of the calibration curve in real samples. To calculate the recovery values for the SPE method, three samples were spiked before extraction (BE) and three after sample treatment, before the evaporation step (AE). Because it is impossible to obtain real effluent samples without some native levels of our target contaminants, three un-spiked samples (BL) were also prepared to take into account the initial concentration in the samples. Recoveries percentages were defined from the following Eq. (1):

$$Recovery = \left(\frac{BE - BL}{AE - BL} \right) \times 100\%$$

4.2.8 Yeast estrogen screen assay

The Yeast estrogen screen assay (YES-assay) used in this study, was adapted for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction to determine the total estrogenic potency directly on the filtered wastewater through 47 mm fiberglass filters (0.3 μ m, Sterlitech, Kent, WA; see section 2-2) (Taktek et al.; Balsiger et al., 2010). The yeast strain used is *Saccharomyces cerevisiae* strain BJ3505, hER, 2ERE [MAT α , pep4::His3,prb1- Δ 1,6R,his3- Δ 200,lys2-801,trp1- Δ 101,ura3-52(can)] [Sigma genotype pep: HIS prb- Δ 1.6HISlys2-801 trp1- Δ 101 ura3-52 gal2 can1]. It was kindly donated by Dr E. Topp, Agriculture and Agri-Food, London, Canada. *S. cerevisiae* was co-transformed with two separate plasmids: an expression plasmid which contains the CUP1 metallothionein promoter inducible with CuSO₄ fused to the human estrogen receptor cDNA [ERtrp(YePtrpER)] and a reporter plasmid containing two estrogen responding elements [E2.ura (YRpE2ura)] linked to the structural gene (*Lac Z* gene) for β -galactosidase. Following the activation of *Lac Z* gene in the presence of estrogenic-active compounds, β -galactosidase coupled to the Gal-ScreenTM substrate generates glow light emission kinetics that is measured in a Luminoskan Ascent[®] microplate luminometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Yeast transformants synthetic complete medium was derived from the medium previously described by Gaido and collaborators (1997), with few modifications available in the supplementary material. Estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), 17 α -ethinylestradiol (EE2) (Sigma-Aldrich) served as the positive control. For YES-assay, stock concentrations of E2 were 5 mM. All other hormones were prepared as

10 mM stock solution. Since 17 β -estradiol (E2) is the main natural human estrogen (McDonnell et al., 1991), it was used as a standard. For each assay, E2 standard curve was performed by diluting 17 β -estradiol stock solution into ultrapure water (0.001 - 50 nM). In addition to that, positive (10 U of β -galactosidase (Sigma G-5635)) and negative (ultrapure water) controls were performed in parallel. The detailed experimental procedure of YES-assay is available in the Supplementary Material.

Dose-response curves for standards and environmental samples were calculated in SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA) using a four-parameter sigmoidal Hill equation. Estradiol equivalents (nmol L⁻¹) of the samples were calculated based on a sigmoid logistic equation determined using the Ascent Software 2.6 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). To be consistent with the concentration value obtained by the chemical analysis, the molar concentration of each sample was then converted into ng E2 L⁻¹ using the molecular mass of E2 (272.382 g mol⁻¹).

4.2.9 Statistical analysis

A nonparametric test, Wilcoxon/Kruskal–Wallis, was performed to assess differences between WWTP results. Relationships among chemical analysis and their relationships with YES-assay data were supported by nonparametric Spearman rank correlation coefficients. The statistical analyses were performed using JMP IN 8.0.1 statistical packages (SAS Institute Inc., 2009).

4.3. Results and discussion

4.3.1 Sample filtration

Recent reviews (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011a; Mompelat et al., 2013) demonstrate the needs for more rigorous sample preparation, (storage conditions, filters materials, evaporation condition) and the lack of standardisation to achieve best recoveries and ensuring the integrity of a sample. To circumvent this problem, the impact of filter material of the selected compound in the initial step was tested in HPLC grade water. An earlier study demonstrated that the recovery values in affluent wastewater were similar than in the HPLC water except for the most hydrophobic compounds (Fayad et al., 2013). Thus,

it is recognized that a few selected compounds can interact with the dissolved organic matter and the SPM and then have significant impact on the filtration recovery. However effluent wastewater is post-treatment and therefore somewhat less “loaded” than influent (raw sewage) so that the result from the HPLC water was deemed a reasonable estimate.

For certain filter materials, the recovery drops to near 0 for some compounds, these results are in agreement with other studies (Fayad et al., 2013; Darwano et al., 2014). This could be attributed to stronger interactions mainly governed by hydrophobic interactions and solvation effects between the filters materials and the selected compounds (Acuña et al., 2015). However, the interactions mechanism is complex and not completely understood.

Indeed, it has been demonstrated that the sorption is dependent on the filter materials, physicochemical properties, solution chemistry, membrane operating conditions as well as membrane morphology (Acuña et al., 2015). For our targets compounds, GF showed the best compromise with the recoveries obtained above 73% for all target analytes except for TAM (50%). This compound generally showed poor recoveries for all studied filters except nylon which had a good recovery (78%). The standard deviations for GF were moderate and ranged from 1 to 26%. All recovery results are shown in Supporting Information All recovery results are shown in Supporting Information (**Table S4**). For these reasons, GF was selected for further experiments.

4.3.2 Extraction and clean-up procedure

A number of different techniques are available to extract the targeted compounds in different solid matrices (Martín et al., 2010; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011c; Berlioz-Barbier et al., 2014a; Darwano et al., 2014b; Albero et al., 2015a). Ultrasonic solvent extraction (USE) was selected because it is generally carried out at room temperature, unlike pressurized liquid extraction (PLE) which requires higher temperatures. We can therefore expect lower degradation processes in USE than PLE considering that it has previously demonstrated that some of our target compounds are not stable at temperatures above 40°C (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011a). Furthermore, USE is fast, simple, inexpensive and does not consume large volumes of solvent. The USE extraction

conditions were selected from a previous study, in which 12 EDCs were determined in solid matrices (Darwano et al., 2014b) with some further modifications. A suitable extraction solvent is needed to minimize the matrix effects that may cause signal suppression or enhancement for mass spectrometry and to achieve good recovery on a wide range of compounds with different physicochemical properties.

Another challenge, in the case of organically-based solvent extraction, is the need to insure compatibility with the clean-up step knowing that in most case, the organic solvent cannot be used as a load solvent in the solid phase extraction (SPE). Thus, some compromises are usually required, especially the addition of an evaporation step before the SPE procedure. Different solvents (methanol, acetonitrile and acetone) and binary solvent combinations were tested (data not shown). The final selected procedure was two cycles of 20 min in an ultrasonic bath using a mixture of methanol and acetonitrile (1:1, v/v) with 1% formic acid. To reduce the matrix effects and pre-concentrate the sample so as to obtain environmentally relevant limits of detection, we implemented a sample clean-up by SPE for the water sample and after the extraction for solid samples. Online SPE shows less variation in the results due to less manipulations and human interventions and is certainly easier to use in routine analyses (Brouwer et al., 1995). However, it reduces the flexibility of the preparation protocol, takes more time to develop and optimize and will usually have less performing detection limits. For this reason, off line SPE was used. Different cartridges were previously tested (results not shown) and strong cation-exchange mixed-mode phase (Strata X-C) was selected because it allows ionic and hydrophobic interactions, making it possible to study multiple classes of CECs. The recoveries of the SPE step are presented in **Table 4-2**. In the wastewater matrix, 28 molecules had a recovery between 70 and 122 %, and 3 others had recoveries between 43 and 61 %. The variation of the recoveries is presented as the standard deviation (SD). For 11 molecules, RSD values were inferior to 10 %. 13 RSD values ranged from 12 to 23 % and 7 molecules had a RSD between 26 and 65%. In solid fractions, 28 molecules had a recovery between 70 and 100%, 2 others had a recovery of 62% while a poor recovery was obtained for E3 (27%). The RSD values were less than 22% for all compounds. Thus, the presented protocol can be considered repeatable and quantitative for the studied molecules. The use of a sorbent allowing various retention

modes coupled to multiple elution steps with different solvents allows the extraction of molecules presenting a variety of chemical and physical properties.

4.3.3 LC parameters

A C18 column was used for separation. Different studies showed the usefulness of that type of columns for the separation step, before the detection step (Shah et al., 2012; Wang et al., 2013; Imbert et al., 2014). The use of sub 2 micron particles yields a higher number of theoretical plates resulting in a better chromatographic separation. To have a robust quantification, it is necessary to obtain enough acquisition points per peak, at least 10-15 are required (Rodriguez-Aller et al., 2013). Indeed, the growing needs in chromatographic performance especially in terms of analysis time and resolution lead to the development of ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) (Guillarme et al., 2010) producing narrower peaks. With a Q-Exactive, an enhancement of resolution is obtained by a loss of acquisition frequency and using UHPLC as separation method allows narrower peaks. A typical order of magnitude of peak width at baseline with this method was between 10 and 30 sec. This is normally wide enough to obtain enough acquisition points but it can be a limiting factor, especially for the tiniest peaks, when there is a need for higher resolution power. Higher resolution permits a better discrimination between a compound and an interfering component, but this discrimination can also be obtained with a better chromatographic separation, i.e. thinner peaks. It can also be a problem when multiple molecules are coeluting and it becomes necessary to overlap multiple acquisitions in MS². Broader peaks are more difficult to detect from the noise and can entail higher MLD. It is necessary to find a compromise between the resolution, the peak width and the MLD. The compromise should be determined as a function of the type of matrix studied and the objective of analysis: qualitative or quantification. This type of problems has already been reported for another type of Orbitrap-based HRMS coupled with an UHPLC system using sub 2 microns packed columns (Dunn et al., 2008).

Preliminary work in this study showed that BPA can only be detected in negative ionisation mode. Given that the amounts released can be significant and it is a known EDC (Sanchez-Avila et al., 2009), this meant that it was necessary to use a mobile phase that

permits proper ionisation in both positive and negative. For this reason, an aqueous phase with the addition of 5 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ was used. This kind of mobile phase has already been used and proven useful for the ionisation of basic analytes allowing a major gain in sensitivity (Lajeunesse et al., 2008a).

It was not possible to use the corresponding ²H or ¹³C labelled molecules as IS for all the studied molecules. If the IS was available, it was used for the corresponding molecule. If it was not available, the chosen IS had to satisfy the following conditions: the same ionisation mode, a close retention time, and the best compensation of the signal fluctuations, i.e. the highest R².

4.3.4 HRMS optimization

An atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source and a heated electrospray ionisation (HESI) source were compared for all compounds by infusing individual solutions for each molecule. The concentrations were set to 1 mg L⁻¹ and the flow rate was set to 25 μL min⁻¹. Cholesterol, coprostanol were not detected when the HESI source was used, neither in positive nor in negative mode. A loss of signal was observed for some molecules using the APCI source (diazepam, benzoylecgonine, desvenlafaxine, fluoxetine, tamoxifene, venlafaxine, norfentanyl, fentanyl, cocaine, mephedrone, methylephedrine and MDMA), but it was satisfactory for most of the target analytes.

When a multi-residue method is developed using a mass spectrometer as detector, it is usually necessary to find a compromise between all the molecules to select the ionisation source and the ionisation mode. Some molecules can be detected in either PI or NI mode. In the case of the elution of multiple analytes in a narrow time window, it is preferable to minimize the use of both ionisation modes at the same time for quantification while using the MS² mode. Indeed, the switch between the two ionisation modes is not fast enough to yield a satisfactory number of points per chromatographic peak to allow proper quantification. If it was possible to fully separate all these molecules, the best ionisation mode for each molecule could be used. However, complete separation of all the molecules in an acceptable run time could not be achieved. In the case of two or more molecules with a close retention time and different ionisation mode, it is necessary to find a compromise.

For example, BPA and oxazepam have approximately the same retention time and BPA cannot be analysed in positive ionisation mode, so oxazepam was analysed in negative mode although this analyte gives a higher signal using PI mode. Given that our NH_4HCO_3 mobile phase is uncommon in the literature, some of our ionisation mode - compounds combinations are somewhat different from what is usually expected.

The chosen acquisition for the analysis of the selected compounds in wastewater was the MS^2 because this method gave better results by improving detection of the ions of interest as shown in **Fig. S2**. In the solid fraction, the chosen acquisition was the full scan MS mode allowing the quantification of all target analytes including several compounds that were not quantifiable in the wastewater with the full scan mode. It is clear that the wastewater is a more complex matrix as shown in **Figs. S2 and S3**. Thus, a better selectivity is necessary and hence the MS^2 mode was chosen for the wastewater matrix. Moreover, to improve the detection of the ions of interest, in full scan mode, estriol and methylparaben were analysed in negative mode since their detection in positive mode is characterized with higher noise, thus making their detection more difficult and resulting in an increase of false positive signals, as illustrated in **Figs. S4 and S5**.

The maximum usable resolution power of the HRMS, for quantification, is related to the chromatographic separation and the peak width. It was not possible to work at a higher resolution power than 17,500 FWHM on the MS^2 mode and at 70,000 FWHM on the full MS scan mode. When multiple analytes have close retention times, the mass spectrometer makes multiple acquisitions simultaneously which leads to a lower number of points for each molecular peak on MS^2 . The isolation window of the quadrupole was set at ± 2 m/z except for CHO and COP where the isolation window was set ± 1 m/z. When the isolation window is smaller, it can increase selectivity by filtering more potentially interfering components from the matrix, but a small isolation window can also lead to a lower or loss of signal.

4.3.5 Data analysis and validation

To determine the performance of the analytical method, the next parameters were determined: linearity, precision, accuracy, and matrix effects. The method was applied to real wastewater samples and five point matrix-matched calibration curves were obtained. Three calibration curve levels were necessary in wastewaters because of the different initial concentrations in the real samples. The orders of magnitude were determined by the literature and preliminary analysis. The same curves were also prepared in HPLC grade water to determine the matrix effects. The mass tolerance window was set to 5 ppm in both positive and negative ionisation mode. This value has already been used and discussed by different authors. (Fedorova et al., 2013b; Sollicet et al., 2015b). The results are presented in **Tables 2 and Table S3**. All curves showed a good linearity with R^2 values ranging from 0.991 to 0.999. The MLD and the MLQ were calculated from the calibration curves and defined respectively as three and ten times the standard deviation of the y-intercept divided by the slope of the calibration curve. The method used is conservative and depends on the ranges used for the calibration curve. It can explain some high MLD but could be lower if calculated in a hypothetical clean matrix. The MLDs are shown in **Table 4-2** and range from 0.5 to 104 ng L⁻¹ in wastewater and from 0.4 to 3.7 ng g⁻¹ in solid particulate matter. The matrix effects in mass spectrometry are well recognized but remain poorly understood (Antignac et al., 2005). A positive value means a signal enhancement and negative value means signal suppression. Significant matrix effects, superior to 50 % in absolute value, were observed for seven compounds (caffeine, desvenlafaxine, mephedrone, carbamazepine, venlafaxine, ethinylestradiol and estrone) in wastewater and for five compounds in the solid fractions (desvenlafaxine, estrone, tamoxifen, cholesterol and coprostanol). The results for the SPE extractions were judged acceptable with recoveries ranging from 43 to 122% for the municipal wastewater. Poorer recovery were achieved for sulfamethoxazole and tamoxifen (as low as 43%), whereas the recovery for all other compounds were between 61 and 122%. For the solid fraction, the recovery ranged from 62 to 102% excluding estriol whose recovery was 27%. Accuracy and precision are presented in **Table S3**. The accuracy values ranged from 82 to 123% in wastewater matrix and from

67-133% in solids. The intra-day and inter-day precision were lower than 25 % for all molecules and every matrix.

Table 4-4. Method validation parameters for the selected MS modes for each matrix including coefficient correlation (R^2), the MLD, the recovery and the matrix effect.

Compound	WWTP Effluent				Solid fraction			
	R^2	MLD (ng L ⁻¹)	Recovery (%) ± SD (n=3)	Matrix Effect (%)	R^2	MLD (ng g ⁻¹)	Recovery (%) ± SD (n=3)	Matrix Effect (%)
SMX	0.998	3	43 ± 6 ^a	5	0.997	1.5	62 ± 5 ^d	-30
CAF	0.998	104	81 ± 6 ^b	-78	0.999	1.1	88 ± 1 ^d	-15
BZE	0.999	8	95 ± 2 ^a	-11	0.997	1.7	87 ± 4 ^d	-45
DEA	0.996	1	93 ± 3 ^a	-4	0.995	2.0	87 ± 3 ^d	-41
MP	0.991	19	106 ± 7 ^a	-27	0.997	1.5	88 ± 5 ^d	-44
4-MP	0.999	5	97 ± 2 ^a	3	0.997	1.5	89 ± 1 ^d	-38
MDMA	0.999	3	77 ± 6 ^a	-6	0.995	2.1	77 ± 3 ^d	-38
DES	0.999	47	122 ± 12 ^a	99	0.997	1.5	92 ± 4 ^d	133
NOR	0.998	0.5	98 ± 3 ^a	4	0.997	1.7	72 ± 6 ^d	-43
E3	0.999	16	114 ± 26 ^a	-28	0.996	1.5	27 ± 6 ^d	-15
4-MMC	0.999	8	91 ± 5 ^a	133	0.998	1.3	87 ± 6 ^d	-48
CBZ	0.996	6	95 ± 2 ^a	-51	0.993	2.4	62 ± 1 ^d	-31
ATZ	0.997	0.5	86 ± 1 ^a	-22	0.996	1.8	88 ± 4 ^d	-36
VEN	0.997	39	79 ± 7 ^c	61	0.998	1.1	99 ± 8 ^d	-42
COC	0.993	7	107 ± 5 ^a	5	0.994	2.1	87 ± 1 ^d	-43
DCF	0.998	18	89 ± 10 ^a	3	0.995	2.1	91 ± 9 ^d	-49
OXA	0.996	20	96 ± 7 ^a	16	0.996	0.6	87 ± 10 ^d	-46
BPA	0.994	30	101 ± 8 ^a	-48	0.999	0.8	71 ± 4 ^d	-33
EE2	0.994	11	91 ± 9 ^a	-56	0.995	1.1	88 ± 2 ^d	-29
E2	0.995	10	90 ± 4 ^a	3	0.999	0.3	78 ± 4 ^d	-25
DIA	0.997	6	101 ± 3 ^a	-17	0.999	1.1	96 ± 3 ^d	-22
E1	0.998	6	76 ± 1 ^a	-51	0.995	3.7	87 ± 19 ^d	-51
NORE	0.998	11	111 ± 11 ^a	-7	0.998	1.4	102 ± 15 ^d	-18
TES	0.997	1	122 ± 15 ^a	23	0.998	0.4	94 ± 9 ^d	-43
LEVO	0.997	15	94 ± 4 ^a	-16	0.997	0.6	87 ± 10 ^d	-35
FEN	0.994	9	92 ± 3 ^a	-5	0.995	2.1	100 ± 8 ^d	-17
FLUO	0.997	22	94 ± 7 ^a	-21	0.997	1.4	90 ± 6 ^d	-28
PRO	0.997	6	109 ± 7 ^a	-34	0.999	1.1	94 ± 8 ^d	-9
TAM	0.991	4	47 ± 28 ^a	-21	0.995	1.1	77 ± 7 ^d	-168
CHO	0.997	47	70 ± 17 ^c	-12	0.993	2.6	84 ± 5 ^c	95
COP	0.992	45	61 ± 16 ^c	-4	0.997	2.0	91 ± 5 ^c	177

^a Recovery 500 ng L⁻¹

^b Recovery 25 µg L⁻¹

^c Recovery 2.5 µg L⁻¹

^d Recovery 50 ng L⁻¹

^e Recovery 200 ng L⁻¹

4.3.6 Application of chemical analytical methods to real samples

The presented analytical method was applied to real samples from two different wastewater treatment plants (WWTPs) in Quebec, Canada. These two wastewater treatment plants used different types of treatments. WWTP-1 uses a primary treatment and WWTP-2 supplements its primary treatment with an UV treatment for six months per year (from mid spring to fall). The results for the selected CECs in different matrices are presented in Table 3. Sixteen compounds were detected in both wastewater samples with concentrations above the MLQ in almost all the samples. These molecules were cholesterol, coprostanol, venlafaxine, desvenlafaxine, caffeine, benzoy lecgonine, cocaine, carbamazepine, bisphenol A, oxazepam, diclofenac, estrone, testosterone, progesterone and methylparaben. Some compounds (atrazine and desethylatrazine) were quantified in significantly higher concentrations in the WWTP-1 and barely detected in the WWTP-2 while norfentanyl was only detected in the WWTP-2 and MDMA is detected at low concentrations for both WWTPs but with significantly higher concentrations for WWTP-2. WWTP-1 is recognized to have a significant input of rain from mixed sewer and aqueduct water losses to the sewers and hence the difference in concentration is attributed to this dilution, rather than to difference in consumption or WWTP treatment efficiencies. For both WWTPs, the concentrations of the molecules at the beginning of the month of April seem somewhat lower than throughout the 5 months for the majority of quantified CECs (Fig. S6). We attribute the seemingly lower concentrations in April to spring snowmelt and higher inputs of water to dilute the concentrations. The concentrations levels we observe are comparable with those reported earlier in wastewaters (Bijlsma et al., 2009; Sanchez-Avila et al., 2009; Metcalfe et al., 2010a; Daneshvar et al., 2012; Gracia-Lor et al., 2012; Rua-Gomez and Puttmann, 2012; Andrasi et al., 2013; Campo et al., 2013; Fayad et al., 2013; Yuan et al., 2013; Vergeynst et al., 2015).

Table 4-5. Mean concentration and standard deviations of the selected CECs in surface waters (n=6), in the effluents of two municipal wastewater treatment plant in Quebec (i.e WWTP-1 (n=19) and WWTP-2 (n=20)) for a period of five months, the corresponding SPM and nearby sediments (n=6). ^a

Compound	Water matrix (ng L-1)			Solid fraction (ng g-1)			
	WWTP-1	WWTP-2	surface water	WWTP-1	WWTP-2	surface water SPM	Sediments
SMX	15 (8)	95 (50)	1.4 (0.07)	n.d	n.d	n.d	n.d
CAF	13417 (6033)	27205 (9824)	208 (305)	1162 (545)	1525 (835)	98 (42)	<MLQ
BZE	275 (110)	510(225)	10.1 (n.a)	27 (17)	34 (19)	n.d	n.d
DEA	13 (5)	3 (1)	22 (5)	n.d	n.d	n.d	n.d
MP	306 (256)	453 (199)	11.4 (n.a)	235 (352)	178 (264)	143 (91)	n.d
4-MP	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
MDMA	14 (9)	6 (4)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
DES	246 (94)	1815 (844)	34.4 (n.a)	33 (16)	131 (73)	n.d	n.d
NOR	n.d	2.5 (0.7)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
E3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
4-MMC	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
CBZ	64 (24)	217 (69)	<MLQ	369 (909)	381 (1379)	n.d	n.d
ATZ	13 (7)	6 (7)	21 (4)	n.d	n.d	n.d	<MLQ
VEN	226 (63)	1096 (557)	5.1 (n.a)	23 (23)	25(13)	n.d	n.d
COC	112 (63)	278 (50)	4.0 (n.a)	12 (3)	14 (7)	n.d	n.d
DCF	40 (22)	32 (17)	2 (1)	n.d	n.d	n.d	n.d
OXA	15 (7)	348 (153)	1.3 (n.a)	14 (5)	27 (12)	n.d	n.d
BPA	593 (412)	356 (467)	60 (21)	8045 (4552)	4505 (4033)	3355 (2072)	15 (n.a)
EE2	17 (n.a)	11 (6)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
E2	n.d	n.d	n.d	93 (77)	102 (42)	n.d	n.d
DIA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
E1	25 (6)	46 (14)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
NORE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
TES	9 (7)	17 (13)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
LEVO	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
FEN	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
FLUO	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
PRO	17 (9)	12 (6)	1.9 (0.7)	7 (4)	5 (3)	<MLQ	n.d
TAM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
CHO	1194 (886)	3168 (1960)	85.1 (63)	134 (35)	144 (53)	10 (1)	193 (183)
COP	992 (736)	3684 (2039)	29 (28)	22 (16)	19(10)	n.d	15(n.a)

^a n.d.: Not detected (<MLD); n.a not available

In wastewater SPM samples, thirteen compounds were detected at concentration ranging from several ng g⁻¹ to a few µg g⁻¹. The compound indicating the highest particulate concentration was bisphenol A (average 6230 ng g⁻¹), which was followed by caffeine (average 1350 ng g⁻¹), carbamazepine (average 375 ng g⁻¹), methylparaben (average 207 ng g⁻¹), cholesterol (average 139 ng g⁻¹), estradiol (average 100 ng g⁻¹), desvenlafaxine (average 86 ng g⁻¹), benzoylecgonine (average 30 ng g⁻¹), venlafaxine (average 24 ng g⁻¹), oxazepam (average 23 ng g⁻¹), coprostanol (average 20 ng g⁻¹), cocaine (average 13 ng g⁻¹) and progesterone (average 6 ng g⁻¹). As shown in **Fig. S7**, there does not seem to be a clear time trend in terms of concentration of the selected compounds in SPM

Solid water distribution coefficient K_d (L Kg⁻¹) is defined as the ratio of contaminant concentration in the solid fraction (C_s , µg Kg⁻¹) to the contaminant concentration in the aqueous phase (C_w , µg L⁻¹). Solid particulate matter sorption coefficient in wastewater effluent for twelve selected compounds are shown in **Fig. 4-1** and Table S-3. It was not possible to illustrate a K_d value for all compounds since some compounds were not detected either in the solid fraction or in the aqueous phase. The compound which seems to possess the highest affinity for accumulation on suspended particulate matter from municipal wastewater was bisphenol A (mean log K_d = 4.19 L Kg⁻¹) while the compound which had the smallest was coprostanol (albeit some of the compounds that were not detected most certainly had low affinity for SPM). In this study, no evident correlation was found between hydrophobicity and the concentration of the selected compounds in the SPM. These results are in agreement with other studies that have determined little or no correlations between the K_d values and the octanol-water partition coefficient (log K_{ow}) (Kinney et al., 2006; Okuda et al., 2009). This could be because the mass fraction of organic carbon (f_{oc}) is not the only factor controlling the sorption of CECs in solid fraction. It has been demonstrated that the K_d values depend on the treatment used during the whole water treatment process especially when coagulating agents are added (Morissette et al., 2015a). Furthermore, the f_{oc} in the SPM sample is unknown and difficult to measure because very little material is available. Another confounding factor explaining the lack of relationship between K_d and K_{ow} is that the

recognized influence of K_{ow} is derived mainly from work with lipophilic compounds – when comparing molecules that have relatively low lipophilicity – the other functional groups and molecular characteristics of the compounds will affect its tendency to sorb to various solids – rather than the relatively weak attraction to organic matter that would be correlated to K_{ow} (when $K_{ow} < 2$) (Morissette et al., 2015a).

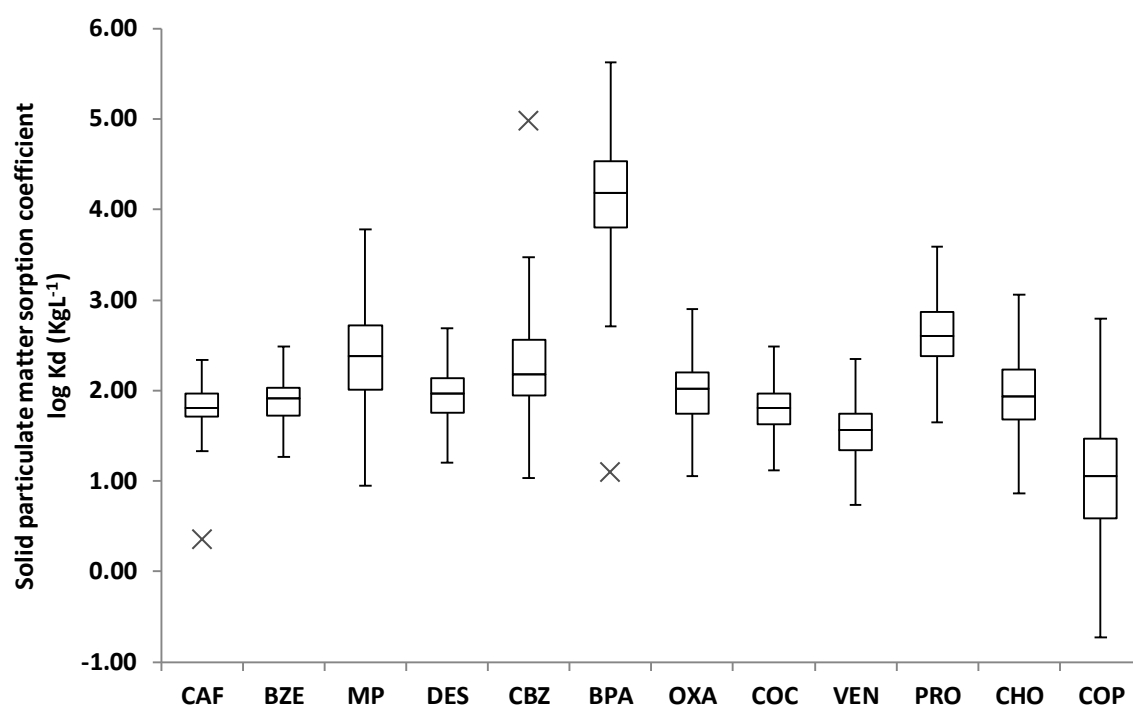


Fig 4-1. Solid particulate matter sorption coefficient (K_d) in wastewater are illustrated using box plots with $n=39$. The center horizontal lines marks the median of the samples, the length of each box shows the range within 75% of the values fall, and the whisker represent the limits of the inner fence and outliers are shown as asterisks.

In surface waters, sixteen of the selected compounds were detected at much lower level than those determined in the wastewater (except for atrazine and its metabolite desethylatrazine – which were already close to background even in wastewater samples). These results are not surprising since little or no agricultural effluents are routed within the

studied municipal wastewaters or discharged in the sampled receiving waters. Similarly, the SPM from surface samples contains far less CECs. Indeed, only five selected compounds were detected at levels ranging from 3 to 4986 ng g⁻¹. In the sediments, only four compounds were determined at higher concentration than the LOQ. This may seem surprising, knowing that bottom sediments may act as sinks where CECs could persist for long periods of time. However the sediment samples were coarse and sandy and thus provided only a small organic or mineral fraction that could help sorb and retain contaminants and thus resulted in a very low *f_{oc}* and little sorption of CECs. The sampled sediments are probably not representative of sedimentation zones where freshly released SPM would accumulate.

Furthermore, as discussed earlier, a consequence of using a multi-residue method leads us to make some compromise which may cause a lower performance for some of the selected compounds. At first glance, few steroid hormones were detected in our samples of wastewaters and were associated to solids using the compromise multi-residue method. Given the strong endocrine-disturbing potency of steroidal hormones, we also used an alternate method for these compounds (Fayad et al., 2013) that we applied to the extracts of the suspected samples and adapted to a TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific). The MS² optimized parameters for the analysis of selected steroid hormones can be found in the supporting information (**Table S2**).

Ethinylestradiol was not detected with the Q-Exactive but detected at relevant level in many samples from WWTP-2 using the LC-MS² method. Finally, progesterone and testosterone were detected by both devices without statistically significant differences between both series with a Turkey's b post hoc ANOVA for P values of < 0.05 as shown in **Fig. 4-2**.

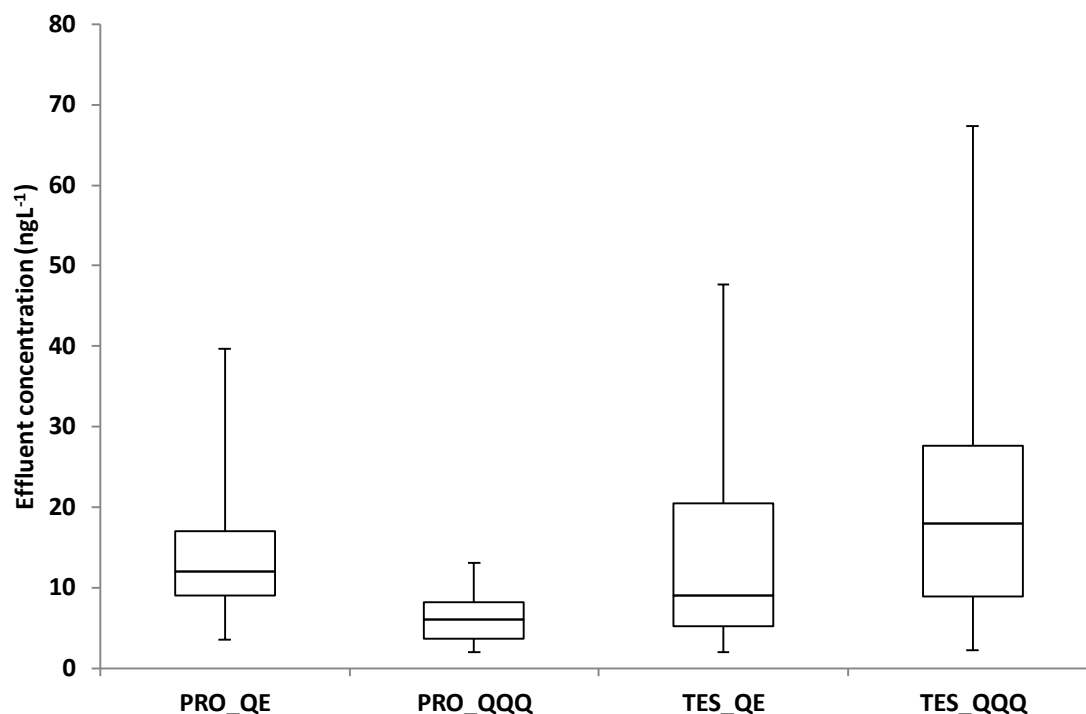


Fig. 4-2. Comparison of concentrations of progesterone (PRO) and testosterone (TES) in wastewater effluents measured using a Q-Exactive orbital ion trap (QE) in MS² mode and a TSQ-Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (QQQ) illustrated using box plots with n=39. The center horizontal lines marks the median of the samples, the length of each box shows the range within 75% of the values fall, and the whiskers represent the maximum and the minimum.

4.3.7 Evaluation of YES Assay on real samples

4.3.7.1 Method validation

To more precisely define the potency of the various estrogens in strain BJ3505, hER, 2ERE, a dose-response experiment, with varied concentrations of pure estrogenic compounds, was performed and the resulting curves are shown in **Fig. S8**. *S. cerevisiae* strain exhibit increased β -galactosidase activity when incubated with E1, E2, E3, EE2. The majority of dose-response curves of the various compounds listed above was fitted with a typical sigmoid curve. The S-shaped curves had clearly a better fit for E1, E2, E3 and EE2, which were the most potent endocrine disrupting compounds (Snyder et al., 1999b). The

chemiluminescence increased exponentially from 0.01 to 5 nM for E2 and EE2 and from 1 to 500 nM for E1 and E3, then remained at a constant level until 10 000 nM. The chemiluminescence decreased beyond 50 000 nM. (Fig. S8).

In order to validate the existence of a mathematically straight-line relationship between the observed values and the true concentrations, the linearity zone of E2 was evaluated (Figure S-4, $r^2 > 0.90$). The E2 linearity zone ranges from 0.01 to 10 nM and was represented by five concentration levels as recommended by the Clinical Laboratory Standard Institute. Accordingly, E2 is the best estrogenic ligand which can be used as standard to evaluate the estrogenic activity of different samples. The detection limit was estimated by multiplying the standard deviation mean of ten replicates of E2 standard at a concentration of 0.1 nmol L⁻¹ by 3. The detection limit in the reference to E2 was 1.4 ng L⁻¹ (0.96 - 2.4 ng L⁻¹).

The EC₅₀ is the concentration of a chemical at which the assay is active at half-maximum values and was used to compare different types of assays. The EC₅₀ of EE2 (0.0256 µg L⁻¹) was lower than the EC₅₀ of E2 (0.158 µg L⁻¹), E1 (3.09 µg L⁻¹), and E3 (35.2 µg L⁻¹), indicating a higher sensitivity of EE2 with the yeast strain BJ3505, hER, 2ERE.

4.3.8 Application of YES-assay to real wastewater samples

The analyses were carried out weekly for a period of 5 months. This represented 19 effluent samples and the corresponding SPM for the WWTP-1 and 20 samples for the WWTP-2. All samples were prepared in triplicate for YES-assay. An endocrine disrupting potential was detected in all effluent samples analyzed with YES-assay and we obtained estradiol equivalent concentrations ranging from 4.4 to 72 ng eq E2 L⁻¹ for the WWTP-1 and 6.5 to 42 ng eq E2 L⁻¹ for the WWTP-2. (Fig. 4-3). Although there have presence of higher concentration to WWTP-1, there was no significant difference between the two WWTPs with mean values of 22.99 ± 21.02 ng eq E2 L⁻¹ for WWTP-1 and 15.39 ± 9.75 ng eq E2 L⁻¹ for WWTP-2. The levels of estrogenic activities observed in this study are also

consistent with those observed in Canadian (Atkinson et al., 2012a) and international wastewater treatment plant (Allinson et al., 2010). However, as we mentioned for chemical analysis, we observed higher variations in YES-assay results for WWTP-1 that we attribute to a greater rainwater intake in wastewater that results in a higher and more variable dilution.

Generally, significant relationships were observed between the concentrations of EDCs measured in wastewater by chemical analyzes and the response of bioassay using yeast (Nelson et al., 2007; Balsiger et al., 2010; Brix et al., 2010). Several chemicals measured in this study are known to be endocrine disruptors, for example, estrone, progesterone testosterone, norethindrone, carbamazepine, methylparaben, coprostranol and ethynylestradiol. In our study, when we consider the overall results, no significant correlation was observed between ECs measured in wastewater and the results of YES-assay. However, when separating the results of both cities, positives correlations were observed between YES-assay and progesterone, testosterone and diclofenac concentrations in WWTP-1 (**Table 4-4**). For WWTP-2 we observed negative relationship between YES-assay results and ethynylestradiol, and progesterone concentrations (**Table 4-4**). The concentration of EDCs and other chemical substances are generally higher in WWTP-2, it is possible that this causes an inhibition of yeast growth in the samples and thus reduced the detection of estrogenic activity by the YES-assay (Bistan et al., 2012). Another hypothesis is the presence of higher concentration of unidentified anti-estrogenic substances in WWTP-2 that could be responsible for approximately a 50% reduction in estrogen-induced activity in WWTP effluent and would thus need to be consider in the net estrogenic activities (Buckley, 2010).

Table 4-4. Spearman's correlation coefficient between YES-assay and chemical analysis (*P<0.1; **P<0.05; ns = none significant).

	YES-assay WWTP-1	YES-assay WWTP-2
PRO	0.46**	-0.42*
TES	0.43*	ns
DCF	0.45*	ns
EE2	ns	-0.50**

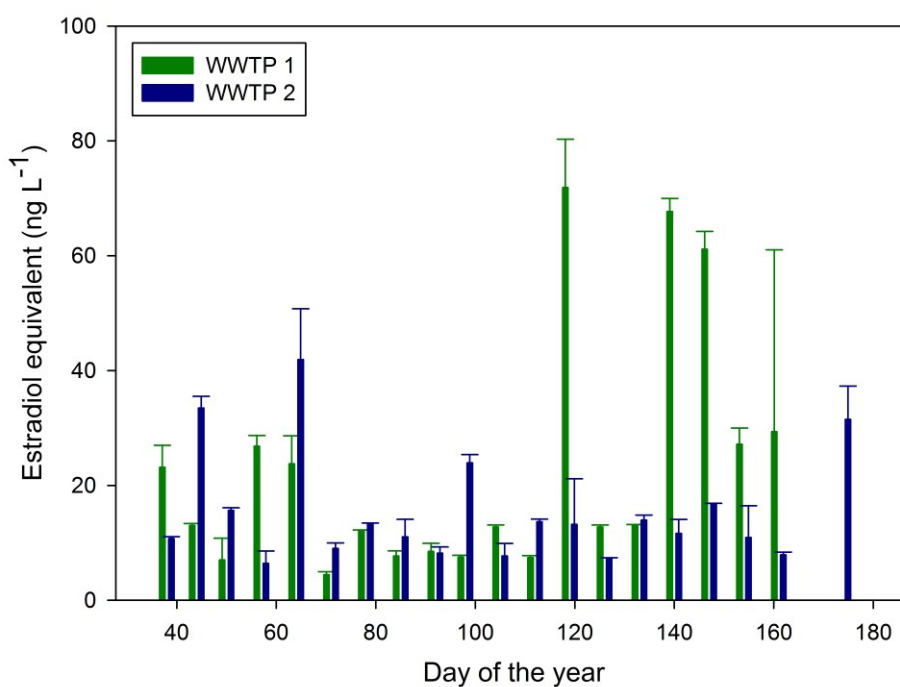


Fig 4-3. Estradiol equivalent concentrations measured with YES-assay for wastewater effluents (ng L⁻¹) in WWTP-1 and WWTP-2 for a period of 5 months.

4.4. Conclusion

We proposed a new analytical method allowing the determination of 31 compounds in municipal wastewater effluents, surface waters, sediments and suspended particulate matter by using a two-cycle extraction followed with a SPE preparation step and UHPLC coupled to HRMS. It was shown that using a SPE sorbent allowing different retention processes and multiple elution steps was helpful to extract a large set of molecules presenting a wide range of physicochemical properties. Coupling of UHPLC with HRMS and the associated problems were discussed. The entire method showed good recoveries for the studied compounds. The analytical step was validated and showed good linearity, precision, accuracy and environmentally relevant MLD for many of the studied molecules. The entire method was applied to real samples, coming from two different WWTPs in Quebec and their associated receiving surface waters. The results confirmed that the suspended fraction is directly involved in the environmental fate of a wide range of compounds; however the interaction allowing the sorption of organic contaminants is complex and needs further study (Ferrando-Climent et al., 2014). Because environmental samples will need to be screened for their estrogenicity, the development of a direct bioassay measure capable of handling a large numbers of samples timely and cheaply was necessary. The YES-assay was demonstrated to be an effective, sensitive, and reliable method allowing a direct measure of EDCs and pre-screening tool for monitoring of the chemical status of wastewater treatment plants.

Acknowledgements

This work was made possible through the financial support from the Canadian Water Network, MITACS (Veolia – IT03368) and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC–RGPIN-2015-05729). Our special thanks to Charles Gauthier for sampling.

Appendix A. Supplementary data

Yeast transformants synthetic complete medium was derived from the medium previously described by Gaido et al., [4]. Growth medium contained yeast nitrogen base without amino acids (6.7 g L⁻¹) supplemented with dextrose (20 g L⁻¹), copper II sulfate (0.025 g L⁻¹) and a drop-out amino acids mix powder without uracil and tryptophan (1.31 g L⁻¹). All the ingredients were purchased from Sigma-Aldrich (Canada), Fisher Scientific or Acros Organics. Growth medium was filter sterilized through a 0.22 µm filter into a sterile container and stored at 4°C.

Experimental procedure of YES-assay

- Pick a single yeast colony in the yeast growth medium and incubate culture overnight at 30°C in an orbital shaker at 100 rpm.
- Dilute the overnight culture to an optical density of ~ 0.15 (±0.01) at 600 nm (O.D.₆₀₀) and incubate the fresh culture at 30°C until it reached an O.D.₆₀₀ of ~ 0.20 (±0.01) (about 2 hours of incubation).
- An aliquote yeast culture in log phase growth into 2 mL-Eppendorf tubes at 1 mL per tube. Harvest the cells by centrifugation at 5000 rpm for 10 min.
- Suspend the pellet in 250 µL of 4× concentrated yeast growth medium and 750 µL of standard or sample. It is important to note that samples were not extracted, concentrated, or sterilized.
- Incubate the culture at 30°C in an orbital shaker at 100 rpm for 2 hours.
- Transfer 100 µL from each vortexed culture to an opaque 96-well plate. Add 100 µL of diluted Gal-Screen™ substrate to each well and cover the plate with a Nunc™ Sealing Tapes (Thermo Scientific).
- Incubate the plate 75 min at 27°C under agitation (960 rpm) on a Luminoskan Ascent® microplate luminometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Measure the hormone-induced chemiluminescent signal.

Table S1. Average physicochemical analysis of the wastewater matrix for the year 2013. ⁹

	WWTP-1	WWTP-2
BOD₅	46 mg L ⁻¹	19 mg L ⁻¹
SPM	18 mg L ⁻¹	17 mg L ⁻¹
P_{tot}	0.4 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹

⁹Data available on
http://www.mamrot.gouv.qc.ca/pub/infrastructures/suivi_ouvrages_assainissement_eaux/Bilan_2013_Annexe_11_partie_2_L_Q.pdf

Table S2. Parameters for FS and MS² detection¹⁰

Compound	RT (min)	Mode	Calculated precursor exact mass (m/z)	experimental exact mass (Δ M)	NCE (%)	Quantification Transition (m/z)
SMX	0.82	+	254.0594	254.05990 (2.092)	35	156.01101
[¹³ C ₆]-SMX	0.82	+	260.0795	260.08009 (2.202)	35	162.03152
CAF	1.87	+	195.0877	195.08766 (0.040)	40	138.06604
[¹³ C ₃]-CAF	1.87	+	198.0977	198.09773 (0.068)	40	140.07285
BZE	2.10	+	290.1387	290.13900 (1.087)	35	168.1019
[² H ₃]-BZE	2.10	+	293.1575	293.15787 (1.211)	50	171.12076
MP	2.70	+	153.0546	153.05476 (0.910)	50	121.0287
[¹³ C ₆]-MP	2.75	+	159.0747	159.07489 (0.883)	50	127.04868
MP	2.75	-	151.0390	151.03991 (0.923)	n.a	n.a
[¹³ C ₆]-MP	2.75	-	157.0591	157.05928 (1.150)	n.a	n.a
DEA	2.80	+	188.0697	188.07020 (2.395)	35	146.0224
[¹³ C ₃]-DEA	2.80	+	191.0798	191.08026 (2.334)	35	149.03252
MDMA	3.35	+	194.1176	194.11788 (1.673)	30	163.07532
[² H ₃]-MDMA	3.35	+	199.1343	199.14903 (0.607)	30	165.08791
E3	3.34	-	287.1642	287.16531 (3.966)	n.a	n.a
E3	3.34	+	271.1698	271.16991 (2.140)	40	159.08044
4-MP	3.60	+	180.1383	180.13836 (0.384)	55	162.12743
[² H ₃]-4-MP	3.60	+	183.1484	183.15732 (1.087)	55	165.14651
DES	3.60	+	264.1964	264.19591 (0.395)	35	246.18524
DCF	3.63	+	296.0240	296.02447 (1.588)	40	215.04948
[² H ₅]-DCF	3.63	+	300.0491	300.04954 (1.466)	40	219.07384
NOR	3.66	+	233.1654	233.16488 (0.172)	50	84.08131
[² H ₅]-NOR	3.66	+	238.1794	238.19630 (0.321)	50	84.08126
4-MMC	3.78	+	178.1232	178.12227 (0.726)	30	145.08864
[² H ₃]-4-MMC	3.78	+	181.1316	181.14155 (0.437)	30	163.13075
CBZ	4.40	+	237.1028	237.10241 (0.719)	45	194.0960
[² H ₁₀]-CBZ	4.40	+	247.1656	241.16528 (0.257)	45	204.1591
ATZ	4.56	+	216.1010	216.10149 (2.267)	40	174.05375
[¹³ C ₃]-ATZ	4.56	+	219.1111	219.11155 (1.989)	40	177.06373
OXA	4.78	-	285.0431	285.04333 (2.800)	45	126.0115
[² H ₅]-OXA	4.78	-	290.0745	290.1104 (0.689)	45	246.0840
BPA	4.79	-	227.1072	227.10697 (1.382)	40	211.0753
[¹³ C ₁₂]-BPA	4.79	-	229.1128	239.14846 (3.178)	40	223.1160
COC	4.84	+	304.1549	304.15440 (0.215)	35	182.1175
[² H ₃]-COC	4.84	+	307.1737	307.17345 (0.928)	35	185.1364
VEN	4.87	+	278.2120	278.21157 (0.411)	25	260.0008
EE2	5.06	+	279.1743	279.17463 (1.032)	40	133.0647
E1	5.08	+	271.1698	271.16925 (-0.024)	40	133.0647
NORE	5.10	+	299.2011	299.20071 (0.513)	45	109.0647
E2	5.10	+	255.1749	255.17459 (0.972)	40	159.0804
[¹³ C ₆]-E2	5.10	+	261.1917	261.19395 (-1.722)	40	159.0804
DIA	5.12	+	285.0795	290.11000 (-1.040)	60	193.0886
[² H ₅]-DIA	5.12	+	290.1109	290.11000 (-1.040)	60	154.0417
TES	5.20	+	289.2168	289.21615 (-0.196)	50	109.0647
LEVO	4.28	+	313.2168	313.21623 (0.074)	30	245.1899
FEN	5.41	+	337.2280	337.22752 (0.237)	80	105.0698
[² H ₅]-FEN	5.41	+	342.2594	342.25839 (-1.268)	82	188.1434
PRO	5.49	+	315.2324	315.23200 (0.454)	30	97.0647
[² H ₉]-Pro	5.49	+	324.2889	324.28760 (-2.305)	30	188.1434
FLUO	5.50	+	310.1419	310.14148 (0.499)	10	148.112
TAM	6.13	+	372.2327	372.23227 (0.212)	50	129.0698
CHO	6.96	+	369.3515	369.35169 (0.303)	40	161.1324
[¹³ C ₃]-CHO	6.96	+	372.3611	372.36165 (0.021)	40	372.3611
COP	6.99	+	371.3672	371.36722 (-0.022)	40	95.0859

¹⁰ n.a., Not available

Table S3. Accuracy (%), and method intra-day / inter-day precision of selected compounds measured at two different concentration levels for each matrix on the selected MS mode.

Compound	WWTP Effluent						Solid fraction					
	QC 1			QC 2			QC 1			QC 2		
	Accu. (%)	Intra-day RSD (%) (n=5)	Inter-day RSD (%) (n=15)	Accu. (%)	Intra-day RSD (%) (n=5)	Inter-day RSD (%) (n=15)	Accu. (%)	Intra-day RSD (%) (n=5)	Inter-day RSD (%) (n=15)	Accu. (%)	Intra-day RSD (%) (n=5)	Inter-day RSD (%) (n=15)
SMX ¹¹	109	7	13	106	2	9	109	10	9	108	2	4
CAF ¹²	90	8	7	108	3	13	106	9	8	108	2	4
BZE ^a	89	9	8	87	5	9	106	10	9	116	2	4
DEA ^a	91	12	19	94	6	14	118	10	8	116	2	4
MP ^a	104	10	14	108	6	10	105	2	2	103	1	1
4-MP ^a	98	7	7	99	2	4	101	2	8	109	4	4
MDMA ^a	82	8	4	89	2	7	110	4	10	106	2	12
DES ^a	106	24	11	123	6	21	90	4	15	98	2	11
NOR ^a	94	5	3	96	2	4	108	4	21	104	2	17
E3 ^a	97	15	15	98	3	8	78	9	17	81	8	13
4-MMC ^a	97	4	10	98	3	8	94	5	16	94	1	13
CBZ ^a	109	9	15	112	5	12	95	10	15	93	9	12
ATZ ^a	113	8	17	103	5	9	104	11	10	102	5	7
VEN ^c	102	25	19	127	6	16	83	11	17	87	9	11
COC ^a	100	11	14	96	5	8	92	9	14	93	11	16
DCF ^a	81	13	22	93	9	14	111	8	8	109	2	11
OXA ^a	112	12	9	84	14	19	110	9	19	109	6	21
BPA ^a	89	11	16	116	6	10	112	3	5	107	1	5
EE2 ^a	107	13	17	101	8	13	110	8	12	108	2	7
E2 ^a	98	9	10	97	9	15	133	18	19	104	12	17
DIA ^a	102	6	8	100	6	12	102	9	14	102	7	10
E1 ^a	109	10	15	103	10	10	111	16	22	93	11	21
NORE ^a	101	7	6	103	10	10	111	7	15	100	3	7
TES ^a	106	11	13	108	5	6	95	15	22	95	4	11
LEVO ^a	98	8	15	102	10	12	117	12	12	97	6	9
FEN ^a	104	9	9	107	8	11	98	11	12	100	4	6
FLUO ^a	113	13	21	99	8	20	91	6	19	92	3	16
PRO ^a	103	10	12	104	7	21	126	10	15	106	7	10
TAM ^a	102	6	6	100	3	14	110	8	11	108	4	6
CHO ¹³	97	21	23	103	8	20	67	2	5	94	2	3
COP ^c	104	8	15	118	3	21	85	5	17	77	1	10

¹¹ QC₁: 250 ng L⁻¹, 10 ng g⁻¹, QC₂: 750 ng L⁻¹, 50 ng g⁻¹

¹² QC₁: 20 µg L⁻¹, 10 ng g⁻¹, QC₂: 30 µg L⁻¹, 50 ng g⁻¹

¹³ QC₁: 1 µg L⁻¹, 50 ng g⁻¹, QC₂: 5 µg L⁻¹, 200 ng g⁻¹

Table S4. Recovery values (mean \pm SD, n=4) on different filter materials. ¹⁴

Compound	Cellulose acetate	Glass Fiber	Mixed cellulose ester	Nylon	Polycarbonate	Polyethylene
SMX	97 (14)	92 (2)	114 (21)	8 (2)	86 (27)	71 (2)
CAF	109 (14)	98 (7)	129 (21)	107 (11)	96 (28)	78 (2)
BZE	96 (16)	90 (3)	117 (22)	99 (12)	90 (29)	69 (2)
MP	94 (13)	91 (1)	108 (15)	81 (9)	83 (26)	69 (4)
DEA	98 (14)	92 (1)	116 (19)	96 (9)	87(9)	71 (3)
MDMA	73 (7)	81 (2)	75 (8)	95 (12)	82 (24)	67 (3)
E3	62 (7)	77(20)	68 (14)	46 (10)	50 (1)	34 (2)
4-MP	82 (10)	79 (4)	91 (13)	86 (10)	80 (25)	64 (3)
DES	70 10)	82 (2)	80 (11)	88 (11)	77 (11)	61 (3)
DCF	111 (15)	110 (10)	120 (29)	5 (1)	104 (31)	75 (14)
NOR	87 (7)	83 (5)	89 (13)	96 (13)	92 (13)	74 (2)
4-MMC	81 (4)	87 (2)	71 (9)	98 (13)	89 (31)	71 (7)
CBZ	110 (19)	100 (1)	119 (17)	10 3(8)	92 (24)	77 (1)
BPA	90 (11)	93 (3)	112 (16)	20 (1)	123 (48)	73 (5)
ATZ	99 (16)	92 (1)	113 (18)	94 (10)	88 (26)	71 (3)
OXA	110 (19)	92 (4)	119 (27)	98 (4)	90 (23)	68 (5)
COC	66 (1)	79 (6)	28 (2)	95(15)	83 (24)	61 (2)
E2	80 (17)	93 (5)	100 (22)	5 (1)	99 (23)	98 (12)
EE2	85 (16)	103 (19)	103 (15)	n.d	107 (19)	97 (6)
E1	98 (10)	98 (13)	89 (3)	33 (3)	96 (18)	69 (11)
NORE	108 (10)	125 (11)	124 (24)	108 (9)	126 (27)	127 (21)
DIA	103 (15)	100 (16)	79 (3)	104 (19)	92 (17)	78 (13)
TES	115 (26)	104 (26)	99 (12)	96 (18)	105 917)	70 (7)
LEVO	108 (10)	113 (26)	101 (9)	95 (12)	117 (22)	118 (11)
VEN	55 (8)	81 (18)	50 (8)	97 (18)	79 (18)	61 (1)
FEN	72 (2)	82 (1)	8 (1)	105 (11)	82 (12)	51 (10)
PRO	127 (12)	119 (10)	55 (4)	103 (22)	107 (7)	117 (11)
FLUO	52 (17)	73 (13)	40 (5)	118 (17)	17 (7)	9 (6)
TAM	9 (2)	50 (17)	n.d	78 (16)	9 (15)	4 (6)
CHO	3 (4)	94 (9)	47 (12)	22 (28)	82 (21)	56 (2)
COP	59 (11)	96(9)	33 (13)	1 (1)	91 (29)	58 (4)

¹⁴ Values in parenthesis represent standard deviation from the mean (n=4)
n.d., Not detected (< MLD)

Table S5. MS² optimized parameters for the analysis of selected steroid hormone with a TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer.

Compound	Precursor ion	Product ion	Collision Energy	RF lens	Rt
	m/z	m/z	(V)	(V)	(min)
E3	271	157	22	44	4.53
	[M+H] ⁺	253	14	44	
E1	271	157	22	44	6.31
	[M+H] ⁺	253	14	44	
E2[¹³ C ₆]-E2	261	159	20	44	6.36
	[M-H ₂ O+H] ⁺				
E2	255	144	40	37	6.36
	[M-H ₂ O+H] ⁺	159	19	37	
EE2	279	115	57	47	6.36
	[M-H ₂ O+H] ⁺	133	19	47	
NORE	299	91	47	53	6.40
	[M+H] ⁺	128	28	53	
LEVO	313	91	47	53	6.87
	[M+H] ⁺	128	57	53	
TES	289	97	24	51	6.65
	[M+H] ⁺	109	27	51	
PRO	315	97	24	52	7.27
	[M+H] ⁺	109	27	52	

Table S6. Average logarithms of solid water distribution coefficients, K_d of selected compounds in WWTP-1(n=19) and WWTP-2 (n=20) over a period of five months. Values in parentheses represent standard deviation (SD).

Compound	WWTP log K_d	
	WWTP-1	WWTP-2
Caffeine	1.9 (0.2)	1.7 (0.2)
Benzoyllecgonine	2.0 (0.3)	1.8 (0.3)
Methylparaben	2.7 (0.6)	2.3 (0.6)
Desvenlafaxine	2.1 (0.3)	1.8 (0.3)
Carbamazepine	2.6 (0.7)	2.3 (0.7)
Bisphenol A	4.2 (0.4)	4.1 (0.5)
Oxazepam	3.0 (0.4)	1.9 (0.2)
Cocaine	2.1 (0.3)	1.7 (0.2)
Venlafaxine	1.9 (0.4)	1.3 (0.3)
Progesterone	2.6 (0.4)	2.7 (0.3)
Cholesterol	2.1 (0.3)	1.7 (0.4)
Coprostanol	1.4 (0.5)	0.7 (0.4)

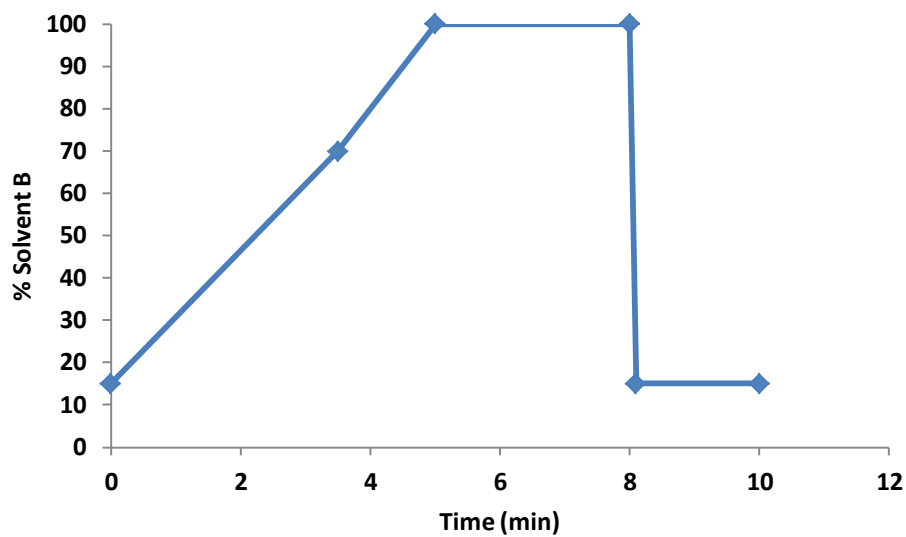


Figure S1. LC gradient

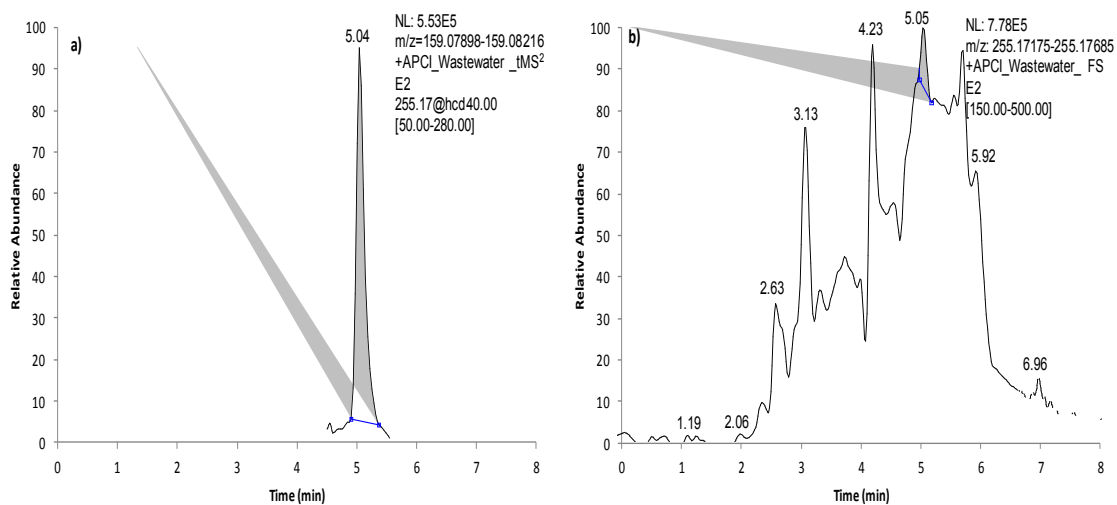


Figure S2. Chromatogram of E2 at 50 ng L⁻¹ in wastewater effluent matrix on MS² (17,500 FWHM at m/z 200) (a) and FS (70,000 FWHM at m/z 200) (b)

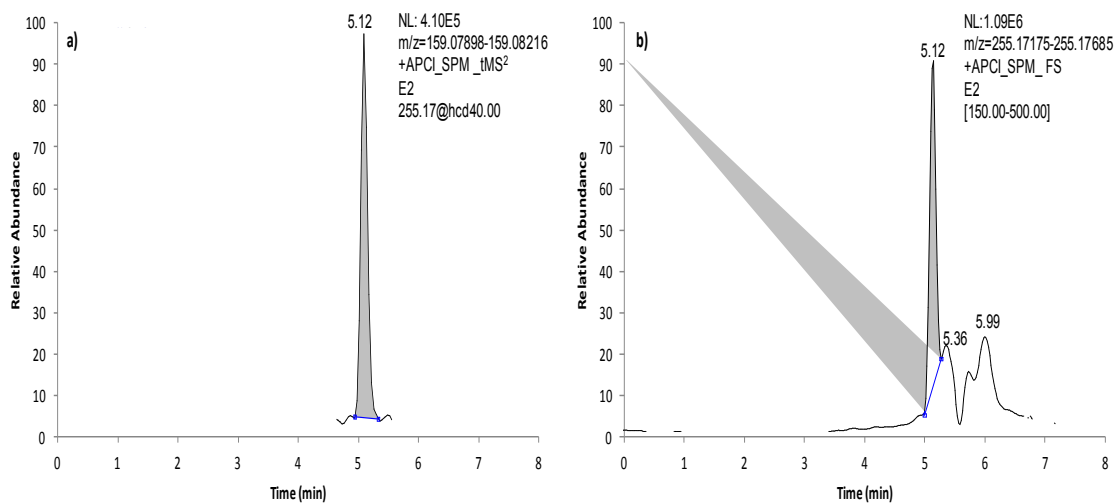


Figure S3. Chromatogram of E2 at 20 ng g⁻¹ in SPM matrix MS² (17,500 FWHM at m/z 200) (a) and FS (70, 000 FWHM at m/z 200) (b).

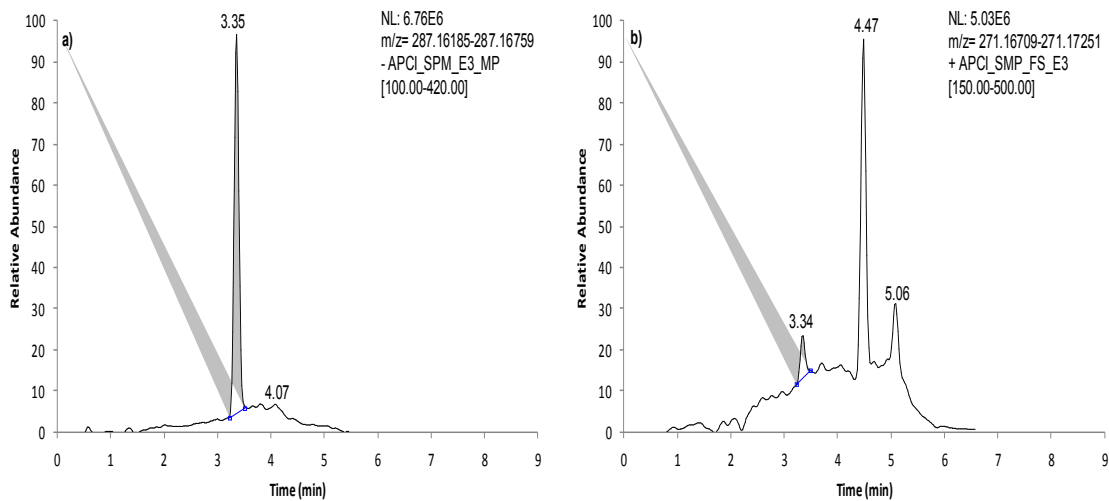


Figure S4. Chromatogram of E3 at 20 ng g⁻¹ in SPM matrix FS (70, 000 FWHM at m/z 200) negative (a) and positive (b).

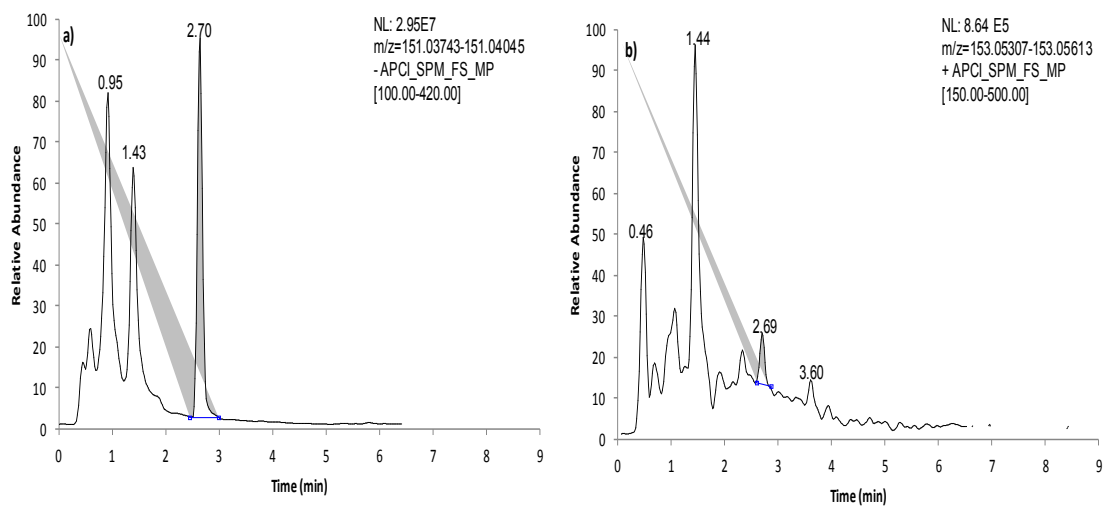


Figure S5. Chromatogram of MP at 20 ng g⁻¹ in SPM matrix on FS (70,000 FWHM at m/z 200) negative (a) and positive (b).

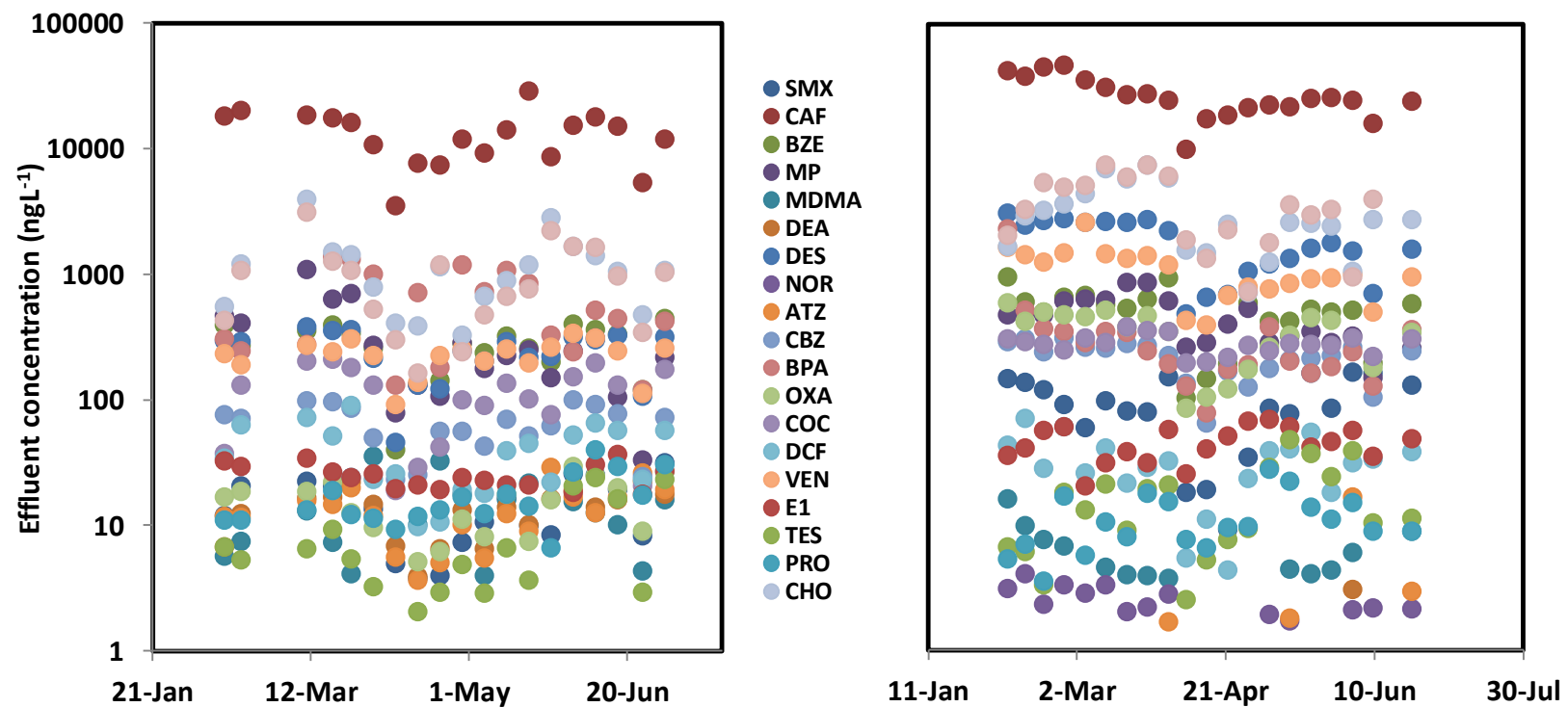


Figure S6. CECs concentrations in wastewater effluents (ng L⁻¹, Log Scale) in WWTP-1 (left) and WWTP-2 (right) wastewater effluent for a period of 5 months. Data points represent average concentration values (n=2). For 89% of the average values, the RSD values were < 25%.

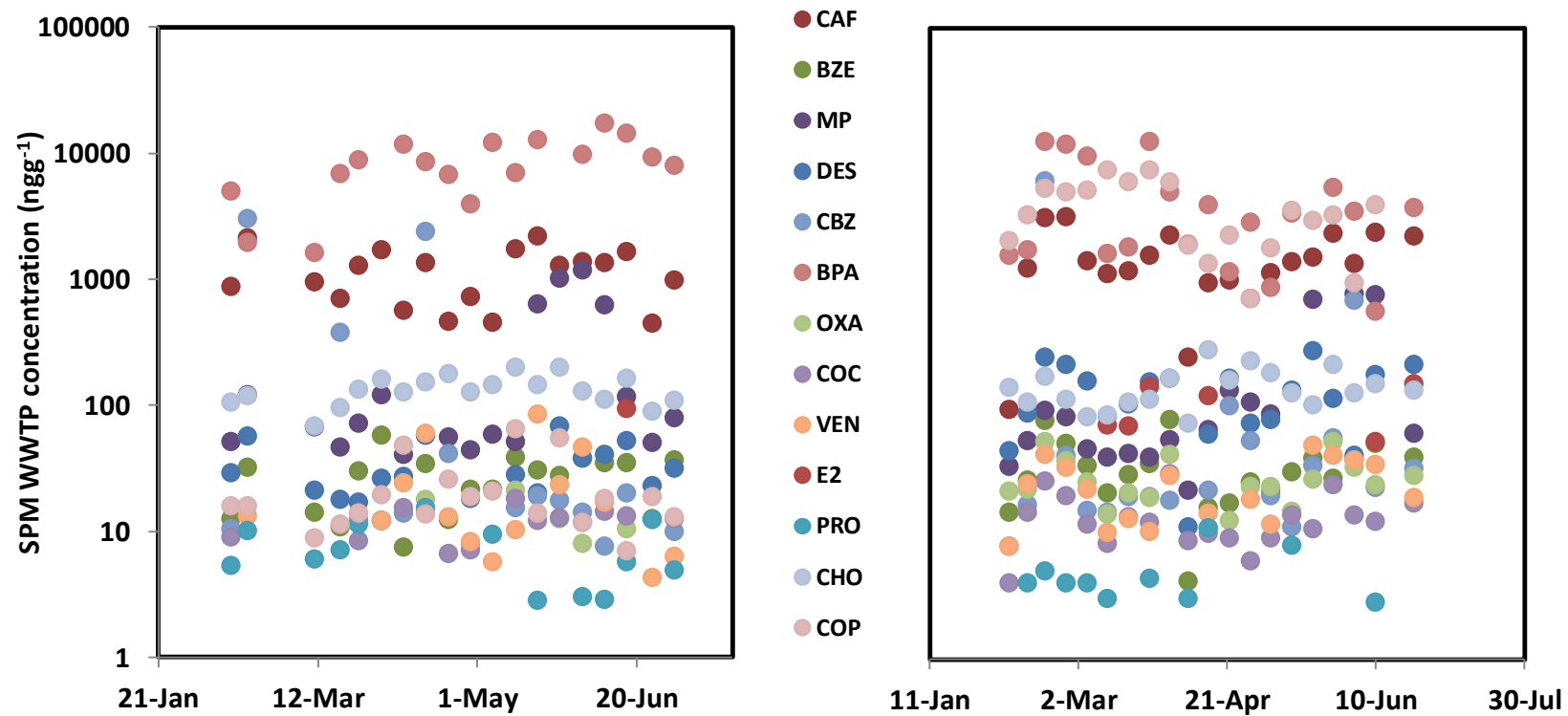


Figure S7. CECs concentration on the SPM (ng g^{-1} , Log Scale) in WWTP-1(left) and WWTP-2 (right) (QC, Canada) SPM WWTP for a period of 5months. Data points represent average concentration values ($n=2$). For 64% of the average values, the RSD values where $< 25\%$.

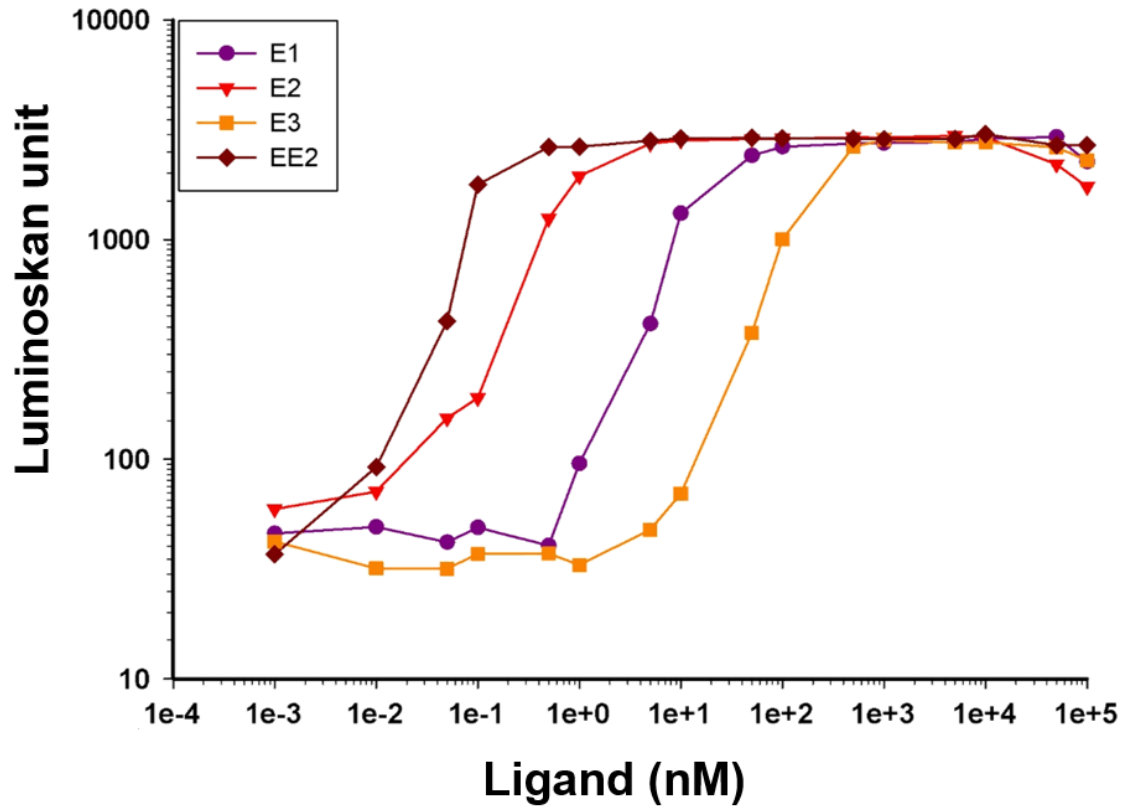


Figure S8. Dose response curves of yeast strain BJ3505, hER; estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and 17 α -ethinylestradiol (EE2).

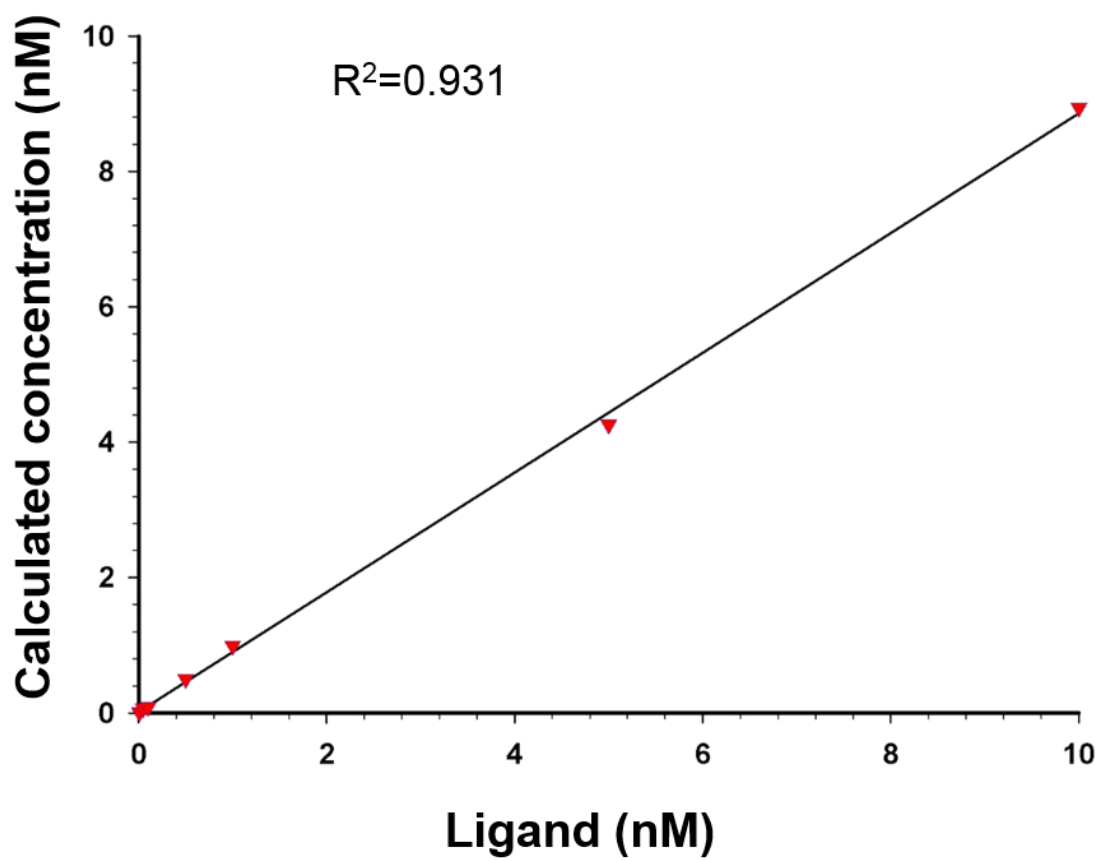


Figure S9. Linear regression showing the linearity zone of the measurement among calculated concentration and the ligand concentration of 17 β -estradiol (E2).

Chapitre 5. Conclusion

Les contaminants émergents représentent une large gamme de composés aux propriétés physicochimiques différentes qui «atteignent» l'environnement via plusieurs sources anthropogéniques (Gavrilescu et al., 2015) dont une grande majorité provient des stations d'épurations des eaux usées. Ces composés suscitent l'attention de la communauté scientifique, notamment puisqu'ils ne sont pas assujettis à des normes environnementales, qu'ils peuvent avoir un impact écologique (ex.; perturbation du système endocrinien) (Petrie et al., 2015) et qu'ils peuvent être persistants et mobiles dans l'environnement. Toutefois, malgré le fait que des progrès ont été réalisés dans la détection et l'analyse de ces micropolluants via le développement et le raffinement de techniques «spécifiques», peu d'informations est disponible quant au devenir et au destin environnemental de ces composés. De plus, la plupart des travaux examinant le sort de ces composés semblent cibler exclusivement la fraction dissoute en négligeant la fraction solide, notamment dans les stations d'épuration des eaux usées. Néanmoins, il est admis que les eaux usées sont constituées d'une phase hétérogène, formée de matières insolubles pouvant potentiellement sorber plusieurs contaminants d'intérêt émergent.

Dans cette optique, une méthode multi-résidus ciblant plusieurs représentants des différentes classes de contaminants émergents (31 composés) présentés au **Chapitre 1** a été développée pour non seulement analyser la phase liquide, mais également la phase solide. Ces analyses ont été possibles via le développement simultané d'une méthode d'extraction par ultrasons (UAE) et le développement d'une méthode de préconcentration et d'extraction sur phase solide (SPE) conjointement avec une séparation chromatographique en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution. Deux modes d'analyses ont ensuite été optimisées et comparés, soit le mode balayage (FS) et le mode de suivi des réactions parallèles (PRM) afin de déterminer lequel de ces modes était le mieux adapté pour chaque matrice étudiée. Ces méthodes ont ensuite été appliquées sur des échantillons d'effluent d'eaux usées provenant de deux stations d'épurations, échantillonnées sur une période de cinq mois (février à juin) ce qui correspond à 39 échantillons et leurs particules en suspensions correspondantes. Ensuite, dans l'objectif de déterminer le devenir de ces composés jusqu'à leur déversement dans les eaux réceptrices, des échantillons d'eau de surface, de particules en suspensions et de sédiments ont

également été analysés. De plus, afin d'obtenir des renseignements quant aux effets synergiques et additifs qui ne sont pas considérés lors des analyses «chimiques», un essai biologique a été employé pour mettre en évidence la contamination de perturbateurs endocriniens dans les effluents des eaux usées. Ces travaux représentent l'un des premiers rapports décrivant les concentrations en ECs dans les eaux usées et les SPM combiné avec un dépistage du potentiel estrogénique. De plus, les LOD sont comparables avec celles de la littérature (**Table 2-1**)

Le protocole pour l'analyse de 31 contaminants d'intérêts émergents dans la fraction solide et liquide de l'effluent municipaux est présenté au **Chapitre 4**. La séparation des particules en suspension a été effectuée via la filtration des échantillons aqueux. Ensuite, afin d'éviter que certains composés cibles soient à tort considérés comme adsorbé sur la matière solide, l'affinité des différents analytes pour différent type de filtres a été déterminée. La fibre de verre a ainsi été sélectionnée puisque ce matériel minimisait la perte des composés cibles. Pour l'extraction assistée par ultrason, une combinaison de MeOH et d'ACN en proportion 1 : 1 avec l'ajout d'un pour cent d'acide formique suivi d'une méthode de préconcentration et d'extraction sur phase solide avec une cartouche de type Strata XC a été effectuée. Des recouvrements entre 43 et 122% pour l'effluent municipal et des recouvrements entre 27 et 102 % pour la fraction solide ont été obtenus. Ensuite, des limites de détections situées entre 0.5 et 104 ng L⁻¹ et entre 0.3 et 2.3 ng g⁻¹ ont été obtenues, respectivement dans la fraction aqueuse et la fraction solide. L'application de cette méthode sur des échantillons réels a permis d'observer une diminution de la concentration dans les effluents municipaux, dans la fraction liquide au début du printemps, fort probablement suite à la fonte des neiges et non pas suite à une augmentation de l'efficacité du traitement des stations d'épurations. Cette observation n'a pas été obtenue dans la fraction solide. Il a également été démontré que les particules en suspensions pouvaient contenir une fraction non négligeable de contaminants émergents, mais que leurs hydrophobicités, leurs coefficients de partage octanol-eau (log K_{ow}), ne pouvaient pas être exclusivement employés pour prédire leurs comportements et leurs sorptions sachant qu'aucune corrélation n'a été déterminée entre le K_d et le K_{ow}. Les concentrations déterminées dans les eaux de surfaces et leurs particules en suspension correspondantes étaient significativement inférieures à celles déterminées dans les effluents municipaux, hormis l'atrazine et son métabolite principal, la déséthylatrazine. Ensuite, dans les sédiments analysés, très peu de micropolluants ont été

détectés, ce qui peut être surprenant, sachant que les sédiments agissent généralement comme «réservoir». Ceci peut être probablement dû au choix des sédiments qui semblaient avoir une faible fraction de carbone organique (foc) et ainsi, une faible tendance à sorber des micropolluants. Finalement, un potentiel perturbateur endocrinien dans tous les échantillons d'eaux usées a été mesuré, toutefois aucune corrélation significative n'a pu être déterminée entre les résultats du test-YES et les concentrations en ECs préalablement déterminés. Ainsi, afin d'évaluer quantitativement les impacts écotoxicologiques des contaminants émergents et des perturbateurs endocriniens dans l'environnement il serait intéressant de développer une approche ciblée et non ciblée. Ceci permettrait de non seulement quantifier plusieurs contaminants suspectés d'être présent dans différentes matrices environnementales, mais également de détecter et d'identifier plusieurs contaminants et métabolites dont la présence est insoupçonnée. Conjointement à différents tests biologiques cette approche permettrait de mieux comprendre les effets synergiques et additifs pour ensuite établir des normes environnementales. En effet, en considérant qu'aucune corrélation n'a pu être déterminée entre le test-YES et les concentrations en ECs il serait pertinent d'analyser d'autres contaminants afin de déterminer la présence de perturbateurs endocriniens insoupçonnée.

Références

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D., 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ. Int.* **85**, 327-333.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P., 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* **145**, 592-603.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., García-Valcárcel, A.I., Pérez, R.A., Tadeo, J.L., 2015b. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *TrAC* **71**, 110-118.
- Allinson, M., Shiraishi, F., Salzman, S.A., Allinson, G., 2010. In Vitro and immunological assessment of the estrogenic activity and concentrations of 17 β -estradiol, estrone, and ethinyl estradiol in treated effluent from 45 wastewater treatment plants in Victoria, Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 576–586.
- Álvarez-Ruiz, R., Andrés-Costa, M.J., Andreu, V., Picó, Y., 2015. Simultaneous determination of traditional and emerging illicit drugs in sediments, sludges and particulate matter. *J. Chromatogr. A* **1405**, 103-115.
- Anderson, L., Hunter, C.L., 2006. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 573-588.
- Andrási, N., Molnár, B., Dobos, B., Vasánits-Zsigrai, A., Záray, G., Molnár-Perl, I., 2013. Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta* **115**, 367-373.
- 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.
- Arias-Estévez, M., López-Periágo, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C., García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agr. Ecosyst. Environ* **123**, 247-260.
- Arienzo, M., Albanese, S., Lima, A., Cannatelli, C., Aliberti, F., Cicotti, F., Qi, S., De Vivo, B., 2015. Assessment of the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in soils from the Sarno River basin, Italy, and ecotoxicological survey by *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess* **187**, 52.
- Atkinson, S.K., Marlatt, V.L., Kimpe, L.E., Lean, D.R.S., Trudeau, V.L., Blais, J.M., 2012a. The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* **430**, 119-125.
- Augusto, F., Hantao, L.W., Mogollón, N.G.S., Braga, S.C.G.N., 2013. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* **43**, 14-23.
- Aydin, M.E., Tor, A., Özcan, S., 2006. Determination of selected polychlorinated biphenyls in soil by miniaturised ultrasonic solvent extraction and gas chromatography-mass-selective detection. *Anal. Chim. Acta* **577**, 232-237.
- Bade, R., Rousis, N.I., Bijlsma, L., Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Sancho, J.V., Hernandez, F., 2015. Screening of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and surface waters of Spain and Italy by high resolution mass spectrometry using UHPLC-QTOF MS and LC-LTQ-Orbitrap MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 8979-8988.

- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011a. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 8036-8059.
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011b. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 1620-1631.
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011c. Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 7901-7913.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., 2009. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J. Chromatogr. A* **1216**, 449-469.
- Balsiger, H.A., De la Torre, R., Lee, W., Cox, M.B., 2010. A Four-Hour Yeast Bioassay for the Direct Measure of Estrogenic Activity in Wastewater without Sample Extraction, Concentration, or Sterilization. *Sci. Total Environ.* **408**, 1422-1429.
- Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1141-1142.
- Barco-Bonilla, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G., Martínez Vidal, J.L., Salas, J.J., Martín, I., 2013a. Study of the distribution of 204 organic contaminants between the aqueous phase and the suspended particulate matter in treated wastewater for proper environmental control. *Desalin. Water Treat.* **51**, 2497-2515.
- Barco-Bonilla, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G., Martínez Vidal, J.L., Salas, J.J., Martín, I., 2013b. Study of the distribution of 204 organic contaminants between the aqueous phase and the suspended particulate matter in treated wastewater for proper environmental control. *Desalination and Water Treatment* **51**, 2497-2515.
- Barker, S.A., 2000. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* **885**, 115-127.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--I) groundwater. *Sci. Total Environ.* **402**, 192-200.
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2009. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* **157**, 994-1002.
- Berlitz-Barbier, A., Vauchez, A., Wiest, L., Baudot, R., Vulliet, E., Cren-Olive, C., 2014a. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1259-1266.
- Berlitz-Barbier, A., Vauchez, A., Wiest, L., Baudot, R., Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2014b. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1259-1266.
- Bijlsma, L., Sancho, J.V., Pitarch, E., Ibáñez, M., Hernández, F., 2009. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *J. Chromatogr. A* **1216**, 3078-3089.
- Bistan, M., Logar, R.M., Tišler, T., 2012. Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay. *Cent. Eur. J. Biol.* **6**, 829-837.
- Boleda, M.A., Galceran, M.A., Ventura, F., 2009. Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain. *Water. Res.* **43**, 1126-1136.

- Boles, T.H., Wells, M.J., 2010. Analysis of amphetamine and methamphetamine as emerging pollutants in wastewater and wastewater-impacted streams. *J. Chromatogr. A* **1217**, 2561-2568.
- 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.
- Boxall, A.B., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S.E., Berninger, J.P., Carriquiriborde, P., Coors, A., Deleo, P.C., Dyer, S.D., Ericson, J.F., Gagne, F., Giesy, J.P., Guoin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M.V., Larsson, D.G., Lazorchak, J.M., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M.E., Meyerhoff, R.D., Moore, R., Parrott, J.L., Snape, J.R., Murray-Smith, R., Servos, M.R., Sibley, P.K., Straub, J.O., Szabo, N.D., Topp, E., Tetreault, G.R., Trudeau, V.L., Van Der Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health. Perspect.* **120**, 1221-1229.
- Brix, R., Noguerol, T.-N., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A.J., Tollefsen, K.-E., Levy, W., Schramm, K.-W., Barceló, D., 2010. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environ. Int.* **36**, 361-367.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* **339**, 814-815.
- Brouwer, E.R., Kofman, S., Brinkman, U.A.T., 1995. Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. *J. Chromatogr. A*, 167-190.
- Buchberger, W.W., 2011. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *J. Chromatogr. A* **1218**, 603-618.
- Buckley, J.A., 2010. Quantifying the antiestrogen activity of wastewater treatment plant effluent using the yeast estrogen screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 73-78.
- Buerge, II, Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.R., 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 691-700.
- Burkhardt-Holm, P., 2010. Endocrine Disruptors and Water Quality: A State-of-the-Art Review. *Int. J. Water. Resour.* **26**, 477-493.
- Buszewski, B., Szultka, M., 2012. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 198-213.
- Byer, J.D., Struger, J., Sverko, E., Klawunn, P., Todd, A., 2011. Spatial and seasonal variations in atrazine and metolachlor surface water concentrations in Ontario (Canada) using ELISA. *Chemosphere* **82**, 1155-1160.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **80**, 49-60.
- Byrdwell, W.C., 2001. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**, 327-346.
- Campo, J., Masiá, A., Blasco, C., Picó, Y., 2013. Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins. *J. Hazard. Mater.* **263** Pt 1, 146-157.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernandez-Mendez, J., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* **1089**, 1-17.
- Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* **364**, 67-87.
- Castiglioni, S., Borsotti, A., Senta, I., Zuccato, E., 2015. Wastewater analysis to monitor spatial and temporal patterns of use of two synthetic recreational drugs, ketamine and mephedrone, in Italy. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 5563-5570.

- Castiglioni, S., Zuccato, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., Bagnati, R., 2008. Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. *Mass. Spectrom. Rev.* **27**, 378-394.
- Cecinato, A., Balducci, C., 2007. Detection of cocaine in the airborne particles of the Italian cities Rome and Taranto. *J. Sep. Sci.* **30**, 1930-1935.
- Chen, C., Kostakis, C., Irvine, R.J., White, J.M., 2013. Increases in use of novel synthetic stimulant are not directly linked to decreased use of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA). *Forensic. Sci. Int.* **231**, 278-283.
- Chen, L., Ji, W., Duan, W., Wang, X., Gao, Q., Geng, Y., Huang, L., 2014. Effectively designed molecularly imprinted polymers for selective extraction of glabridin from *Glycyrrhiza glabra* L. residues by screening the library of non-imprinted polymers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **965**, 1-6.
- Chesnut, S.M., Salisbury, J.J., 2007. The role of UHPLC in pharmaceutical development. *J. Sep. Sci.* **30**, 1183-1190.
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water. Res.* **38**, 947-954.
- Dairkee, S.H., Seok, J., Champion, S., Sayeed, A., Mindrinos, M., Xiao, W., Davis, R.W., Goodson, W.H., 2008. Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res.* **68**, 2076-2080.
- Daneshvar, A., Aboulfadl, K., Viglino, L., Broséus, R., Sauvé, S., Madoux-Humery, A.S., Weyhenmeyer, G.A., Prévost, M., 2012. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere* **88**, 131-139.
- Darwano, H., Vo Duy, S., Sauvé, S., 2014a. A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* **66**, 582-593.
- Denton, J.S., Donoghue, E.R., McReynolds, J., Kalelkar, M.B., 2008. An epidemic of illicit fentanyl deaths in Cook County, Illinois: September 2005 through April 2007. *J. Forensic. Sci.* **53**, 452-454.
- Dias, A.C., Gomes, F.W., Bila, D.M., Sant'Anna, G.L., Jr., Dezotti, M., 2015. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **120**, 41-47.
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Brown, M., Baker, P.N., Redman, C.W., Kenny, L.C., Kell, D.B., 2008. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **871**, 288-298.
- Ellis, J.B., 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut.* **144**, 184-189.
- Eskilsson, C.S., Björklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **902**, 227-250.
- Fareed, A., Buchanan-Cummings, A.M., Crampton, K., Grant, A., Drexler, K., 2015. Reversal of overdose on fentanyl being illicitly sold as heroin with naloxone nasal spray: A case report. *Am. J. Addict* **24**, 388-390.
- Farré, M., Kantiani, L., Petrovic, M., Pérez, S., Barceló, D., 2012. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *J. Chromatogr. A* **1259**, 86-99.

- 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.
- Fedorova, G., Randak, T., Lindberg, R.H., Grabic, R., 2013a. Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 1751-1762.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol* **76**, 122-159.
- Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2014. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: from hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environ. Pollut.* **193**, 216-223.
- Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--II) untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* **402**, 201-216.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babal, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 205-212.
- Gavrilescu, M., Demnerova, K., Amand, J., Agathos, S., Fava, F., 2015. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *N. Biotechnol.* **32**, 147-156.
- Gay, H., 2012. Before and after Silent Spring: from chemical pesticides to biological control and integrated pest management--Britain, 1945-1980. *Ambix* **59**, 88-108.
- Gheorghe, A., van Nuijs, A., Pecceu, B., Bervoets, L., Jorens, P.G., Blust, R., Neels, H., Covaci, A., 2008. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1309-1319.
- Gilart, N., Marcé, R.N., Borrull, F., Fontanals, N., 2014. New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *Trends Anal. Chem.* **54**, 11-23.
- González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodríguez, I., González-Díez, M., Cela, R., 2012. Screening and selective quantification of illicit drugs in wastewater by mixed-mode solid-phase extraction and quadrupole-time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 1708-1717.
- Gracia-Lor, E., Martínez, M., Sancho, J.V., Peñuela, G., Hernández, F., 2012. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **99**, 1011-1123.
- Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678-690.
- Guillarme, D., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J.L., 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **29**, 15-27.
- Heberer, T., 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* **266**, 175-189.
- Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2015. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 8010-8021.

- Hernández, F., Ibáñez, M., Botero-Coy, A.M., Bade, R., Bustos-López, M.C., Rincón, J., Moncayo, A., Bijlsma, L., 2015. LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogota, Colombia. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6405-5416.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L., 2012. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1251-1264.
- Horton, M.K., Jacobson, J.B., McKelvey, W., Holmes, D., Fincher, B., Quantano, A., Diaz, B.P., Shabbazz, F., Shepard, P., Rundle, A., Whyatt, R.M., 2011. Characterization of residential pest control products used in inner city communities in New York City. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **21**, 291-301.
- Huen, K., Bradman, A., Harley, K., Yousefi, P., Boyd Barr, D., Eskenazi, B., Holland, N., 2012. Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community. *Environ. Res.* **117**, 8-16.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2008. Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6809-6816.
- Huq, S., Dixon, A., Kelly, K., Kallury, K.M., 2005. Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **1073**, 355-361.
- Ibáñez, M., Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Hernández, F., 2012. Importance of MS selectivity and chromatographic separation in LC-MS/MS-based methods when investigating pharmaceutical metabolites in water. Dipyrone as a case of study. *J. Mass Spectrom.* **47**, 1040-1046.
- Imbert, L., Dulaurent, S., Merceroles, M., Morichon, J., Lachatre, G., Gaulier, J.M., 2014. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic science international* **234**, 132-138.
- Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-Guerraz, F., Locher, F., 2012. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J. Environ. Manage.* **103**, 113-121.
- Jones-Lepp, T.L., Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., 2004. Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography-electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 427-439.
- Jones, O.A., Lester, J.N., Voulvoulis, N., 2005. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends. Biotechnol.* **23**, 163-167.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1293-1308.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water. Res.* **43**, 363-380.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M., 2010. Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "where is the crossover point?". *Anal. Chim. Acta* **673**, 60-72.

- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Burkhardt, M.R., Werner, S.L., Cahill, J.D., G.R., J., 2006. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7207-7215.
- Klaminder, J., Brodin, T., Sundelin, A., Anderson, N.J., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., 2015. Long-Term Persistence of an Anxiolytic Drug (Oxazepam) in a Large Freshwater Lake. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 10406-10412.
- Kolpin, D.W., Schnoebelen, D.J., Thurman, E.M., 2004. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. *Groundwater* **42**, 601-608.
- Kostich, M.S., Batt, A.L., Lazorchak, J.M., 2014. Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environ. Pollut.* **184**, 354-359.
- Kumar, P., Rúbies, A., Centrich, F., Granados, M., Cortes-Francisco, N., Caixach, J., Companyó, R., 2013. Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometer: application to determination of synthetic hormones in animal urine. *Anal. Chim. Acta* **780**, 65-73.
- Lai, F.Y., Thai, P.K., O'Brien, J., Gartner, C., Bruno, R., Kele, B., Ort, C., Prichard, J., Kirkbride, P., Hall, W., Carter, S., Mueller, J.F., 2013. Using quantitative wastewater analysis to measure daily usage of conventional and emerging illicit drugs at an annual music festival. *Drug and alcohol review* **32**, 594-602.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S., 2008a. Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 5325-5333.
- Lane, M.E., 2013. The transdermal delivery of fentanyl. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**, 449-455.
- Lange, O., Damoc, E., Wieghaus, A., Makarov, A., 2014. Enhanced fourier transform for Orbitrap mass spectrometry. *Int. J. Mass. Spectrom.* **369**, 16-22.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012a. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental pollution* **163**, 287-303.
- LeDoux, M., 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr. A* **1218**, 1021-1036.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* **473-474**, 619-641.
- Luque de Castro, M.D., García-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* **369**, 1-10.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S., 2006. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113-2120.
- Martin, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *J. Hazard. Mater.* **239-240**, 40-47.
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *J. Sep. Sci.* **33**, 1760-1766.
- Mater, N., Geret, F., Castillo, L., Faucet-Marquis, V., Albasi, C., Pfohl-Leszkowicz, A., 2014. In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environ. Int.* **63**, 191-200.

- 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.
- McDonnell, D.P., Nawaz, Z., Densmore, C., Weigel, N.L., Pham, T.A., Clark, J.H., O'Malley, B.W., 1991. High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Steroid Biochem Mol Biol* **39**, 291-297.
- Melnick, R.L., Boorman, G.A., Dellarco, V., 1997. Water chlorination, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), and potential cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 832-833.
- Metcalfe, C., Tindale, K., Li, H., Rodayan, A., Yargeau, V., 2010a. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environmental pollution* **158**, 3179-3185.
- Metcalfe, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R., Andrews, D.M., 2010c. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 79-89.
- Metcalfe, C.D., Miao, X.S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 2881-2889.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., Horning, S., 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111 011015.
- Mompelat, S., Jaffrezic, A., Jardé, E., Le Bot, B., 2013. Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification. *Talanta* **109**, 31-45.
- Morissette, M.F., Vo Duy, S., Arp, H.P., Sauvé, S., 2015a. Sorption and desorption of diverse contaminants of varying polarity in wastewater sludge with and without alum. *Environ. Sci. Process. Imp.* **17**, 674-682.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **268**, 157-177.
- Mudhoo, A., Garg, V.K., 2011. Sorption, Transport and Transformation of Atrazine in Soils, Minerals and Composts: A Review. *Pedosphere* **21**, 11-25.
- Mustafa, A., Turner, C., 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **703**, 8-18.
- Mwenesongole, E.M., Gautam, L., Hall, S.W., Waterhouse, J.W., Cole, M.D., 2013. Simultaneous detection of controlled substances in waste water. *Anal. Methods* **5**, 3248-3254.
- Nelson, J., Bishay, F., van Roodselaar, A., Ikonou, M., Law, F.C.P., 2007. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. *Sci. Total Environ.* **374**, 80-90.
- Neta, G., Goldman, L.R., Barr, D., Sjodin, A., Apelberg, B.J., Witter, F.R., Halden, R.U., 2010. Distribution and determinants of pesticide mixtures in cord serum using principal component analysis. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 5641-5648.
- O'Brien, T.F., 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin. Infect. Dis.* **34** Suppl 3, S78-84.
- Oishi, S., 2001. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol. Ind. Health* **17**, 31-39.
- Okuda, T., Yamashita, N., Tanaka, H., Matsukawa, H., Tanabe, K., 2009. Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. *Environ. Int.* **35**, 815-820.

- Pal, A., Gin, K.Y., Lin, A.Y., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* **408**, 6062-6069.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K.P., Heinrich, T., Naidu, R., 2011. Biotic and abiotic degradation of illicit drugs, their precursor, and by-products in soil. *Chemosphere* **85**, 1002-1009.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K.P., Naidu, R., 2013. Illicit drugs and the environment--a review. *Sci. Total Environ.* 463-464, 1079-1092.
- Pan, J., Xia, X.X., Liang, J., 2008. Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 25-32.
- Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A., 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1697-1714.
- Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 907-939.
- Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S., Coon, J.J., 2012. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1475-1488.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water. Res.* **72**, 3-27.
- Petrovic, M., Barcelo, D., 2006. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 422-424.
- Petrovic, M., Farre, M., de Alda, M.L., Perez, S., Postigo, C., Kock, M., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2010. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4004-4017.
- Pietrogrande, M.C., Basaglia, G., 2007. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *Trends Anal. Chem.* 26, 1086-1094.
- Pimentel, D., Levitan, L., 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience* **36**, 86-91.
- Pomati, F., Casigliani, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rosseti, C., Calamari, D., 2006. Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2442-2447.
- Poole, C.F., 2003. New trends in solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* **22**, 362-373.
- Pozo, O.J., Sancho, J.V., Ibanez, M., Hernandez, F., Niessen, W.M.A., 2006. Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls. *Trends Anal. Chem.* 25.
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernandez, L.A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., 2010. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A* **1217**, 2642-2666.
- Prins, G.S., Tang, W.Y., Belmonte, J., Ho, S.M., 2008. Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertil. Steril.* **89**, e41.
- Prosen, H., Zupancic, K.C., 1999. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **18**, 272-282.
- Pucarevic, M., Sovljanski, R., Lazic, B., Marjanovic, N., 2002. Atrazine in groundwater of Vojvodina Province. *Water. Res.* **36**, 5120-5126.

- Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., Katsoyiannis, A., 2012. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *J. Hazard. Mater.* **239-240**, 1-18.
- Renz, L., Volz, C., Michanowicz, D., Ferrar, K., Christian, C., Lenzner, D., El-Hefnawy, T., 2013. A study of parabens and bisphenol A in surface water and fish brain tissue from the Greater Pittsburgh Area. *Ecotoxicology* **22**, 632-641.
- Richardson, S.D., 2006. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **78**, 4021-4046.
- Richardson, S.D., 2008. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **80**, 4373-4402.
- Richardson, S.D., 2009. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **81**, 4645-4677.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2005. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **77**, 3807-3838.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **83**, 4614-4648.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2014. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **86**, 2813-2848.
- Risebrough, R., 2004. Conservation biology: fatal medicine for vultures. *Nature* **427**, 596-598.
- Rivera-Utrilla, J., Sanchez-Polo, M., Ferrao-Garcia, M.A., Prados-Joya, G., Ocampo-Perez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, **93**, 1268-1287.
- Rodayan, A., Afana, S., Segura, P.A., Sultana, T., Metcalfe, C.D., Yargeau, V., 2015. Linking drugs of abuse in wastewater to contamination of surface and drinking water. *Environ. Toxicol. Chem.* **35**, 843-849.
- Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J.L., Guillarme, D., 2013. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J. Chromatogr. A* **1292**, 2-18.
- Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., Kaminski, M., 2007. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J. Biochem. Bioph. Methods* **70**, 253-261.
- Rosi-Marshall, E.J., Snow, D., Bartelt-Hunt, S.L., Paspalof, A., Tank, J.L., 2015. A review of ecological effects and environmental fate of illicit drugs in aquatic ecosystems. *J. Hazard. Mater.* **282**, 18-25.
- Rouessac, F., Rouessac, A., 1992. Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales modernes. Masson.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, 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.
- Roy-Lachapelle, A., Sollic, M., Sinotte, M., Deblois, C., Sauvé, S., 2015. High resolution/accurate mass (HRMS) detection of anatoxin-a in lake water using LDTD-APCI coupled to a Q-Exactive mass spectrometer. *Talanta* **132**, 836-844.
- Rúa-Gómez, P., Püttmann, W., 2012. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int* **19**, 689-699.
- Rubinson, K.A., 2000. Contemporary instrumental analysis.
- Sabourin, L., Beck, A., Duenk, P.W., Kleywegt, S., Lapen, D.R., Li, H., Metcalfe, C.D., Payne, M., Topp, E., 2009. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. *Sci. Total Environ.* **407**, 4596-4604.

- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D.R., Topp, E., 2012. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* **431**, 233-236.
- Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Sci. Total Environ.* **407**, 4157-4167.
- Sarafraz-Yazdi, A., Rounaghi, G., Vatani, H., Razavipanah, I., Amiri, A., 2014. Headspace solid phase microextraction of volatile aromatic hydrocarbons using a steel wire coated with an electrochemically prepared nanocomposite consisting of polypyrrole, carbon nanotubes, and titanium oxide. *Microchim. Acta* **182**, 217-225.
- Sarkar, S.K., Bhattacharya, B.D., Bhattacharya, A., Chatterjee, M., Alam, A., Satpathy, K.K., Jonathan, M.P., 2008. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticide residues in tropical coastal environment of India: an overview. *Environ. Int.* **34**, 1062-1071.
- Sauvé, S., Aboufadel, K., Dorner, S., Payment, P., Deschamps, G., Prévost, M., 2012. Fecal coliforms, caffeine and carbamazepine in stormwater collection systems in a large urban area. *Chemosphere* **86**, 118-123.
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* **8**, 15.
- Schultis, T., Metzger, J.W., 2004. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* **57**, 1649-1655.
- Shah, S.A., Deshmukh, N.I., Barker, J., Petróczi, A., Cross, P., Archer, R., Naughton, D.P., 2012. Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: application to human hair. *J Pharm Biomed Anal* **61**, 64-69.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K.E., Thomas, K.V., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 844-851.
- Snyder, L.R., Kirjland, J.J., Doland, J.W., 2009. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 1999b. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2814-2820.
- Sollic, M., Roy-Lachapelle, A., Sauvé, S., 2015a. Development of a suspect and non-target screening approach to detect veterinary antibiotic residues in a complex biological matrix using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **29**, 2361-2373.
- Sollic, M., Roy-Lachapelle, A., Sauvé, S., 2015b. Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix. *Anal. Chim. Acta* **853**, 415-424.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* **38**, 721-772.
- Sorensen, H.B., Nielsen, N.S., Lanzky, F.P., ngerslev, F., Liitzhofl, H.C.H., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review *Chemosphere* **36**. 357-393
- Spegel, P., Schweitz, L., Nilsson, S., 2002. Molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 37-38.

- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* **329**, 99-113.
- Syed, J.H., Malik, R.N., Liu, D., Xu, Y., Wang, Y., Li, J., Zhang, G., Jones, K.C., 2013. Organochlorine pesticides in air and soil and estimated air-soil exchange in Punjab, Pakistan. *Sci. Total Environ.* **444**, 491-497.
- Taylor, P.J., 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **38**, 328-334.
- Thibaut, R., Porte, C., 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **92**, 485-494.
- Underwood, J.C., Harvey, R.W., Metge, D.W., Repert, D.A., Baumgartner, L.K., Smith, R.L., Roane, T.M., Barber, L.B., 2011. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 3096-3101.
- UNODC, 2014. United Nations Office of Drugs and Crime World Drug Report 2014. United Nations, New York.
- Valcarcel, Y., Martinez, F., Gonzalez-Alonso, S., Segura, Y., Catala, M., Molina, R., Montero-Rubio, J.C., Mastroianni, N., Lopez de Alda, M., Postigo, C., Barcelo, D., 2012. Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environ. Int.* **41**, 35-43.
- Van De Steene, J.C., Lambert, W.E., 2008. Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 713-718.
- Van Maele-Fabry, G., Hoet, P., Vilain, F., Lison, D., 2012. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ. Int.* **46**, 30-43.
- Van Nuijs, A.L., Abdellati, K., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A., 2012. The stability of illicit drugs and metabolites in wastewater, an important issue for sewage epidemiology? *J. Hazard. Mater.* **239-240**, 19-23.
- Van Nuijs, A.L., Castiglioni, S., Tarcomnicu, I., Postigo, C., Lopez de Alda, M., Neels, H., Zuccato, E., Barcelo, D., Covaci, A., 2011a. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review. *Sci. Total Environ.* **409**, 3564-3577.
- Van Nuijs, A.L., Mougel, J.F., Tarcomnicu, I., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A., 2011b. A one year investigation of the occurrence of illicit drugs in wastewater from Brussels, Belgium. *J. Environ. Monit.* **13**, 1008-1016.
- Van Nuijs, A.L., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., Jorens, P.G., Bervoets, L., Blust, R., Neels, H., Covaci, A., 2009. Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment. *Water. Res.* **43**, 1341-1349.
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C., Morillas, F., Pico, Y., 2012. Spatial distribution of illicit drugs in surface waters of the natural park of Pego-Oliva Marsh (Valencia, Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 971-982.
- Vergeynst, L., Haeck, A., De Wispelaere, P., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2015. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-magnetic sector mass spectrometry: method quality assessment and application in a Belgian case study. *Chemosphere* **119** Suppl, S2-S8.
- Waliszewski, S.M., Caba, M., Herrero-Mercado, M., Saldariaga-Norena, H., Meza, E., Zepeda, R., Martinez-Valenzuela, C., Gomez Arroyo, S., Villalobos Pietrini, R., 2012. Organochlorine pesticide

- residue levels in blood serum of inhabitants from Veracruz, Mexico. *Environ. Monit. Assess* **184**, 5613-5621.
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water. Res.* **44**, 6011-6020.
- Wang, R., Wang, X., Liang, C., Ni, C., Xiong, L., Rao, Y., Zhang, Y., 2013. Direct determination of diazepam and its glucuronide metabolites in human whole blood by muElution solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic science international* **233**, 304-311.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C., 2000. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 122-131.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., Watson, C.S., 2005. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ. Health Perspect.* **113**, 431-439.
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P., 2010. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 6157-6161.
- Wu, Y., Engen, J.R., Hobbins, W.B., 2006. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) further improves hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 163-167.
- Xia, K., Bhandari, A., Das, K., Pillar, G., 2005. Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *J. Environ. Qual.* **34**, 91-104.
- Xian, F., Hendrickson, C.L., Marshall, A.G., 2012. High resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 708-719.
- Xu, J., Wu, L., Chen, W., Chang, A.C., 2008. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1202**, 189-195.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Kumar, A., 2008. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 87-94.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* **28**, 545-551.
- Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., Zheng, S., 2013. Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* **90**, 2520-2525.
- Zhang, Y., Geissen, S.U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* **73**, 1151-1161.
- Zheng, W., Yates, S.R., Bradford, S.A., 2008. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 530-535.
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* **146**, 607-612.
- Zubarev, R.A., Makarov, A., 2013. Orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 5288-5296.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Chiabrando, C., Grassi, P., Fanelli, R., 2008. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water. Res.* **42**, 961-968.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., Fanelli, R., 2005. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Health* **4**, 1-7.

Zwiener, C., Glauner, T., Frimmel, H.F., 2000. Biodegradation of Pharmaceutical Residues Investigated by SPE-GC/ITD-MS and On-Line Derivatization. *J. High. Res. Chrom.* **23**, 474-478.