

## 鱼体胆汁中壬基酚和双酚A的分析方法

吴明红, 潘辰苑, 杨明, 钱冬英  
(上海大学 环境与化学工程学院, 上海 200444)

**摘要:** 环境雌激素(environmental estrogens, EEs)已成为环境领域的热点问题, 其中壬基酚(nonylphenol, NP)和双酚 A(bisphenol A, BPA)因广泛存在于水生环境中, 对水生生物特别是鱼类造成了潜在的危害而备受关注. 但是, NP 和 BPA 在水体中的浓度不高, 难以对它们进行准确的测定. 鱼体胆汁具有较高的生物蓄积性, 可以通过鱼类胆汁来对污染物质进行测定, 从而反映水体的污染状况. 本工作主要从预处理(水解和固相萃取)和检测分析(色谱和质谱联用技术)两方面展开, 介绍了鱼体胆汁中 NP 和 BPA 的分析方法, 并比较了不同处理、分析方法的灵敏度和优缺点, 为建立 NP 和 BPA 等 EEs 类物质在水生生物样品中的检测方法提供参考.

**关键词:** 鱼; 胆汁; 双酚 A; 壬基酚; 环境检测

**中图分类号:** X 826

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1007-2861(2013)04-0423-06

## Analytical Methods for Monitoring Nonylphenol and Bisphenol A in Fish Bile

WU Ming-hong, PAN Chen-yuan, YANG Ming, QIAN Dong-ying  
(School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract:** The research on environmental estrogens (EEs) has become a hot issue in the field of environmental science. Nonylphenol (NP) and bisphenol A (BPA) attract much attention due to their wide existence in the aquatic environment, causing a potential hazard to aquatic organisms, especially to fish. However, chemical monitoring and analysis of NP and BPA is not easy to perform since their presence is always at relative low levels in various environmental media. Fish bile is of high bioaccumulation potential, and is a convenient material for chemical analysis of environmental pollutants. This review focuses on the analytical methods for monitoring NP and BPA in fish bile. Corresponding pretreatment (hydrolysis and solid-phase extraction) and detection methods including combined technology of chromatography and mass spectrometry are reviewed. In addition, sensitivity, advantages and disadvantages of different pretreatment and detection methods are compared to provide a reference for establishing methods for detecting NP, BPA and other EEs in aquatic organisms.

**Key words:** fish; bile; bisphenol A (BPA); nonylphenol (NP); environmental monitoring

壬基酚(nonylphenol, NP)和双酚 A(bisphenol A, BPA)属于环境雌激素(environmental estrogens, EEs), 是目前环境研究领域中的研究热点. NP 属于烷基酚类物质, 烷基酚是烷基酚聚氧乙烯醚的降解产物<sup>[1]</sup>, 已广泛应用于洗涤剂、塑料、乳化剂、农药以及工业和清洁用品等领域. BPA 是生产聚碳酸酯塑料、环氧树脂的原材料<sup>[2]</sup>. 由于 NP 和 BPA 在工业生产和生活用品中被普遍使用, 并不断排放在环境中, 在

河流以及其他水生环境(接纳污水排放)中可以广泛地监测到 NP 和 BPA 的污染<sup>[3-6]</sup>. NP 和 BPA 的污染对水生生物尤其是鱼类的生态造成了严重威胁. 有研究表明: NP 和 BPA 能够诱导卵黄蛋白原在雄鱼体内的产生<sup>[7-8]</sup>, 干扰精子的形成<sup>[9]</sup> 和睾丸的生长<sup>[10]</sup>, 降低雌鱼的产卵量等<sup>[11]</sup>.

因为 NP 和 BPA 对水生生态系统的危害, 近年来水体中 NP 和 BPA 的分析监测方法为越来越多的环

收稿日期: 2013-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11025526; 31100376; 41173120)

通信作者: 钱冬英(1965—), 女, 博士, 研究方向为污染控制与环境毒理学. E-mail: dyqian@shu.edu.cn

境研究者所关注. 由于这些物质在水生环境中的浓度往往是痕量的, 甚至以 ng/L 的浓度量级存在<sup>[12]</sup>, 这使得对其进行定量分析变得困难. 虽然 NP 和 BPA 在水体中的含量低, 但是在水生生物的组织中仍会检测到此类物质的污染. 例如: Arukwe 等<sup>[13]</sup>在大西洋鲑鱼的肠、肝、肾、腮、脑和胆汁等组织中检测到 NP 的存在; Liu 等<sup>[14]</sup>在鱼体组织中检测到多种酚类内分泌干扰物(包括 NP 和 BPA)的存在.

鱼类的胆汁具有很强的生物蓄积性, 而胆汁是由肝脏产生, 并可以将某些代谢产物从肝脏排出, 因而在胆汁中这些物质(NP 和 BPA)通过积累作用可以达到一个较高的浓度, 便于测定. 此外, 胆汁相对于鱼体其他器官的分泌物更容易获得, 并且是以一种相对简单的基质存在, 因此使得化学预处理过程变得简单<sup>[15]</sup>. 因此, 通过对胆汁中 NP 和 BPA 的测定, 可以克服实际水体中二者浓度不高的困难, 从而反映污染状况.

## 1 样品的预处理

有效的预处理方法可以起到富集痕量组分、消除基质干扰、提高方法灵敏度的作用; 同时, 对于仪器和分析系统也可以起到保护的作用, 使分析测定能长时间保持在稳定、可靠的状态下运行<sup>[16]</sup>. 因此, 样品的预处理过程在分析过程中十分关键.

对于胆汁样品而言, 预处理主要包括水解和萃取.

### 1.1 胆汁的水解

目前有研究表明: 一些物质包括 NP 和 BPA 可以葡萄糖苷和硫酸盐聚合物的形式浓缩于鱼体胆汁中<sup>[17-19]</sup>. 因此, 对胆汁样品进行水解之后, 再利用萃取技术将所需的物质提取出来进行分析, 是一种好的定量方法.

对于胆汁的水解, 有多种酶解法. 主要包括 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(type VII-A from *E. coli*),  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶(from *H. pomatia*),  $\beta$ -葡萄糖苷(from *Caldocellum saccharolyticum* and expressed in recombinant *E. coli*)和硫酸酯酶(type VI from *A. aerogenes*). 胆汁的水解时间一般在16~18 h. Gibson等<sup>[20]</sup>利用 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶和 $\beta$ -葡萄糖苷3种酶对含有雌激素污染物的胆汁进行24 h水解, 结果显示: 16 h之后, 水解效果趋于稳定, 且在利用 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶温育后, 大部分雌激素活性被释放, 这证明了在胆汁中雌激素物质主要是以非活性的葡萄糖苷聚合物存在的. Budzinski等<sup>[21]</sup>利用 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶对胆汁进行水解. Vallejo等<sup>[22]</sup>也利用 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶和 $\beta$ -葡萄糖苷3种酶对胆汁进行了水解, 其中NP聚合物的水解效率为98%. 此外, Fenlon等<sup>[23]</sup>利用 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶和

硫酸酯酶对胆汁进行18 h水解后, 二者的水解效率在90%~100%. 由以上的研究可以看出:  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的使用是最为普遍的, 且一般都是将它和其他酶联合使用来对胆汁进行水解.

### 1.2 胆汁中烷基酚和 BPA 的萃取

目前关于萃取的方法主要包括: 液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取(solid phase extraction, SPE)、固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)、基体固相分散(matrix solid-phase dispersion, MSPD)萃取、搅拌子吸附萃取(stir bar absorptive extraction, SBSE)、分子印记聚合物(molecular imprinting polymers, MIPS)等. 对于胆汁样品中 NP 和 BPA 的测定, 则以 SPE 为主.

SPE 的基本原理是基于样品组分在固定相和流动相之间分配系数或吸附系数的差异. SPE 保留或洗脱的机制取决于目标组分与固相表面和液相之间的分子间作用力, 并在富集目标组分的同时去除样品基质中的干扰组分, 从而达到富集、分离和净化的目的. SPE 分离效率高, 使用方便快速, 但是对于较低浓度的污染物往往需要处理大体积的样品<sup>[24]</sup>.

SPE 作为一种新型的样品预处理技术已广泛应用于胆汁样品中雌激素类物质(包括 NP 和 BPA)的富集和分离. Fenlon 等<sup>[23]</sup>利用 Waters OASIS HLB SPE 柱对含有雌激素类物质的胆汁水解物萃取富集, 其中包括 NP 和 BPA, 结果显示二者的回收率均在 60% 以上. Gibson 等<sup>[20]</sup>也研究了用 Waters OASIS HLB SPE 柱对胆汁中雌激素类物质进行萃取的方法. Liedtke 等<sup>[25]</sup>采用石墨化炭黑为吸附剂, 利用其表面活性位点对胆汁中的雌激素类物质进行萃取, 实验效果理想. 此外, Labadie 等<sup>[26]</sup>也尝试利用 C18 和 LC-NH<sub>2</sub> SPE 柱对胆汁进行萃取.

SPE 过程一般分为柱子活化、上样、淋洗和洗脱. 活化的目的是去除固定相上的杂质以及使填料被溶剂润湿并溶剂化, 从而提高分析物的回收率和测定的重复性; 上样是使样品中的物质吸附在固定相上; 淋洗主要是去除固定相上的干扰组分; 洗脱在整个固相萃取过程中是至关重要的, 洗脱溶剂强度应足够大, 这样可以保证吸附在固定相上的分析物被洗脱下来. 此外, 选择的洗脱溶剂应与后续的测定相适应, 这样可以减少溶剂置换, 简化实验步骤. 目前, 对胆汁中 NP 和 BPA 等雌激素类物质使用的洗脱溶剂主要包括甲醇、乙酸乙酯、丙酮、正己烷、二氯甲烷等. 例如, Fenlon 等<sup>[23]</sup>使用乙酸乙酯和丙酮来进行洗脱, Liedtke<sup>[25]</sup>使用了二氯甲烷和甲醇, Gibson<sup>[20]</sup>选择了甲醇、乙酸乙酯和正己烷. 对于气相色谱-质谱联用技术检测来说, 洗脱溶剂使用较多的是乙酸乙酯; 而对于液相色谱-质

谱联用技术, 由于研究不多, 所以无法给出具体的溶剂; 但对于 NP 和 BPA 的检测, 甲醇常常作为流动相, 因此其作为 SPE 的洗脱溶剂, 可能是一个比较好的选择。

## 2 样品的检测分析

目前, 色谱和质谱联用技术是测定 NP 和 BPA 的主要分析技术, 它们在物质的定性、定量方面有着很大的优势。

### 2.1 气相色谱-质谱联用技术

气相色谱具有分离效率高和分离速度快的优势, 相对于液相色谱来说, 其对 NP 和 BPA 的测定灵敏度更高。但是利用单纯的气相色谱, 根据保留时间来对物质定性有很大的困难, 因此气相色谱质谱联用得到了发展, 从而解决了这一困难。

在测定 EEs 时, 常用的方法为气相色谱-质谱(GC-MS)法。气相色谱仪能够高效地分离样品中的各组分, 因此具有高分离效率的特性, 而质谱仪对物质的定性能力很强, 且灵敏度很高。

Larsson 等<sup>[18]</sup>利用 GC-MS 对瑞士污水厂污水中的 NP 和 BPA 进行测定以及对暴露于其中的鱼胆汁中的 NP 和 BPA 进行定量测定, 结果显示: 污水中 NP 和 BPA 的浓度分别是 840 和 490 ng/L, 而暴露 2 周后的鱼胆汁中 NP 和 BPA 分别为 10  $\mu\text{g/g}$  和 6  $\mu\text{g/g}$ , 暴露 4 周后分别为 25 和 15  $\mu\text{g/g}$ 。这说明二者在胆汁中可以通过积累而达到一个较高的浓度。Gibson 等<sup>[20]</sup>和 Rostkowski 等<sup>[27]</sup>对水解后胆汁中的污染物先用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分离后, 再用 GC-MS 进行定量分析。Labadie 等<sup>[26]</sup>利用大比目鱼为实验材料, 将其暴露于含有烷基酚类、BPA 等物质的石油中, 利用 GC-MS 对水解后胆汁中的 12 种雌激素进行分析, 结果发现 BPA 和 NP 显示出了高的雌激素活力。Vigano 等<sup>[28]</sup>也建立了利用 GC-MS 对意大利波河上游和下游中鲤鱼、白鲑和触须白鱼的胆汁里的 NP 和 BPA 测定的方法, 结果显示: 二者在胆汁中普遍存在, 且 NP 最高达到了 151 690 ng/mL 胆汁, 而 BPA 最高也有 5 220 ng/mL 胆汁, NP 和 BPA 的检测限分别为 2.53 和 0.65 ng/mL 胆汁。Pettersson 等<sup>[29-30]</sup>利用鲈鱼和虹鳟鱼胆汁对瑞典沿海水域和污水厂污水中的雌激素类物质进行评估, 对胆汁进行水解、萃取之后, 通过 GC-MS 分析, 检测到了 NP 和 BPA 的存在。此外, Fenlon 等<sup>[23]</sup>使用 SPE-GC-MS/MS 联用技术, 对暴露于污水厂污水中的鱼的胆汁进行分析测定, 检测到了 NP 和 BPA, 并且二者的检测限分别为 60 和 0.1 ng/mL 胆汁。因此, 通过胆汁的检测对河流的污染状况进行评价是一个好的方法。

### 2.2 液相色谱-质谱联用技术

由于 BPA 和 NP 的极性较强, 因此使用 GC-MS 和 GC-MS/MS 分析之前, 需对样品进行衍生化处理, 降低其极性后易于汽化, 从而提高分析的敏感性和选择性。但是这样就使得分析过程变得复杂化。

用 LC-MS 法来测定酚类物质不需要进行衍生化, 这样可以保持物质的组成不变, 具有重现性好、选择性高的优点。例如 Arukwe 等<sup>[13]</sup>利用 LC-MS 对大西洋鲑鱼胆汁中的 NP 进行了测定。

单纯的 LC-MS 灵敏度较低, 因此针对极性化合物, LC-MS/MS 技术逐渐得到应用和发展, 由于其具有良好的灵敏度且可以简化样品检测的前处理过程等优点, 因此成为一些内分泌干扰化合物(如烷基酚类、合成或天然类固醇类化合物)检测的常规方法。目前 LC-MS/MS 对水体或其他介质中 NP 和 BPA 的测定较多, 而对于鱼类胆汁的测定很少。例如, Scullion 等<sup>[31]</sup>建立了 SPE-LC/MS 技术, 对地表水中表面活性剂进行测定, 回收率大约为 100%。Dorival-Garcia 等<sup>[32]</sup>为了建立一种选择性强、高灵敏度的方法, 利用 LC-MS/MS 对污水厂污泥中的 BPA 含量进行测定, 效果理想。Dupuis 等<sup>[33]</sup>关注人体的健康, 利用 LC-MS/MS 检测了饮用水中的 NP 和 BPA。关于胆汁, Liedtke 等<sup>[25]</sup>利用 LC-MS/MS 对瑞士图恩湖中的白鱼胆汁进行测定, 检测到了雌激素的存在。

表 1 是对应用鱼类胆汁检测雌激素类物质(包括 NP 和 BPA)的各种方法进行总结。

## 3 总结与展望

目前, EEs 在环境中广泛存在, 而作为常见的 EEs, NP 和 BPA 备受关注。由于人类普遍使用含有这两种化合物的日常消耗品, 例如洗涤剂、塑料等, 使得它们广泛地存在于水生环境中, 对水生生物(特别是鱼类)造成了潜在的危害。由于 NP 和 BPA 在水体中的浓度不高, 因此对它们的测定很困难。鱼体胆汁具有很高的生物蓄积性, 且相对于其他器官来说更容易获得, 因此可以通过其对污染物质进行测定, 从而反映水体的污染状况。

本研究主要从预处理和检测分析两方面对鱼体胆汁中 NP 和 BPA 的测定进行介绍。预处理包括胆汁的水解和萃取: 水解通过 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶、 $\beta$ -葡萄糖苷和硫酸酯酶等水解酶来进行, 以 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶为主; 而萃取以 SPE 为主。检测分析包括 GC-MS, GC-MS/MS 和 LC-MS, LC-MS/MS。目前使用较多的是 GC-MS, 而 LC-MS 使用较少, 可能的原因是 LC-MS 或 LC-MS/MS 使用的仪器相对昂贵, 并且与气质联用相比需要更高的专

表 1 鱼体胆汁中雌激素类物质的分析方法  
Table 1 Analytical methods for monitoring of estrogens in fish bile

| 研究者          | 样品的预处理                                 |                                       |             | 检测分析        |
|--------------|--|---------------------------------------|-------------|-------------|
|              | 胆汁的水解                                  | SPE                                   |             | 仪器类型        |
|              |  | 柱子类型                                  | 洗脱液         |             |
| Budzinski等   | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶                | C18 和 NH <sub>2</sub> 柱               | 甲醇          | GC-MS       |
| Fenlon 等     | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶                   | OASIS HLB SPE 柱                       | 乙酸乙酯、丙酮     | GC-MS/MS    |
| Gibson 等     | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶和 $\beta$ -葡萄糖苷    | OASIS HLB SPE 柱                       | 甲醇、乙酸乙酯、正己烷 | HPLC, GC-MS |
| Labadie 等    | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶                | C18 和 NH <sub>2</sub> 柱               | 乙酸乙酯、甲醇     | GC-MS       |
| Larsson 等    | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶                        | 正己烷/甲基叔丁基醚<br>(没有使用 SPE)              |             | GC-MS       |
| Liedtke 等    | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶-芳香基硫酸酯酶、 $\beta$ -葡萄糖苷 | Vacmaster-20 Box 柱<br>(含有石墨炭黑)        | 二氯甲烷、甲醇     | LC-MS/MS    |
| Pettersson 等 | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶                   | 正己烷/甲基叔丁基醚                            |             | GC-MS       |
| Vallejo 等    | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶和 $\beta$ -葡萄糖苷    | OASIS HLB SPE 柱                       | 乙酸乙酯        | GC-MS       |
| Vigano 等     | $\beta$ -葡萄糖醛酸酶                        | LiChrolut <sup>®</sup> EN 柱<br>(含有硅胶) | 甲醇          | GC-MS       |

业技能培训。但是气质联用(如GC-MS, GC-MS/MS)也有其缺点,对于极性较强、不容易汽化的有机物,在利用其进行分析测定之前,需先对物质进行衍生化处理,这样就增加了实验的复杂性。对于衍生化来说,可能存在衍生化不完全的问题,因此就还需要对衍生化的条件进行摸索。此外,衍生化处理不适用于热不稳定化合物,对于一些有复杂基质的实际样品,除分离上的困难外,还容易出现污染进样器和损坏检测柱等情况。因此,对于有条件的实验室来说,利用液质联用法来对物质进行分析将是一个不错的选择。

### 参考文献:

- [1] GLADZALA-KOPCIUCH R, FILIPIAK A, BUSZEWSKI B. Isolation, purification and determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous and biological samples [J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 655-660.
- [2] CHEN T C, SHUE M F, YEH Y L, et al. Bisphenol A occurred in Kao-Pin River and its tributaries in Taiwan [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 161: 135-145.
- [3] AZEVEDO D A, LACORTE S, VIANA P, et al. Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal [J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2001, 49(1): 97-103.
- [4] BOLZ U, HAGENMAIER H, KORNER W. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Wurttemberg, south-west Germany [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 115(2): 291-301.
- [5] BELFROID A, VAN VELZEN M, VAN DER HORST B, et al. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements [J]. *Chemosphere*, 2002, 49(1): 97-103.
- [6] WU M H, WANG L, XU G, et al. Seasonal and spatial distribution of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in the Huangpu River and its tributaries, Shanghai, China [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(4): 3149-3161.

- [7] LINDHOLST C, PEDERSEN S N, BJERREGAARD P. Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 55(1/2): 75-84.
- [8] MARKEY C M, MICHAELSON C L, SONNENSCHIN C, et al. Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens [M]. Boston: Springer, 2001: 129-153.
- [9] KINBERG K, TOFT G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 54(1): 16-24.
- [10] JOBLING S, SHEAHAN D, OSSBORNE J A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(2): 194-202.
- [11] SOHONI P, TYLER C R, HURD K, et al. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(14): 2917-2925.
- [12] HIBBERD A, MASKAOUI K, ZHANG Z, et al. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment [J]. *Talanta*, 2009, 77(4): 1315-1321.
- [13] ARUKWE A, THIBAUT R, LNGBRIGTSEN K, et al. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 49(4): 289-304.
- [14] LIU J L, PAN X J, HUANG B, et al. An improved method for simultaneous analysis of steroid and phenolic endocrine disrupting chemicals in biological samples [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2012, 92(10): 1135-1149.
- [15] HAUSER-DAVIS R A, BASTOS F F, DE OLIVEIRA F, et al. Fish bile as a biomarker for metal exposure [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(8): 1589-1595.
- [16] 龚诚, 刁悦, 沈卫阳, 等. 环境内分泌干扰物的检测分析研究近况 [J]. *药学进展*, 2008, 32(12): 548-555.
- [17] FERREIRA A M R, HILL E M. Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2001, 51(1): 75-89.
- [18] LARSSON D G J, ADOLFSSON-ERICI M, PARKKONEN J. Ethinyloestradiol—an undesired fish contraceptive? [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 45(2/3): 91-97.
- [19] PEDERSEN R T, HILL E M. Tissue distribution and depuration of 4-tert-Octylphenol residues in the Cyprinid Fish, *Scardinius erythrophthalmus* [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(15): 3275-3283.
- [20] GIBSON R, TYLER C R, HILL E M. Analytical methodology for the identification of estrogenic contaminants in fish bile [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1066(1/2): 33-40.
- [21] BUDZINSKI H, DEVIER M H, LABADIE P, et al. Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386(5): 1429-1439.
- [22] VALLEJO A, USOBIAGA A, ORTIZ-ZARRAGOITIA M, et al. Focused ultrasound-assisted acceleration of enzymatic hydrolysis of alkylphenols and 17 $\beta$ -oestradiol glucuronide in fish bile [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398(5): 2307-2314.
- [23] FENLON K A, JOHNSON A C, TYLER C R, et al. Gas-liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the quantitation of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment work effluents and from wild populations [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(1): 112-118.
- [24] 任仁, 陈明, 武少华, 等. 环境样品中烷基酚和双酚A的分析方法 [J]. *北京工业大学学报*, 2004, 30(3): 348-353.
- [25] LIEDTKE A, SCHONENBERGER R, EGGEN R I L, et al. Internal exposure of whitefish (*Coregonus lavaretus*) to estrogens [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 93(2/3): 158-165.
- [26] LABADIE P, BUDZINSKI H. Alteration of steroid hormone balance in juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to nonylphenol, bisphenol A, tetrabromodiphenyl ether 47, diallylphthalate, oil, and oil spiked with alkylphenols [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 50(4): 552-561.
- [27] ROSTKOWSKI P, HORWOOD J, SHEARS J A, et al. Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents [J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(24): 10660-10667.
- [28] VIGANO L, MANDICH A, BENFENATI E, et al. Investigating the estrogenic risk along the river Po and its intermediate section [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51(4): 641-651.

- [29] PETTERSSON M, HAHLEBECK E, KATSIADAKI I, et al. Survey of estrogenic and androgenic disruption in Swedish coastal waters by the analysis of bile fluid from perch and biomarkers in the three-spined stickleback [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(12): 1868-1880.
- [30] PETTERSSON M, ADOLFSSON-ERICI M, PARKKONEN J, et al. Fish bile used to detect estrogenic substances in treated sewage water [J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 366(1): 174-186.
- [31] SCULLION S D, CLENCH M R, COOKE M, et al. Determination of surfactants in surface water by solid-phase extraction, liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of chromatography A*, 1996, 733(1/2): 207-216.
- [32] DORIVAL-GARCIA N, ZAFRA-GOMEZ A, NAVALON A, et al. Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, 101(15): 1-10.
- [33] DUPUIS A, MIGEOT V, CARIOT A, et al. Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2012, 19(9): 4193-4205.