

HPLC/ESI-MS/MS를 이용한 환경 시료중 Estrogens의 분석

서천규 · 명승운[†]

경기대학교 화학과

The Analysis of Estrogen in Environmental Samples by HPLC/ESI-MS/MS

Cheon-Kyu Seo and Seung-Woon Myung[†]

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Received September 9, 2010/Accepted December 16, 2010

Trace concentrations of estrogens such as 17β -estradiol (E2), 17α -estradiol (α E2), estrone (E1), estriol (E3), and 17α -ethinylestradiol (EE2) may have adverse effects on humans and the aquatic ecosystem. The environmental analysis of estrogens at physiologically active concentrations (low ng/L) requires the use of very sensitive and selective method. An analytical procedure for the simultaneous determination of five steroid estrogens in an aqueous environmental sample is described. The procedure includes solid phase extraction/clean-up with C18 cartridge, and analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry of five estrogens. After 500 mL of sample loading on C18 cartridge, sample was eluted with acetonitrile and dryness. The reconstituted analytes were separated on HPLC system with 0.1% formic acid and acetonitrile followed by analyzed using (-) electrospray ionization - mass spectrometer with multiple reaction monitoring mode. In the range of 0.05 - 1 ng/mL, the calibration curves were showed the good linearities (above $r^2=0.99$). The limits of detection and limits of quantitation estimated for the estrogens in blank surface water were the concentration range of 0.055~0.154 ng/mL and 0.184~0.514 ng/mL, respectively. The absolute recovery, precision (intra-day) and accuracy in the low, medium and high (0.005~1.0 ng/mL) were in the range of 69.5~95.1%, 0.4 ~7.9% (RSD) and -9.1~9.3% (bias), respectively.

Key words: Estrogen, surface water, HPLC/ESI-MS/MS

1. 서 론

여러 질병에 대한 치료의 목적으로 개발된 의약품들이 인체 및 동물 등에 광범위하게 사용됨에 따라 다양한 경로를 통해서 폐기 및 배출되어 하천수는 물론이며, 토양 및 먹는물(정수)에까지 유입되면서 환경에 영향을 미치고 있다.¹⁾

의약품들이 환경 중에 노출됨으로써 자연계에서 그 영향이 어떻게 나타날 것인가에 대한 과학적인 관심은 2000년대에 들어서 가시화되었다. 유럽과 캐나다 등에서는 약물학적 활성상태인 화학물질이 환경에서 출현된

것을 연구하기 시작했고, 네덜란드와 미국에서는 쓰레기 처리 방류수, 지표수 또는 지하수에서 극미량 수준이기는 하지만 80여종의 처방약품이 검출된 예도 있다.^{2,3)}

환경에 잔류하는 의약품들이 새로운 오염물질로 거론되면서, 각국의 쓰레기 처리 방류수, 하천수, 먹는물 등에서 항생제, 진통제, 호르몬제 등 거의 모든 분야의 미량의 잔류의약품들이 검출되었다고 보고되고 있다. 이들 잔류의약품들 중에는 인간에게는 정자 생성에 영향을 미치거나 환경중에서는 물고기의 성비(sex ratio)를 역전시키는 등의 여러 가지 다른 역효과를 내는 내분비계장애물질들이 포함되어 있다.^{4,7)}

[†]To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-31-249-9647, Fax: 82-31-249-9647, E-mail: swmyung@kgu.ac.kr

스테로이드 에스트로겐(steroid estrogen)은 가장 큰 에스트로겐 성질을 가진 화합물들인 것으로 알려지고 있다. 질병치료, 피임약, 동물용의약품으로 사용되는 천연 스테로이드 에스트로겐과 합성 스테로이드 에스트로겐이 물 환경에서 가장 많이 검출되고 있는데 이는 사람과 동물의 소변을 통해서 환경으로 유입된 것이다. 이들 두 종류의 에스트로겐은 비록 생물학적으로 비활성인 glucuronide가 결합된 conjugate 형태로 배설되기는 하지만, 이 conjugate된 에스트로겐들은 하수처리장이나 자연계에서 미생물들의 효소 반응에 의하여 활성인 free steroid로 전환되거나 deconjugate되기도 한다.⁸⁻⁹⁾

이 스테로이드 에스트로겐들이 비록 낮은 농도로 물 환경 중에 존재하더라도 생물학적으로 부작용을 나타낸다고 알려져있다.¹⁰⁻¹¹⁾

특별히, 자연계에 존재하는 17- β estradiol(E2)과 estrone(E1), estriol(E3)과 같은 여성 호르몬과 피임약으로 사용되고 있는 ethynyl estradiol(EE2)과 같은 합성 스테로이드의 물 환경중 잔류는 큰 관심거리가 되고 있다. 이들 에스트로겐 약물은 사람에게 미치는 영향은 아직 불확실하지만 물고기 예게는 낮은 농도(0.1~1 ng/L)에서도 에스트로겐 감응을 보이는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹³⁾

이 화합물들은 주로 일반 폐수처리 시설을 통하여 강으로 유입되며, 처리되지 않고 버려지거나 농가에서 사용되는 하수 슬러지 등을 통해서 들어가기도 한다.

하지만, 에스트로젠을 검출하는데 사용되는 분석학적 기술과 관련한 제한성 때문에 복잡한 환경 매트릭스 시료에서는 이들을 측정하기가 어렵다. 화학분석과 면역학적 분석방법이 주로 사용되고 있으나 선택성이나 감도 문제로 HPLC나 GC/MS를 사용하는 화학분석 방법을 더 많이 사용하고 있다. GC/MS 또는 GC/MS/MS 분석방법 시료전처리 과정이 복잡하며 특별히 유도체 화과정을 거쳐야 한다는 단점을 가지고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 액체 크로마토그래피(LC)-UV를 사용하는 방법은 유도체화가 필요 없지만 감도면에서 큰 제한성이 있다.

HPLC나 GC/MS로 이용한 사례가 있지만 더 효과적인 검출을 위해 최근에는 LC/MS/MS 방법이 많이 사용되고 있으며, 에리스로마이신은 흡수 발색단이 강하지 않아 LC/UV를 이용한 검출보다는 LC/MS/MS 방법을 많이 사용하고 있으며, 검출한계는 0.1~0.2 ng/L 정도이다.¹⁷⁻²³⁾

본 논문에서는 하천수수 중에 잔류하는 에스트로젠 5종(Fig. 1)을 LC/MS/MS를 사용하여 효과적이고 감도

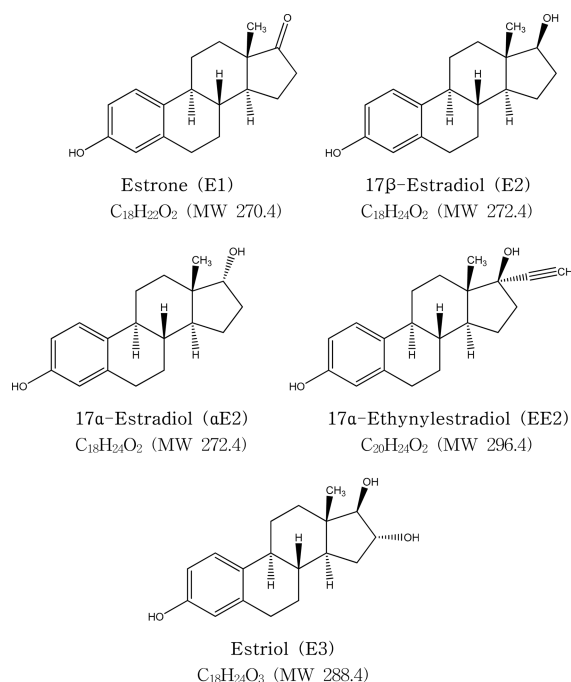


Fig. 1. Chemical structures of steroid estrogens.

가 좋고 정밀성이 높은 동시 분석방법을 확립하고자 하였다. 지금까지 발표된 방법에서는 이들 5종의 의약품질을 물 환경시료에서 동시 분석하는 방법이 발표된 적이 없기 때문에, 이들 5종에 대한 동시 분석방법은 하천수중에 잔류하는 의약품질의 모니터링과 환경정척 수립 등에 있어서 큰 도움이 될 것이다.

2. 실험

2.1. 시약

실험에 사용한 표준물질인 17 α -ethylestradiol, β -estradiol, estrone, estriol, 17 α -estradiol와 정량 분석에 사용된 내부표준물질인 중수소로 치환된 β -estradiol- d_2 은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 고 순도 시약을 사용하였다.

메탄올과 아세트나이트릴은 J. T. Baker사(NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였으며, 개미산(formic acid)은 Fluka사(Seelze, Germany)의 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다.

2.2 기기 및 장치

LC/MS/MS는 시료 자동주입기(Agilent 1200 series

G1313A Autosampler)가 장착된 Agilent사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200series HPLC와 분리된 각 물질의 분자량 확인을 위해 Agilent 6410 Triple-quadrupole 텐텀 질량분석기(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 컬럼은 Eclipse Plus C₁₈(2.1×100 mm, 3.5 μm; Waters, U.S.A.)을 사용하였다.

Polypropylene conical 튜브는 Falcon사(Texas, USA)의 제품을 사용하였다. 시료를 여과하기 위해 Whatman 사(Maidstone, UK)의 GF/B glass 여과지를 사용하였고, 0.45 μm의 13 mm 실린지 디스크 필터는 Life Sciences사(UK)의 제품을 사용하였다.

분석물질 추출에 사용한 고체상 추출(SPE) 카트리지는 Sep-Pak Vac C18 카트리지(1 g, 6 cc)로 Waters사(Milford, Massachusetts, USA)의 제품을 사용하였고 vacuum manifold는 Supelco사(Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다. 질소농축기는 Caliper Lifescience사(Seattle, WA, USA)의 TurboVap LV 농축기를 사용하였으며, vortex mixer는 Vision Scientific사(Bucheon, Korea)의 제품을 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 표준용액의 제조

분석물질의 표준시약과 내부표준물질은 메탄올을 이

용하여 1000 μg/mL의 저장용액을 만들어 -20°C에 냉동보관 후, 필요시에 10 μg/mL이 되도록 혼합희석하여 사용하였다.

2.3.2. 시료 전처리

LC/ESI-MS/MS 분석 전에, 분석에 방해가 되는 매트릭스의 제거 및 분석대상물질의 농축을 위해 정제 및 추출을 수행하였다.

바탕 시료 500 mL에 정제용 내부표준물질(surrogate)인 β-estradiol-d₂(10 μg/mL) 25 μL를 첨가한다. Sep-Pak Vac C18 카트리지(1 g, 6 cc)를 진공감압장치(vacuum manifold)에 장착한 후 아세트나이트릴 5 mL와 메탄올 5 mL, 그리고 증류수 5 mL를 통과시켜 준비하였다. 준비된 Sep-Pak Vac C18 카트리지에 시료를 4 mL/min의 속도로 적재시킨 후, 적재가 끝난 카트리지에 증류수 5 mL를 흘려주어 씻어준 후에 아세트나이트릴 8 mL로 분석물질을 용리시켰다. 이 용리액을 질소증발기를 사용하여 완전히 증발시킨 다음 메탄올 500 μL로 잔사를 녹여 0.45 μm 여과지를 사용하여 여과시킨 후 2 mL 갈색 바이알에 옮겨 LC/ESI-MS/MS로 분석하였다(Fig. 2).

2.3.3. 기기분석 조건

HPLC의 이동상은 0.1% formic acid와 아세트나이트

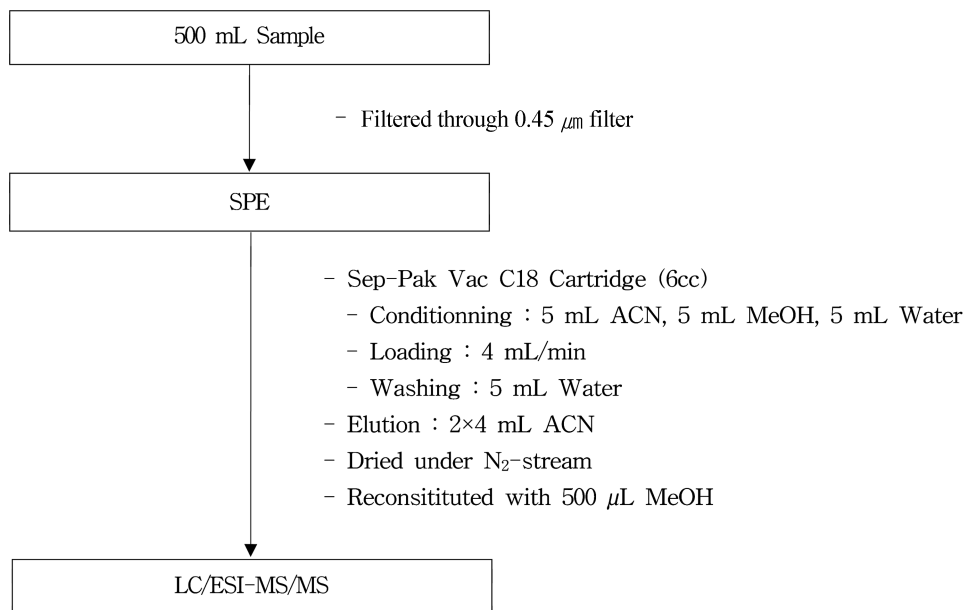


Fig. 2. Schematic diagram for the sample preparation of estrogen in surface water.

Table 1. HPLC chromatographic conditions and mass spectrometric parameters

Parameters	Conditions
Column	Eclipse Plus C ₁₈ column, 100 mm length, 2.1 mm i.d., 3.5 μm particle size
Mobile phase	A: Water (0.1% formic acid) B: Acetonitrile
Gradient	Time (min) 0 10 25 26 35 Solvent B (%) 5 50 80 10 10
Column flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	2 μL
Column temperature	25°C
Ionization mode	Negative ion electrospray
Capillary voltage	3.50 kV
Gas temperature	350°C
Gas flow	8 L/min (N ₂)
Nebulizer	35 psi

릴이었으며 기율기 용리방법(Table 1)을 사용하여 5종의 에스트로젠들을 분리하였다. 이동상의 유속은 0.3 mL/min이었으며 시료 주입량은 2 μL이었다.

질량분석기는 전기분무이온화(ESI) 음이온(-) 모드를 사용하였으며, 분석물질인 스테로이드 에스트로젠과 내부표준물질은 스캔 모드(scan mode)에서 각 물질의 질량스펙트럼을 확인한 후 각 물질의 선구이온(precursor ion)을 선택하여 생성이온(product ion)을 만든 후 특

성이온을 선택하여 최적의 MRM(multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 크로마토그래피 및 질량분석법

HPLC로부터 estriol가 가장 먼저 9.54분에서 용리되었고, estrone은 가장 나중에 용리되었는데 머무름 시간은 14.33분이었으며 5종의 스테로이드 에스트로젠이 15분이내에 잘 분리되어 검출될 수 있었다(Fig. 3). 바탕하천수는 하천수 중 분석대상물질인 5종의 에스트로젠들이 검출되지 않은 하천수를 선정하였으며, 바탕하천수에 대한 실제 전체 크로마토그램(TIC)와 extracted ion chromatogram(EIC)은 Fig 4에 나타내었다. Fig 4에서 보여지는 바와 같이 5종의 에스트로젠이 에스트로젠 표준물질이 검출되는 위치(Fig. 3)에서는 어떤 에스트로젠도 검출되지 않았기 때문에 확립된 분석방법은 정량 또는 정성분석에 있어서 선택성이 좋음을 알 수 있다.

텐텀 질량분석기에서 의약품질들의 정량이온과 정성이온들을 얻기 위해서는 다음과 같은 절차가 수행되었다. 먼저, ESI 음이온(-) 모드를 사용하여 full scan을 통해서 질량스펙트럼을 얻은 후, 기준이온(base ion)을 선구이온(precursor ion)으로 선택하였다. 선택된 선구

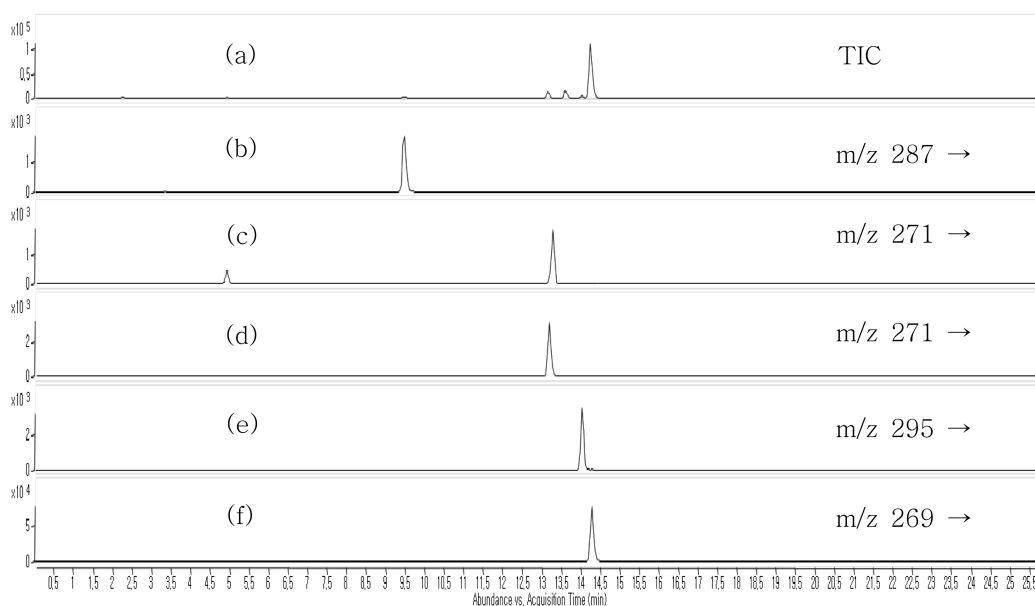


Fig. 3. Total Ion Chromatogram and extracted ion chromatograms of five estrogens in the spiked surface water sample: (a) TIC, (b) E3, (c) E2, (d) αE2, (e) EE2 and (f) E1.

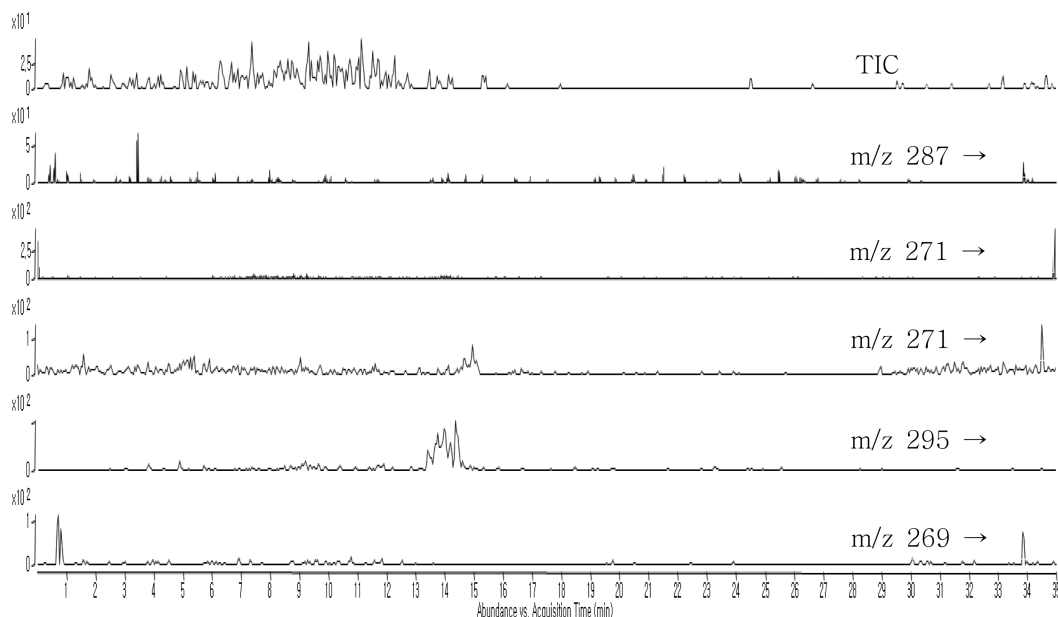


Fig. 4. Total Ion Chromatogram and extracted ion chromatograms of five estrogens for blank sample: (a) TIC, (b) E3, (c) E2, (d) α E2, (e) EE2 and (f) E1.

이온에 최적의 충돌 에너지(collision energy)를 가함으로써 안정되고 감도 좋은 생성이온(product ion)을 만들어서 정량 및 정성확인에 사용할 수 있었다.

Estriol(E3)은 9.54분에 검출되었으며, 분자량에서 양성자가 한 개 제거된 $[M-H]^- = m/z 287$ 이 선구이온으로 선택된 후 충돌셀에서 생성이온을 생성한 후 텐텀 질량분석의 MRM 모드에서는 $m/z 145$, $m/z 171$ 이 특성이온으로 선택되어 정량 및 정성이온으로 사용되었으며, 한편 최대의 감도로 이온생성을 나타내기 위한 충돌셀내에서 충돌 에너지는 45 eV이었다. 17β -estradiol(E2)과 17α -estradiol(α E2)은 13.17분과 13.22분에서 각각 검출되었으며 두 분석물질 모두 $[M-H]^- = m/z 271$ 이 선구이온이었고, $m/z 183$ 과 $m/z 145$ 가 MRM을 위한 특성이온으로 선택되었다. 텐텀질량분석

기에서 17β -estradiol의 경우는 $m/z 183$ 이온이 기준이온으로 생성된 반면에 17α -estradiol은 $m/z 145$ 가 기준이온으로 생성되어 이들 이온이 정량에 사용되었다. 분자량이 296.4 g/mol인 17α -ethylestradiol(EE2)은 $m/z 295$ 에서 $[M-H]^-$ 가 선구이온이었고, $m/z 159$ 와 145 가 특성이온으로 선택되어 정량 및 정성이온으로 사용되었다. 마지막으로 검출된 estrone(E1)은 14.33분에서 $m/z 269([M-H]^-)$ 가 선구이온이었고, $m/z 183$ 과 $m/z 145$ 가 MRM을 위한 이온으로 선택되었고 충돌 에너지는 47 eV이었다. 5개의 estrogen의 텐텀질량 스펙트럼에서는 $m/z 145$ 이온이 공통적인 토막이온으로 나타나고 있는데 이는 $[C_{10}H_9O]^-$ 에 해당된다(Table 2).

생성이온들 중에서 가장 세기가 큰 이온이 정량이온(quantitation ion)으로 선택되었으며, 차순 크기의 이온

Table 2. Retention time, precursor ion and product ion of five estrogens by LC/MS/MS

Estrogens	R.T. (min)	Precursor ion (m/z)	Confirm ion (m/z)	Quantitation ion (m/z)	Collision Energy (eV)
estriol (E3)	9.54	287	145	171	45
β -estradiol (E2)	13.17	271	145	183	45
17α -estradiol (α E2)	13.22	271	183	145	45
17α -ethylestradiol (EE2)	14.05	295	159	145	40
estrone (E1)	14.33	269	183	145	40
β -estradiol- d_2 (ISTD)	6.50	273	147	185	47

들이 확인이온(confirmation ion)으로 선택되어 정성화인을 하는데 사용되었다(Table 2).

3.2. 검출한계, 정량한계, 절대회수율, 정밀도 및 정확도

스크리닝을 통해서 분석물질인 스테로이드 에스트로겐이 검출되지 않은 바탕 하천수에 에스트로겐 표준물질을 첨가시켜서 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 측정하였다. 절대 회수율(absolute recovery) 조사를 위해서 바탕 시료(blank sample)에 저농도, 중간농도, 고농도가 되도록 각 분석물질을 소량첨가(spike)하여 분석한 결과 낮은 농도에서도 비교적 만족할만한 절대 회수율을 얻음을 보여주었다(Table 3).

LOD를 측정하기 위해서는 LOD를 예측한 후 예측한 농도에 해당하는 시료 7개를 만들어 2.3.2. 시료 전처리에서 제시된 방법에 따라 전처리를 거쳤다. 다른 높은 농도(예측 LOD의 10배 농도)의 시료를 마찬가지로 만들어서 전처리를 거친 후 분석하여 검정곡선의 기울기(one-point 검정곡선)를 구하였다. 예측 LOD 농도 시료 7개를 앞에서 만든 검정곡선에 대입하여 정량한 후 표준편차(s)를 구하고, 검정곡선에서 구한 기울기(m)으로부터 검출한계(LOD)(=3s/m)와 정량한계(LOQ)(=10s/m)를 구하였다.

정확도는 $\text{bias} = (\text{계산값} - \text{측정값}) \times 100 / \text{계산값}$ 로 나타내었으며 낮은 농도, 중간농도, 높은 농도에 대해서 각각 나타내었는데 -9.1~9.3%로 양호한 정확도를 나타내었는데 각 에스트로겐에 대해서 대체적으로 낮은 농도에서 정확도가 벗어난 값을 나타내었다.

E3의 경우 검출한계는 0.154 ng/mL이었고 정량한계는 0.514 ng/mL이었다. 절대회수율은 80.7~86.1%이었으며 낮은 농도(0.15 ng/mL), 중간농도(0.5 ng/mL), 높은 농도(1.0 ng/mL)에서의 정밀도(n=3)는 4.2, 5.3, 2.1 RSD%이었다. E2와 α E2의 경우는 LOD와 LOQ가 0.071~0.073 ng/mL 및 0.235~0.243 ng/mL이었으며 회수율은 69.5~95.1%이었으며 정밀도는 0.4~6.9 RSD%이었다. EE2의 경우 검출 감도가 가장 좋았는데 LOD와 LOQ는 0.055 ng/mL와 0.184 ng/mL이었다. 이는 절대회수율이 다른 에스트로겐에 비해 약간 높았기(88.8~95.1%) 때문으로 사료된다. E1의 경우는 검출한계가 0.085 ng/mL이었으며 정량한계는 0.283 ng/mL이었으며 절대회수율도 81.1~84.6%의 양호한 회수율을 나타내었으며 정밀도(RSD)는 2.8~7.9%이었다(Table 3).

3.3. 검정곡선

하천수 중에 잔류하는 스테로이드 에스트로겐의 양

Table 3. Recovery, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and accuracy (n=3)

Estrogens	LOD* (ng/mL)	LOQ** (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD(%)	Bias*** (%)
estriol	0.154	0.514	0.154	86.1	4.2	9.3
			0.5	84.3	5.3	-1.2
			1.0	80.7	2.1	1.3
β -estradiol	0.073	0.243	0.073	72.7	1.0	-9.1
			0.5	69.5	2.6	4.3
			1.0	76.2	0.4	-3.6
17 α -estradiol	0.071	0.235	0.071	92.6	6.9	-1.8
			0.5	94.7	5.4	2.2
			1.0	95.1	4.4	-2.0
17 α -ethylestradiol	0.055	0.184	0.055	91.5	3.2	-2.0
			0.5	89.9	4.9	1.4
			1.0	88.8	5.7	1.9
estrone	0.085	0.283	0.085	84.6	2.8	2.7
			0.5	84.3	6.5	-5.8
			1.0	81.1	7.9	1.1

*LOD : Limits of Detection (at 3s/m)

**LOQ : Limits of Quantification (at 10s/m)

***Bias : $= (\text{calculated value} - \text{measured value}) / \text{calculated value} \times 100$

Table 4. Calibration equation and coefficient of correlation for the quantification for the quantitation of five estrogens

Estrogens	Concentration range (ng/mL)	Linear equation	Coefficient of correlation (r^2)
estriol	0.15~1.0	$y=1.9000x + 0.0434$	0.9982
β -estradiol	0.07~1.0	$y=2.5340x - 0.0447$	0.9916
17 α -estradiol	0.07~1.0	$y=1.6828x + 0.0831$	0.9952
17 α -ethylestradiol	0.05~1.0	$y=5.2613x + 0.2088$	0.9916
estrone	0.08~1.0	$y=106.4800x + 2.0869$	0.9935

을 측정하기 위해서, 시료 중에서 농도가 0.05~1.0 ng/mL의 범위에서 7개 농도(n=5)에 대해서 표준물질을 바탕 하천수에 소량첨가한 후 시료 전처리 과정을 거친 후 HPLC/ESI-MS/MS로 분석하고 내부표준법을 사용하여 검정곡선을 작성하였다. 검량선의 범위는 에스트로겐의 정량한계에 따라 다르게 작성되었으며, E3의 경우는 0.15~1.0 ng/mL 범위에서 $y=1.9000x + 0.0434$ 의 직선식을 나타내었고 상관계수(r^2)가 0.9982인 양호한 직선성을 나타내었다. E2와 α E2는 0.07~1.0 ng/mL 범위에서 r^2 은 0.9916과 0.9952를 나타내었다. EE2와 E1도 0.05~1 ng/mL와 0.08~1.0 ng/mL 범위에서 $r^2=0.99$ 이상의 좋은 직선성을 나타내었다(Table 4).

4. 결 론

본 논문에서는 HPLC/ESI-MS/MS를 이용하여 하천수 중에 잔류하는 에스트로겐 5종(17 α -ethylestradiol, β -estradiol, estrone, estriol 및 17 α -estradiol)을 동시에 분석하는 방법을 확립하였다. 확립된 분석방법은 바탕 하천수에 소량첨가한 시험에서 0.184~0.514 ng/mL 범위의 높은 감도를 나타내었고, 0.005~1.0 ng/mL 농도 범위에서 정량을 위한 좋은 직선성($r^2 > 0.99$)을 나타내었으며, 낮은 농도, 중간농도, 높은 농도에서 좋은 정밀도와 정확도를 나타내었다. 확립된 분석방법은 하천수중에 잔류하는 스테로이드 에스트로겐의 효과적인 분석방법으로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 경기대학교의 2008년도 교내연구비의 지원으로 이루어진 것이며, 경기대학교 특성화사업단의 LC/MS/MS를 사용하였음.

참고문헌

1. D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber and H. T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 36, 1202-1211.
2. X. S. Miao and C. D. Metacalfe, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 3731-3738.
3. M. Lindsey, M. Meyer and E. M. Thurman, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4640-4646.
4. Y.-H. Lin, C.-Y. Chen and G.-S. Wang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, 1973-1983.
5. V. Gabet, C. Miege, P. Bados and M. Coquery, *Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26, 1113-1131.
6. Y. K. K. Koh, T. Y. Chiu, A. Boobis, E. Cartmell, J. N. Lester and M. D. Scrimshaw, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1173, 81-87.
7. P. Labadie and E. M. Hill, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1141, 174-181.
8. G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari, and R. Samperi. *Sci. Total Environ.*, **2003**, 302, 199-209.
9. W. Yan, L. Zhao, Q. Feng and J.-M. Lin. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 3581-3587.
10. K. M. Lai, M. D. Scrimshaw, and J. N. Lester, *Crit. Rev. Toxicol.*, **2002**, 32, 113-132.
11. L. J. Mills and C. Chichester. *Sci. Total Environ.*, **2005**, 343, 83-95.
12. C. E. Purdom, P. A. Hardiman, V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter. *Chem. Ecol.* **1994**, 8, 275-285.
13. P.-D. Hansen, H. Dizer, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. McMaster, and C. Blaise, *Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, 448-451.
14. T. A. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg, and M. Bonerz. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3498-3504.
15. D. D. Fine, G. P. Breidenbach, T. L. Price, and S. R. Hutchins. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1017, 167-185.
16. A. Mouatassim-Souali, S. L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, and Y. J. Levi. *J. Sep. Sci.* **2003**, 26,

- 105-111.
17. S. Zuehlke, U. Duennbier and T. Heberer, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 52-58.
18. P. Gallo, S. Fabbrocino, F. Vinci, M. Fiori, V. Danese and Luigi Serpe, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2008**, 22, 841-854.
19. M. Grung, R. Lichtenthaler, M. Ahrl, K.-E. Tollefse, K. Langford and K. V. Thomas, *Chemosphere*, **2007**, 67, 108-120.
20. Y.K.K. Koh, T.Y. Chiu, A. Boobis, E. Cartmell, J.N. Lester and M.D. Scrimshaw, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1173, 81-87.
21. M. Kuster, D.A. Azevedo, M.J. Lopez de Alda, F.R. Aquino Neto and D. Barcelo, *Environment International*, **2009**, 35, 997-1003.
22. A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, R. Mastropasqua, R. Curini and A. Di Corcia, *Chromatographia*, **2002**, 56, 25-32.
23. M. Silvia Diaz-Cruz, Maria Lopez de Alda, Ramon Lopez and Damia Barcelo, *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38, 917-923.