



第三章 环境暴露组学的分析方法

第一节 环境暴露组学的气相质谱分析方法

气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), 作为一种灵敏、可靠的分析工具, 被广泛用于环境暴露组学研究中, 可对有机化合物进行精准的定性和定量分析, 有助于深入了解环境暴露物与疾病的紧密联系, 以及生物、化学和物理暴露组之间的相互作用。

一、环境暴露组学的气相分析方法

(一) 色谱发展历程

色谱技术的发展与该方法的先驱者 M.S.Tswett、A.J.P.Martin、R.L.M.Synge 和 A.T.James 密切相关 (图 3-1)。Tswett 使用了一根装满碳酸钙的窄玻璃管, 正确解释了色谱过程, 并奠定了一种新的实验室方法。1941 年, Martin 和 Synge 发表了具有重要意义的研究成果, 报道了通过在柱中使用两种液体溶剂的分配来分离混合化学物, 引入了分配色谱的概念。这些原理的引入证明了可以通过使用气体作为流动相实现分离, 从而催生了气相色谱 (gas-solid chromatography, GSC) 的发展。12 年后, Martin 和 James 介绍了使用 GLC (gas-liquid chromatography, GLC) 分离脂肪酸的方法。1959 年, Marcel J. E. Golay 发表了关于色谱柱的重要论文, 其中介绍了他对色谱柱的改进和创新。Desty

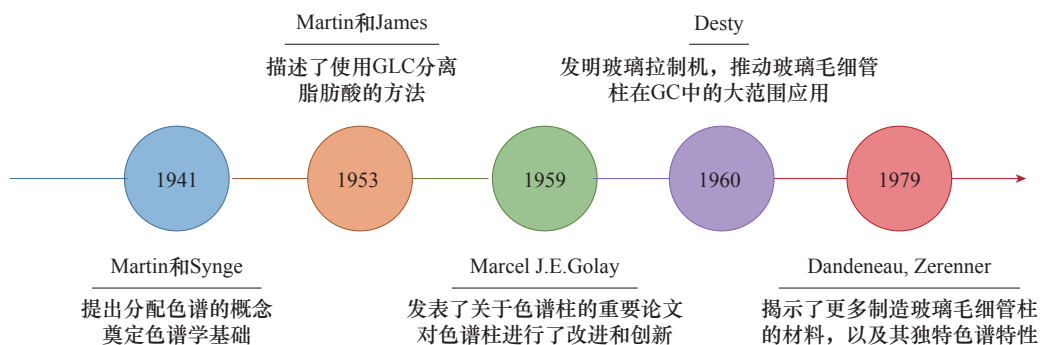


图 3-1 对 GC 色谱柱早期发展作出贡献的重要里程碑

研制出第一台玻璃毛细管柱拉制机，该装置有助于加强玻璃毛细管柱在GC分析中的地位。1979年Dandeneau, Zerenner对用于玻璃毛细管气相色谱法各种玻璃进行了研究，揭示了使用钾碱铅和熔融石英玻璃作为制造玻璃毛细管柱的材料的一些独特色谱特性。

（二）气相色谱原理

如图3-2所示，GC由几个部分组成：载气流量控制器、进样口、分离柱、柱炉、检测器和积分器图记录。气相色谱是以气体作为流动相（载气），通常使用惰性气体（如氢气、氮气或氦气）作为运载气体。当液态样品通过进样器进入充满载气的进样口时，受热汽化，随后被载气携带进入色谱柱中。混合物的组分由于其与固定相的相互作用差异而被分离。经过色谱柱的洗脱后，分离出的化合物通过检测器进行检测，检测器会产生与化合物浓度相对应的信号。

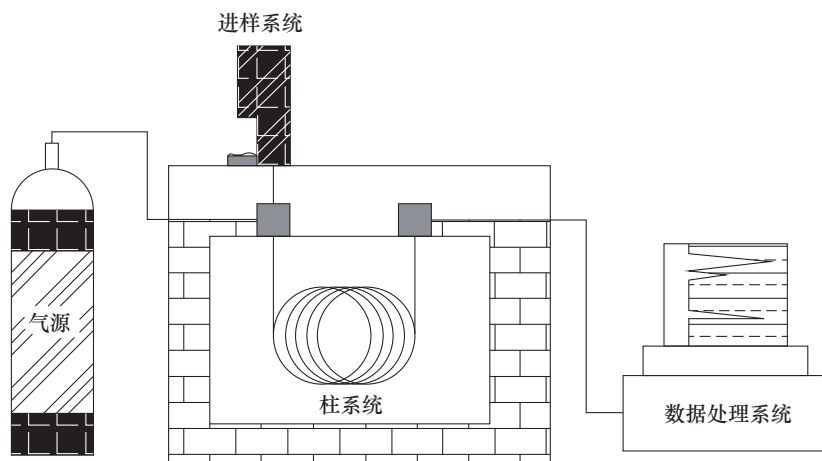


图3-2 气相色谱系统示意图

（三）气相色谱模式

GC是唯一不使用流动相与分析物相互作用的色谱形式。当固定相是固体吸附剂时，该过程称为气固色谱（gas-solid chromatography, GSC），当它是惰性载体上的液体时，该过程称为气液色谱（gas-liquid chromatography, GLC）。

GSC方法的基本原理是固体材料（吸附剂）表面吸附的差异。吸附的发生是由于非特异性（定向、诱导和分散）和特异性相互作用（络合、氢键等），并基于吸附剂和山梨酸盐的性质。具有足够的化学、物理和热稳定性的多孔材料被用作吸附剂。GLC分离原理是由于气态目标物与固定相相互作用而发生的物理化学分离。这种固定相是一种非挥发性液体，具有与目标分析物相似的极性，并沉积在固体载体上。被分析物质的蒸气与载气混合在柱中移动，由于溶解和蒸发过程的多次重复，流动气相和液体固定相的平衡多次建立。在固定相中溶解度较高的物质被固定相保留的时间较



长。因此，被分析的混合物被分离成单独的组分，这些组分依次离开色谱柱并被检测器识别。

(四) 气相色谱柱

GC系统中关键的组件是色谱柱，它是一个长而细的管状结构，内壁被涂覆上固定相，固定相可以是多种不同类型的材料，如聚硅氧烷、聚酸甲酯等。这些固定相具有不同的极性和选择性，可根据需要选择不同的色谱柱进行分析。样品中的组分在固定相上的亲和力不同导致它们以不同的速率被吸附和解吸，从而分离开来，亲和力较大的组分会停留更长时间，而亲和力较小的组分则通过色谱柱快速移动，分离后的组分进入检测部分。

(五) 气相色谱检测器

有几种检测器与气相色谱耦合，如热传导检测器（thermal conductivity detector, TCD），火焰电离检测器（flame ionization detector, FID），电子捕获检测器（electron capture detector, ECD）和质谱仪（mass spectrometer, MS）。

TCD检测器是最早为GC开发的探测器之一（图3-3）。TCD的基本原理是通过监测灯丝电导率的变化来检测载气和样品之间的导热性。TCD是一种通用检测器，可以对所有与载气具有不同热导率和热容的分析物做出响应。TCD对导热系数有响应，因此对流量非常敏感。TCD通常采用两个检测器，其中一个用作载气的参考，另一个用于监测载气和样品混合物的热导率。氦气和氢气等载气具有非常高的导热性，因此即使添加少量样品也很容易被检测到。TCD的优点是使用方便简单，设备广泛应用于无机和有机化合物，以及分离和检测后收集分析物。TCD的最大缺点是除了流速和浓度依赖性外，仪器相对于其他检测方法其灵敏度较低。

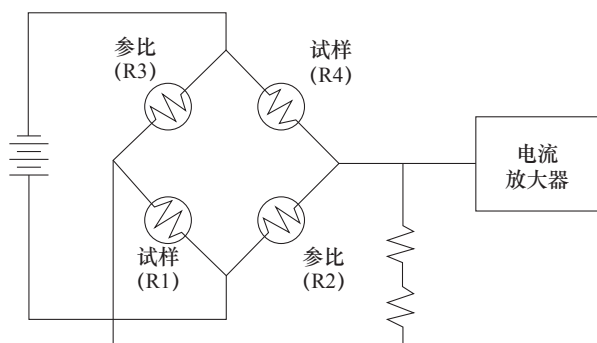


图3-3 热导检测器示意图

FID是一种通用检测器（图3-4），是检测有机化合物（即碳氢化合物）最常用的气相色谱检测器，它对含碳化合物具有很高的灵敏度。FID对所有在氢氧火焰中燃烧的有机化合物都有反应。FID对无机化合物的交叉敏感性也很低。虽然FID易于使用且不受

流量影响，但FID需要三个单独的气体供应并会破坏样品（破坏性）。FID需要氢气作为燃料，氦气或氮气作为载气，氧气或空气作为燃烧。FID的原理是有机化合物在氢气空气火焰中燃烧而电离。随后将气体样品置于氢气火焰中，样品中的碳氢化合物被火焰电离，然后用电场提取。这个过程的结果是产生的电流，等于样品的总碳含量。

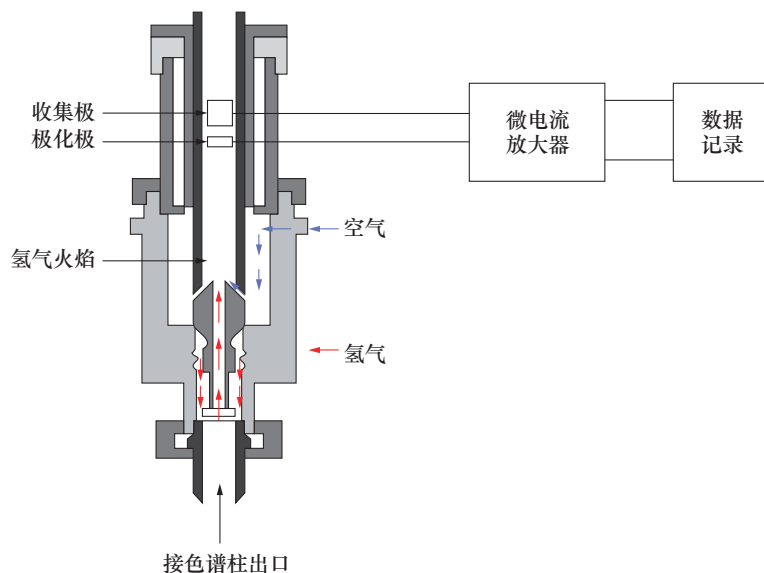


图3-4 典型FID的示意图

ECD又称电子亲和检测器或电子吸收检测器，是一种浓度高、灵敏度高、特异的检测器（图3-5）。ECD用于检测电子仿射化合物。ECD对电负性化合物（即卤素）的灵敏度很高，但检测限也很低。为了产生电子和离子，须使用低能 β 射线源。使用不同的载气会影响电子的各种性质，如热化速率；载气也可能影响分子的电离，使ECD信号复杂化。ECD通常使用甲烷和氩气的混合物。ECD是由一个含有放射源和两个极化电极的电离室组，可利用放射性发射器电离粒子。ECD根据吸附的电子来检测分析物

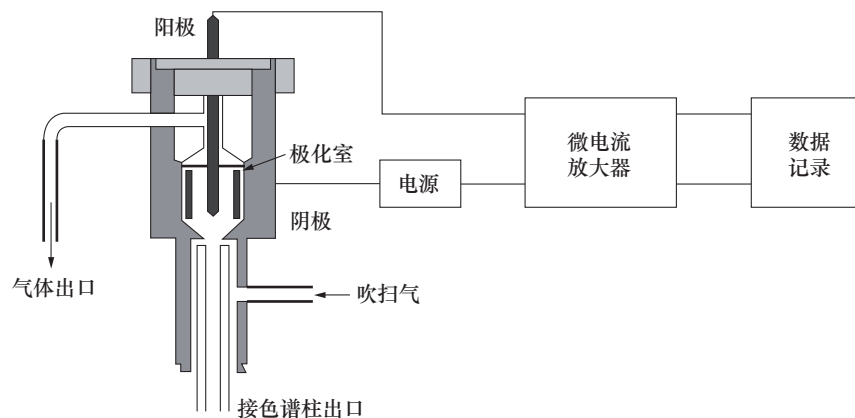


图3-5 ECD示意图



的浓度。

二、环境暴露组学的质谱分析方法

质谱仪以离子源、质量分析器和离子检测器为核心（图3-6）。在质谱仪中，分子被电离，通过电场加速进入质量分析器中。在质量分析器中，会根据它们不同的质荷比（ m/z ）被分离。分离后的离子依次进入离子检测器，离子检测器采集放大离子信号，经计算机处理，绘制成质谱图，每个化合物都有其独特的质谱图谱，利用计算机软件对质谱图进行处理和分析，可以对化合物进行定性和定量。

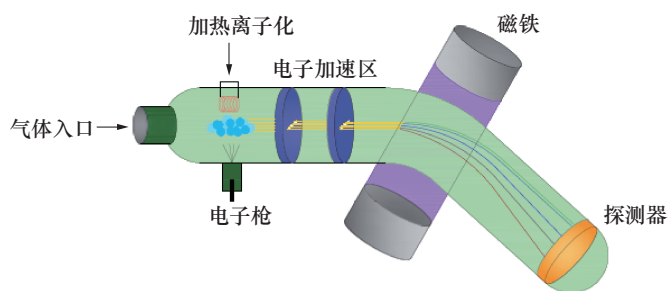


图3-6 质谱仪原理图

GC-MS一般会配备电子轰击离子源（electron impact ion source, EI），EI源的谱图是在70 eV条件下获得的，可以匹配NIST谱库进行未知化合物检索，是GC-MS的通用型离子源。除了EI源，还有化学电离源（chemical ionization, CI）、场致电离源（field ionization, FI）及场解吸电离源（field desorption, FD），可以根据检测化合物的不同，选择适合的离子源。

质谱仪的种类非常多，根据质量分析器的不同，可将质谱分为离子阱质谱、四级杆质谱、轨道阱质谱、飞行时间质谱等。目前，环境暴露组学领域常见的质谱多为它们的串联形式，如四极杆串联飞行时间（Q-TOF）、四极杆串联轨道阱（QE）、三重四极杆（QQQ）、三重四极杆复合线性离子阱（Q-TRAP）。Q-TOF和QE属于高分辨质谱，其中Q-TOF类型质谱是目前使用最多的高分辨质谱，该类仪器将四极杆-飞行时间两种分析器联用，通常以四极杆为质量过滤器，以TOF作为质量分析器，能够提供高分辨的二级谱图，定性能力优于QQQ。而三重四极杆是最灵敏和重现性最好的定量仪器，具有多种扫描模式：子离子扫描、母离子扫描、中性丢失扫描、单离子反应监测、多反应监测（MRM），其中MRM模式应用最为广泛，特别是需要精确定量时。MRM模式中通过两级离子的选择，排除大量干扰离子，目标检测物的信噪比显著提高，同时可进行连续的离子扫描分析，得到串联质谱碎片数据，与全扫描和中性丢失质谱扫描模式相比，降低了分析过程中定性结果的假阳性率，保证了分析的准确度。

三、气相色谱的质谱分析方法在环境暴露组学中的分析流程

(一) 样品预处理

进行环境暴露组学气相色谱分析前，要对样品进行预处理，首先需要收集感兴趣的样品比如土壤、水样、生物组织或其他类型的样品，采集过程中遵循适当的采样方法，以避免样品受到污染或损坏。采集到的样品要进行标识并记录相关信息，比如采样日期、位置、样品描述等，这将有助于跟踪和识别样品，并确保数据的可靠性和可追溯性。在某些情况下，可能需要将混合样品进行分离，以获取所需的组分或减少干扰物的影响。常见的分离方法包括离心、过滤、萃取等。对于植物组织或者土壤这样的植物样品，通常需要粉碎或研磨成粉状，再根据实验需求，对样品进行化学处理，比如pH调整、加入缓冲液、添加试剂等，以改变样品的性质或提取所需的组分。对于水或溶液这样的液态样品，需要通过滤器去除杂质、颗粒或微生物，净化样品。

(二) 样品衍生化

对于挥发性有机物 (volatile organic compounds, VOCs) 以及非极性化合物如烷烃、醚类、酯类等，这些化合物通常具有较好的挥发性，无须衍生化处理即可进行分析。对于一些难挥发的样品，需要进行衍生化处理，将代谢物转化为挥发性衍生物便于GCMS分析。衍生化可以降低极性及提高热稳定性，同时可改善峰形、分辨率和强度。衍生化方法有很多，甲氧肟化和硅烷化是最常用的方法之一 (图3-7)，甲氧肟化反应可以将游离羰基功能部分转化为肟衍生物，并防止形成环状结构，特别是碳水化合物和类固醇，这样就减少了每种化合物可能的立体异构体的数量，提高了检测灵敏度。硅烷化反应通过硅烷基取代羟基、羧基、巯基、氨基及亚氨基的活泼氢，代谢物被衍生为硅醚或硅酯。目前最多的硅烷化试剂是N-甲基-N-三甲硅基三氟乙酰胺 (N-methyl-n-trimethylsilyltrifluoroacetamide, MSTFA) 和N-O-双(三甲硅基)三氟乙酰胺。对提取物进行衍生化时，要使提取物干燥且没有残留的水分，水分会消耗硅烷化试剂导致反应不完全。针对水相样品可以用氯甲酸酯进行衍生，比如氯甲酸甲酯

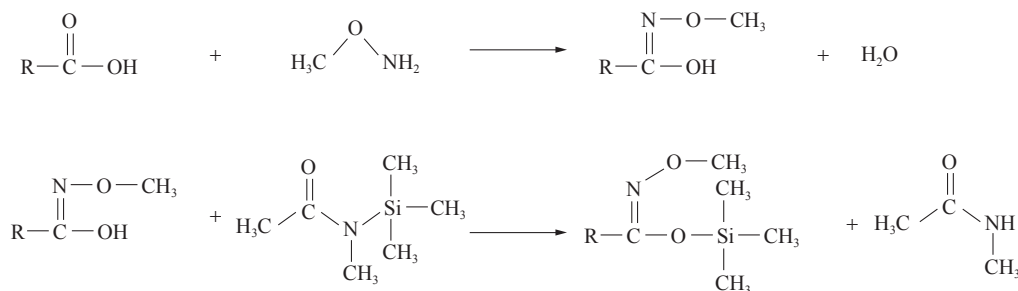


图3-7 MOX和MSTFA两步衍生的形成



(methyl chloroformate, MCF), 氯甲酸乙酯 (2-chloroethyl chloroformate, ECF) 和氯甲酸丙酯 (Propyl chlorocarbonate, PCF), 氯甲酸酯能够在室温下对氨基酸和非氨基酸的有机酸、磷酸化有机酸和脂肪酸中间体进行衍生化, 不易发生基质效应, 从而被广泛使用。

(三) 方法优化

环境暴露组学研究中优化GC-MS方法非常重要, 优化方法如选择适当的柱和固定相、优化进样条件、调整温度程序等。首先根据样品特性和目标分析物的化学性质, 选择合适的色谱柱, 如非极性柱、极性柱或选择柱, 同时也要选择恰当的柱长度、内径和填料内径, 保证组分可以顺利分开。调整柱温可以改变分离速度和选择性, 升高温度可以增加挥发性化合物的扩散速率, 从而提高分离速度, 然而过高的温度可能会导致某些化合物的降解或裂解, 因此优化色谱条件时应选择适当的温度。调整流速可以改变峰形, 流速过快会导致峰形状变宽或重叠, 从而降低分辨率。相反, 如果流速过慢, 分离时间会延长。因此, 需要在保持分离效果的同时, 找到适当的流速。

分流/不分流进样口是GC最常用的进样口, 分流进样可以减少载气中样品的含量, 使其符合毛细管色谱进样量的要求。分流进样适合于大部分可挥发样品, 包括液体和气体样品, 因此如果对样品的组成不很清楚, 应该首先采用分流进样口, 对于一些相对“脏”的样品, 更应采用分流进样, 因为分流进样时大部分样品被放空, 只有一小部分样品进入色谱柱, 这在很大程度上防止了柱污染; 如果分流进样不能满足分析要求时(灵敏度太低), 才考虑其他进样方式。在使用分流进样口时, 应根据样品情况调整合适的分流比, 因为可能会存在分流歧视的问题, 一定分流比条件下, 不同样品组分的实际分流比是不同的, 这就会造成进入色谱柱的样品组成不同于原来的样品组成, 从而影响定时分析的准确度。不分流进样具有明显高于分流进样的灵敏度, 也常常用于环境分析, 当样品比较脏时, 对样品的预处理是保护色谱柱所必须注意的问题。

在环境暴露组学研究中, 准确的定量分析是至关重要的。为了进行准确的定量测量, 应使用合适的标准物质进行校准和质量控制。优化GC-MS方法涉及建立标准曲线、确定检测限和线性范围, 及监控仪器响应和响应因子的稳定性。

GC-MS联用技术中的质谱参数也需要进行优化, 这包括优化离子源温度、碰撞能量和离子化方式等参数, 以获得良好的信号强度和质谱图的清晰度。同时, 考虑到环境样品中有机污染物的复杂性, 可能需要使用多级质谱(MS/MS)或选择离子监测(SIM)模式, 以提高分析的特异性和灵敏度。

(四) 数据处理和分析

首先, 需要对从GC-MS仪器中获取的原始数据进行预处理。这包括峰识别、峰面积计算和峰对齐等步骤。峰识别可以通过设置阈值和峰宽来自动或手动地确定峰的位置和形状, 计算每个峰的面积作为化合物的含量指标, 并进行峰对齐以消除不同样品

之间的保留时间漂移。

在大规模环境暴露组学研究中，可能会生成大量的特征峰（即代表化合物的峰）。为了降低数据维度并筛选出与目标分析相关的特征，可以使用特征选择方法，例如在运行过程中校正基线并解卷积任何彼此紧密共洗脱的峰，分离出独特的峰后，在数据处理期间进行峰对，以校正这种保留时间漂移，从而在所有样品中对齐相同的峰。最后，使用真实标准品或通过质谱库如NIST库等查询化合物质谱图鉴定分离的峰。此外，还可以对数据进行归一化处理，以消除批次效应和样品间的变异。一旦进行了特征选择和数据归一化，就可以应用多种统计学方法来分析GC-MS数据。例如，主成分分析（PCA）和偏最小二乘回归（PLS-DA）可以用于数据降维和样品聚类。另外，可以使用单变量或多变量的统计检验方法，如方差分析（ANOVA）或t检验，来比较不同组别之间的化合物含量差异。在GC-MS数据分析中，通常需要标识和注释特征以确定化合物的身份，这可以通过与已知数据库进行比对、质谱库搜索、保留指数计算和碎片图解等方法来实现。现代的GC-MS数据处理软件通常提供了许多工具和库来帮助进行标识和注释。一旦确定了化合物的身份，可以进一步进行生物学解释和功能分析，这包括寻找潜在的生物标志物、通路分析、生物标记物的疾病相关性评估等。此外，还可以结合其他组学数据（如基因表达数据或脂质组学数据）进行综合分析，以揭示环境暴露与生物响应之间的关系。

四、基于气相色谱的质谱分析方法在环境暴露组学中的应用

早在20世纪20年代，人们就逐渐开始关注大气中的环境暴露组学，Greenburg为了探究在矿山和工厂等多尘环境中的粉尘对工人身体产生的有害影响，设计了一种灰尘过滤检测器，并探究了粉尘吸入与疾病之间的定量关系。但由于当时的技术水平有限，这种宏观的检测方法只能粗略定量一些空气中的粉尘颗粒。随着色谱法检测技术的进步，GC-MS被广泛应用于环境暴露组学的研究工作与实际检测中。

外部化学环境通常指由空气、水体、土壤等组成的，具有直接或间接影响生物生存条件的环境。在空气中，挥发性有机化合物（VOCs）的浓度会直接影响城市的空气质量。过量的VOCs会对人体健康造成损害。利用GC-MS技术，可以准确检测大气样品中的短链烃类、多环芳烃、氯代有机物和其他有机污染物。然而，大气中有1/3或更多的细颗粒为二次有机气溶胶（secondary organic aerosol, SOA），SOA的前体为中等挥发性有机化合物（individual volatile organic compound, IVOCs），具体成分为C₁₁~C₂₂的烃类化合物。这些IVOCs往往很难被定量分析，因为随着碳数的增加，组成异构体的数量也呈指数增加。Zhao等人首先提出了一种GC-MS半定量方法，来估算环境空气中的IVOCs，并评价了不同时段下美国加利福尼亚州的空气中IVOCs的含量变化，发现在下午时段时，空气中的IVOCs含量增加约30%，但是该工作尚无法确定这部分IVOCs的来源。



对于水体和土壤，评估其中的污染物种类、污染程度以及采取适当的修复措施同样至关重要。Benfenati等在1990年的工作中，使用GC-MS对水中50余种农药残留物进行了检测，由于农药的毒理学活性大多是由其降解产物引起，他提取了样品水体中的活性物质和代谢物，并使用GC-MS进行检测，来验证水体中是否有农药残留。近年来，由于工业废水、燃烧余烬等的过度排放，更复杂的有毒化合物进入了水体和土壤，造成污染。构建合适的GC-MS方法，同样可以对这些有机污染物进行定量分析。Mikolajczyk等利用高分辨GC-MS，同时检测了水库的底部沉淀物以及鱼类肌肉中的二苯并对二噁英（dibenzo-p-dioxin, PCDDs）、二苯并呋喃（dibenzofuran, PCDFs）和多氯联苯（polychlorinated biphenyls, PCBs）的含量。结果表明，部分样本中的污染物水平明显偏高，鱼类体内的污染物的水平与分布直接反映了其环境的污染情况，若长期食用同种鱼类会导致人体内的毒素迅速累积，增加患病概率。

内部化学环境指的是个体本身的生活习惯、饮食习惯、生存环境等带来的影响。通过设计合适的GC-MS程序，可以对体内的代谢物或者毒素进行靶向检测。Lara-Guzmán等使用GC-MS，检测了饮用咖啡前后人体内的咖啡酸（caffeic acid, CA）和阿魏酸（ferulic acid, FA）的含量变化。CA和FA是绿原酸（chlorogenic acid, CGA）的前体，而CGA具有抗氧化活性，可降低患心血管疾病的概率。结果表明，摄入咖啡后1小时，血浆中检测到CA和FA，而对照组中未检测到。Li等使用气相色谱（GC）与串联质谱仪（MS/MS），定量分析了人体血液和血清样品中的呋唑和卤代呋唑的含量，呋唑和卤代呋唑的来源广泛，最终会通过饮用水、饮食摄入和皮肤接触造成健康损害。结果表明，部分样本检测出了少量呋唑，全部样品未检测到卤代呋唑。

目前，大多数工作都在有针对性地使用GC-MS进行一种或多种化合物的靶向检测，而人的一生中可能会积累接触百万种不同种类的化学品，它们共同作用，相互影响，最终影响人体的内部化学环境。因此，需要更全面的分析工作流程来实现非针对性的检测，以获得更丰富的暴露组学信息。Hu等开发了一种快速液体萃取（express liquid extraction, XLE）的单步样品制备方法，并与GC-HRMS（gas chromatography-high resolution mass spectrometry）结合使用，通过对人体血浆、肺、甲状腺和粪便样本的测试表明，该方法具有普适性，所获得的结果也反映了人体组织器官间在化学物质摄取、分布和清除方面的相互作用。

第二节 环境暴露组学的液相质谱分析方法

环境暴露组学旨在评价整个生命过程的全部环境因素对机体疾病和健康状态的影响，因此如何系统和全面考察复杂暴露组样本中所有环境暴露相关的标志物是暴露组学的关键点。基于液相色谱的质谱技术（liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS）分析复杂样品具有高效、高通量、高分辨率和高灵敏度等特点，可以为暴露标志

物的全面鉴定提供可行性技术。因此本节接下来将介绍LC-MS技术的基本原理、特点及在环境暴露组学中的应用。

一、环境暴露组学的液相分析方法

（一）液相色谱基本原理

在色谱分析中，以液体为流动相的分析方法通称为液相色谱法。液相色谱分析过程中，溶解在流动相中的不同组分与固定相的相互作用程度不同，导致被洗脱速率不同，最终各种组分先后流出色谱柱到达检测器，达到分离的效果。

按照流动相中的溶质和固定相的相互作用机制区分，液相色谱可分为分配色谱（partition chromatography）、吸附色谱（absorption chromatography）、离子交换色谱（ion exchange chromatography）和分子排阻色谱（molecular exclusion chromatography）四种主要类型。分配色谱是指利用不同组分在流动相和固定相中的分配系数（或溶解能力）不同从而实现分离。吸附色谱是指利用流动相中的不同组分和固定相吸附剂的吸附能力差异实现分离。离子交换色谱是流动相中的溶质离子与固定相表面带相反电荷官能团的静电作用力不同而得以分离。分子排阻色谱中的固定相材料与溶质分子不存在相互作用，但其表面具有较多不同尺寸的孔隙，这使得分子量较小的溶质通过孔隙被洗脱，滞留时间较长，而尺寸较大的分子不能进入孔隙只能沿着固定相材料分子间隙被洗脱，滞留时间较短，因此可以分离不同分子量的溶质。

按照操作形式区分，液相色谱法可以分为柱色谱法和平面色谱法。其中柱色谱法是最常见的分析方法，也是目前在环境暴露组分析中应用最广泛的一种分离模式，因此本小节接下来会重点介绍柱色谱法的分类及特点。

（二）液相柱色谱法的种类及特点

1906年，俄国植物学家Michael Tswett将碳酸钙粉末装入直立的玻璃管中，用石油醚当流动相成功分离了植物叶子石油醚提取物中的不同色素，开创了柱色谱法的先河。柱色谱（column chromatography）是一种将固定相装填于柱状金属或玻璃管内，且整个色谱分离过程都在柱内进行的色谱分析方法。柱层析法是一种经典的柱色谱法，其原理是利用样品中各组分的分子形状大小、溶解度和极性等性质的差异，使各组分逐步被洗脱。柱层析法具有操作简单、进样量大等优势，既可以用于少量组分的分析，也可用于大规模的纯化和制备。但在柱层析中，流动相在重力作用下向下流动，因此柱压较低，流速较小，分离速度较慢，且固定相填料粒径均较大，使提高柱效和分离度具有很大的局限性。

相较于柱层析法，高效液相色谱法（high performance liquid chromatography, HPLC）是一种改进的自动化程度较高的柱色谱法，其主要特点是高压、高速、高效和高灵敏



度等。在高效液相色谱系统中，首先高压输液泵输送流动相通过色谱柱，其最大耐受压力一般为6000 psi左右，能够支持流动相的高流速洗脱。其次色谱柱的固定相通常是由粒径5~20 μm的固体颗粒（如二氧化硅等）制成的材料，因此柱效和分离度远远高于经典的柱色谱法。相较于气相色谱，高效液相色谱不需要待测组分满足一定的挥发性和热稳定性，样品前处理简单且没有烦琐的衍生化，分离温度低，分离物质快速、高效。最重要的是，高效液相色谱可以结合质谱技术等其他高灵敏度、高选择性的检测器，可以纯化和制备单一组分，是目前环境暴露组学研究中最常用的分析技术。

高效液相色谱系统由流动相储液瓶、高压输液泵、进样器、色谱柱、检测器、和记录仪等组成，其中色谱柱是决定分离模式的核心部件。高效液相色谱中常用的色谱柱有正相（normal phase, NP）、反相（reverse phase, RP）、亲水性相互作用（hydrophilic interaction chromatography, HILIC）和离子交换（ion exchange chromatography, IEC）等其他类型。根据化合物的性质，选择相应的分离模式，可以提高对样品的分析灵敏度和选择性。

1. 反相液相色谱法

反相液相色谱法在所有的液相色谱分离模式中占到90%，是目前发展最成熟和使用最普遍的分模式，已经被广泛应用于环境暴露组中非极性和中等极性化合物的分离和鉴定。如图3-8所示，反相液相色谱柱通常采用非极性固定相材料，如在硅胶颗粒上通过化学反应键合C₈或者C₁₈，流动相多采用极性洗脱液（如水、甲醇、乙腈和异丙醇等），通过调整水相和有机相的比例来控制分析物的洗脱顺序。不同物质的洗脱保留时间随着分析物的疏水性、固定相的疏水性以及流动相极性的增加而增加。

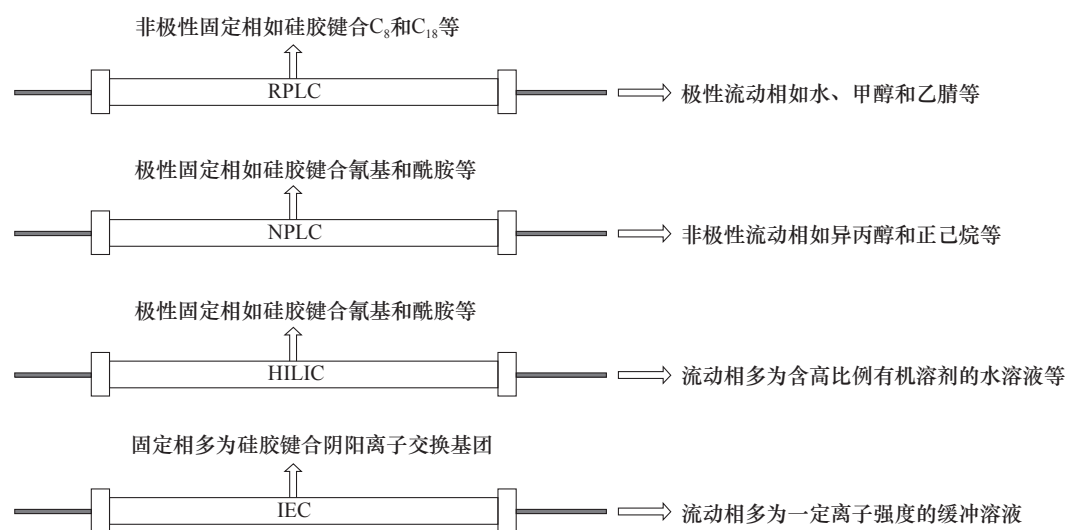


图3-8 反相、正相、亲水性相互作用和离子交换色谱柱的固定相和流动相类型

2. 正相液相色谱法

正相液相色谱法广泛应用于暴露组中极性化合物的分离。如图3-8所示，正相液相

色谱柱通常采用极性较大的固定相材料，如在硅胶颗粒上修饰氰基、醇羟基和酰胺等极性基团，流动相通常为极性较低的异丙醇、三氯甲烷和正己烷等溶剂。溶质分子的保留依赖于分析物与固定相极性基团的相互作用，因此非极性或极性较小的物质先被洗脱出来。

3. 亲水性相互作用色谱法

在反相色谱法中，通常极性、弱酸或弱碱性的分析物不能被很好地保留，而使用亲水性的正相色谱法可以很好地解决这个问题，也即亲水性相互作用色谱法。如图3-8所示，亲水性相互作用色谱法采用和正相色谱类似的极性固定相（如在硅胶表面修饰氰基和酰胺等极性基团），同时流动相是与反相色谱类似的水相和有机相体系，但洗脱体系中有有机相的比例一般超过50%。亲水性相互作用色谱法广泛应用于复杂暴露组样品中极性物质的分析。

4. 离子交换色谱法

亲水性相互作用色谱法可以用来分析强极性化合物及非挥发性的有机离子等，但是在分析离子型和可电离的分析物方面存在分离度低和峰形差等局限性。离子交换色谱法是利用分析物离子与固定相之间的静电作用力不同而实现分离，因此该方法在分离离子型和可电离分析物方面具有很大优势。如图3-8所示，该方法采用硅胶键合离子交换基团的离子交换柱，通常选择具有一定pH和离子强度的缓冲溶液当流动相进行洗脱。分析物的保留取决于总静电荷数目、电荷密度以及表面电荷分布等带电性质。离子交换色谱法目前已经被广泛应用于暴露组样品中有机和无机离子化合物的分析。

5. 其他液相色谱法

除了以上四种主流的液相色谱法外，手性色谱法和亲和色谱法等也在环境暴露组学分析中有一定的应用。手性色谱法可以用于复杂组分中对映异构体的分析，常用的方法包括：

(1) 使用手性固定相进行对映异构体的拆分，如环糊精（cyclodextrins, CDs）、多糖、大环内酯类抗生素和冠醚等固定相材料；图3-9A是经典手性固定相材料 β -环糊精的结构，其中包含7个葡萄糖单元。其整个外形呈水桶状，桶的小口是由葡萄糖单元的伯羟基组成，大口由葡萄糖单元的仲羟基组成，内腔具有明显的疏水性，这种独特的空间结构决定其能够选择性地包结不同结构的分子，因此被广泛用作手性固定相材料。

(2) 构建手性流动相环境进行对映异构体的拆分，如把环糊精和手性离子对试剂等添加至流动相中。

(3) 手性衍生化：使用衍生化试剂把一对对映异构体转换成非对映异构体，再使用主流的液相色谱法进行分离检测。图3-9B为亲和色谱法的基本原理示意图，其是利用生物大分子间的专一和可逆的结合来实现组分的分离和纯化，是一种选择性最强的液相色谱方法。

近年来，超高效液相色谱（ultra-high performance liquid chromatography, UPLC）是在高效液相色谱基础上发展起来的一种液相技术。该技术采用了更小粒径（小于 $2\ \mu\text{m}$ ）

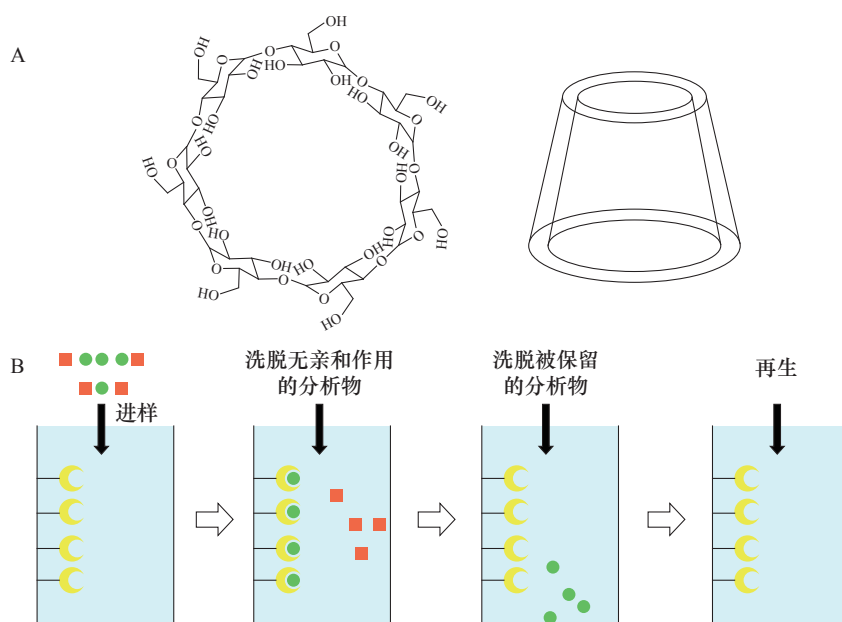


图3-9 经典手性固定相材料 β -环糊精的结构 (A) 和亲和色谱法的基本原理示意图 (B)

的固定相填料，以及压力更高的输液系统（6000~19 000 psi），使得该技术具有以下更优越的性能：更高的柱效；更短的分析时间；更高的峰容量；更少的溶剂消耗量；更低的基质效应和更高的离子化效率等，因此超高效液相色谱法在暴露组学分析中的应用更加广泛。

（三）多维液相色谱法

近年来，随着色谱柱的固定相类型、填料粒径和高压输液系统的技术创新，液相色谱法的发展已逐步趋于完善。但总体来讲，一维色谱的峰容量有限，在快速分离复杂样品方面仍具有一定的局限性，因此色谱的分离模式也逐渐由一维模式向多维模式发展。

多维液相色谱法是指将两种以上不同分离机制的色谱柱进行联合使用，与一维液相色谱相比具有更高的分辨率和峰容量，尤其适用于复杂环境暴露组样本的分析，其中最常见的是二维液相色谱。二维色谱的峰容量取决于各自分离机制的正交性，正交性越大，峰容量和分离能力也越强。二维液相色谱根据操作模式分为离线和在线两种类型。如图3-10所示，离线模式是指先将一维液相不同保留时间的洗脱物收集保存，经浓缩复溶后再分别进入第二维液相进行分析，该模式操作相对复杂，但对仪器的要求较低。在线模式是指一维液相的洗脱物直接进入二维液相进行分析，这种模式自动化程度较高，可降低人为误差，但对仪器技术要求较高。目前常见的二维液相色谱法有RPLC和NPLC二维液相色谱，RPLC和HILIC二维液相色谱等。Tiantian Zuo等研究者使用HILIC和RPLC二维液相色谱法结合离子迁移技术从人参粉末样品中共鉴定出

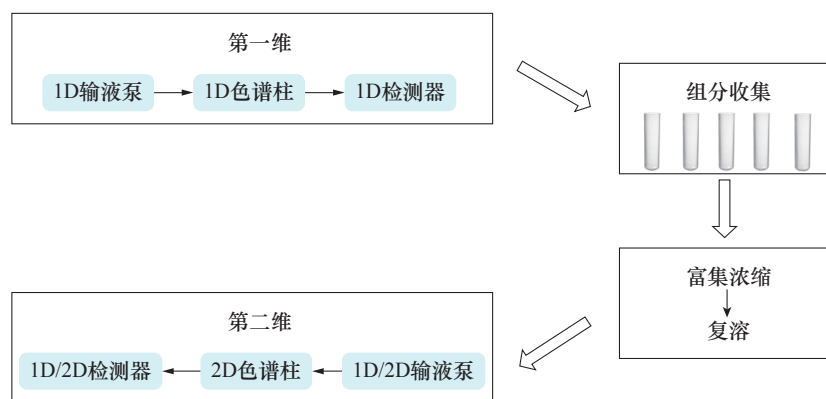


图3-10 经典离线二维液相色谱法的基本原理示意图

323个人参皂苷类植物代谢物，为植物代谢物暴露组的精确轮廓分析提供参考。

二、环境暴露组学的质谱分析方法

(一) 质谱分析基本原理

质谱 (mass spectrometry, MS) 是根据化合物的质荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) 进行鉴定的分析技术，包括离子源、质量分析器和检测器三部分。

样品分子首先在离子源被离子化成带电离子，然后被加速和聚焦进入质量分析器，在质量分析器中离子依据 m/z 大小不同而进行分离，先后到达检测器被检测，经电脑记录并转换成质谱图。

MS 在多种研究领域得到广泛应用，包括化学、生物学、医学、环境科学等，用于化合物定性、定量、结构解析、代谢组学、蛋白组学、药物研发以及其他研究领域。

(二) 离子化技术

离子化技术是质谱仪器的首要核心功能，因为化合物只有先被离子化后才能进入质量分析器，最后达到检测器被检测。小分子代谢物组学分析常用的离子化技术主要包括电子轰击 (electron impact, EI)、电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI)、基质辅助激光解吸离子化法 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)、大气压化学电离 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、大气压光致电离 (atmospheric pressure photoionization, APPI) 等。

1. 电子轰击 (Electron impact, EI)

如图3-11所示，EI是最经典的离子化技术，其原理是通过高能电子束轰击气态样品分子，引起样品分子中的电子溅射出来，形成带有正电荷的分子离子 (M^+) (或 M^{z+} , $z=1,2, \dots$)。当这些离子内能过高时，可以进一步碎裂形成碎片离子，从而可以提



供前体离子的结构信息。电离电压（能量）通常为70 eV。此外，具有一定热能量（0.1~0.01 eV）的轰击电子，由于在分子中电子亲和力作用下被捕获，形成富有电子的分子离子 $[M]^-$ ，但是由于灵敏度很低，一般不会应用于实际检测中。

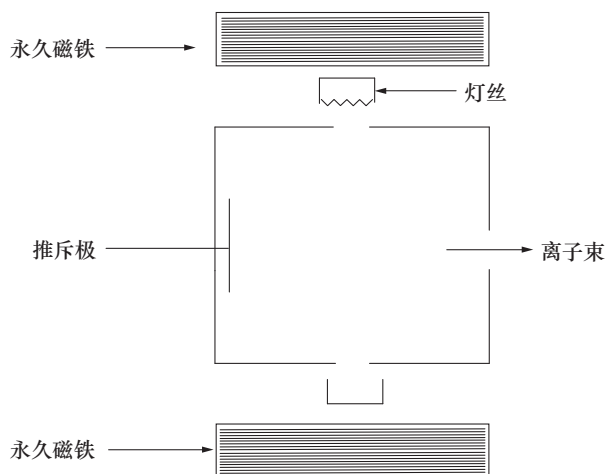


图3-11 EI离子源结构示意图

EI的优点是技术成熟、结构简单、峰重现性好、离子化效率高、碎片离子多。EI-MS技术适合分析易挥发、热稳定的化合物，常用于有机化学、分析化学、环境分析、法医学等领域。但不适合分析大分子、难挥发或热不稳定的分子，所分析的成分质量局限在小于1000道尔顿，因为这类成分在高能电子束的作用下可能会被分解和蒸发。EI-MS经常与气象色谱（Gas chromatography, GC）联用。

2. 电喷雾电离（Electrospray ionization, ESI）

ESI是一种“软”电离技术，电喷雾原理的最早发现可以追溯到1917年，而应用在质谱上是在1984年以后，20世纪80年代末开始逐渐被广泛重视。

首先，样品分子溶解于易挥发的溶剂中，被引入ESI离子源施加高压电的毛细管中，产生气溶胶喷雾，在同轴雾化气的共同作用下，形成带有密集电荷的雾状液滴，样品中的分子也被包裹在带电液滴中（图3-12）。向喷雾区引入逆向的氮气流可以加快雾状液滴的脱溶剂速度。由于带电液滴中溶剂的不断蒸发，液滴表面电荷的密度持续增加，产生库伦爆炸，带电液滴分解成更小的液滴，这一过程持续反复进行，直至形成气态单电荷或多电荷离子，并进入质量分析器被分离和检测。

当用正电场时，在ESI温和条件下样品分子通常带上质子、碱金属离子等生成正电荷的加合离子。当用负电场时，通过除去质子或其他阳离子而生成负离子。所带电荷的多少取决于分子中酸性或碱性基团的体积和数量。

ESI可以使大分子形成多电荷离子，减小了 m/z 数值，这有助于质谱检测到其精确质量数。由于质谱仪测量的是质量电荷比（ m/z ），其扫描范围只有几千质量数，利用ESI法却能够检测质量数达十万的生物大分子。质谱的质量分析器根据 m/z 数值来分离

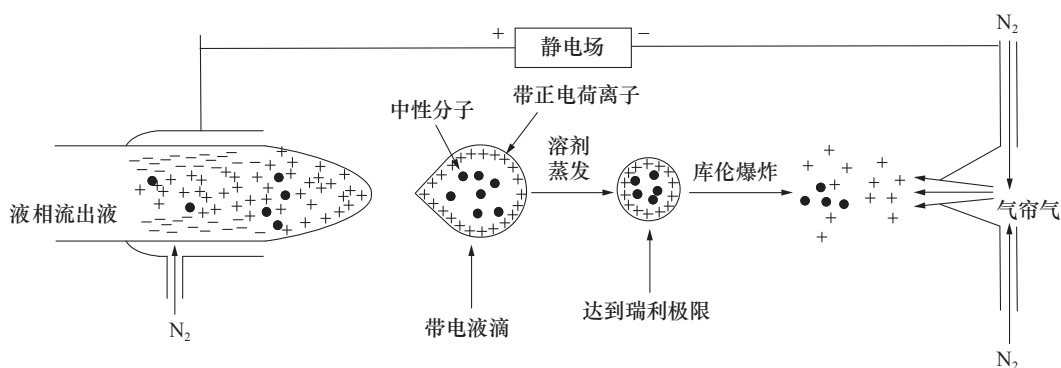


图3-12 ESI离子化机制示意图

不同离子，形成含有样品分子相对丰度和 m/z 信息的质谱图。

ESI在质谱分析中是较为常用的离子化技术，适合电离化合物的种类非常广泛，包括小分子有机化合物、多肽、蛋白质、核酸和碳水化合物，ESI尤为适合分析极性和热不稳定化合物。ESI经常与LC联用来分离鉴定复杂体系中的有机分子，广泛应用于蛋白组学、代谢组学、制药分析、环境分析等领域。

3. 基质辅助激光解吸离子化 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)

虽然，激光解吸 (laser desorption, LD) 质谱法 (1963年) 早已用于难挥发、热不稳定化合物的分析，但是，LD法直到采用基质辅助之后，才开始被广泛重视。MALDI质谱法是1987年以后被正式确立的一种新型软电离技术。

MALDI技术，需要基质化合物的参与，吸收激光能量并与目标分析物形成晶体结构。首先将样品溶解或悬浮于基质中，脉冲激光束照射到基质和样品上。基质吸收激光束能量后被气化并将样品分子解吸到气相中，在此过程中激光的大部分能量被基质所吸收，大量的基质使样品有效分散，减少被分析样品分子间相互作用，从而减少了样品分子被激光能量破坏及过度电离成碎片离子。

基质 (小分子有机物) 必须是强烈吸收入射激光辐射的分子，基质分子吸收辐射后，吸收的能量在基质中诱发冲击波，从而释放出完整大分子的气相分子离子。MALDI中离子的形成，通常被认为包括质子化、碱金属离子的加合和光离子化等。电离的分子离子被加速进入电场，依据质荷比在质量分析器分离，到达检测器被检测，最后输出包括离子丰度和质荷比信息的质谱图 (图3-13)。MALDI主要与飞行时间 (time of flight, TOF) 质谱仪联用，目前，MALDI-TOFMS已经被广泛地应用于蛋白组学、新药研发、临床诊断、多肽等大分子的分析。

MALDI尤其适合其他离子化技术难于电离的化合物，包括不挥发和热不稳定的成分。因此，它特别适合于生物样品的分析，避免了质谱分析前样品的复杂纯化过程。分析化合物的分子量可达数十万至百万质量数，并可分析混合物。MALDI法的另外一个特点是对样品的要求很低，可以允许样品中含有相对高浓度 (几百毫摩尔) 的缓冲剂、盐及变性剂等非挥发性成分。然而，含有破坏样品结晶过程的成分 (杂质) 则不

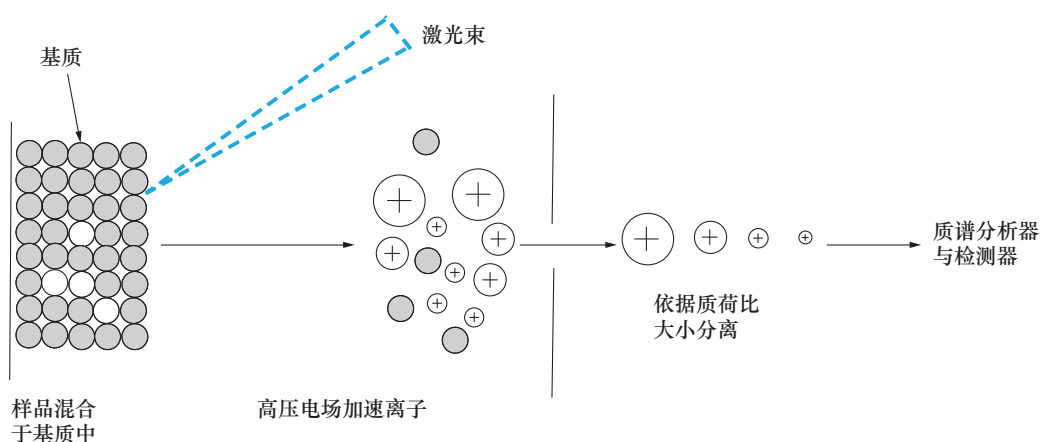


图3-13 MALDI-TOFMS工作示意图

利于样品的离子化。与ESI相比，MALDI只能产生单电荷离子，限制了其检测生物大分子的能力，如蛋白、核酸等。

4. 大气压化学电离 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

APCI的离子化过程是在气相中实现的，这与ESI液态中完成离子化过程相反。首先，样品以气态或气溶胶的状态与雾化气混合并被引入质谱离子源中。雾化气有助于样品形成微滴或薄雾，这些微滴被送入电晕放电针区域（图3-14）。电晕针放电产生高能等离子体，使气相中的分子或微滴表面分子发生电离。电离过程是质子转移反应，正离子模式下，产生质子化离子或者反应气加合阳离子；负离子模式，产生去质子化离子或反应气加合阴离子。质子转移反应可以直接由来自电晕针放电产生的电荷转移引起，或由分子离子反应引发。样品分子离子化后，被立刻送入质谱仪的质量分析器分析。通常与APCI联用的质量分析器包括四极杆、飞行时间和离子阱分析器。

APCI适合分析热稳定性好的样品，电离中等极性、弱极性、非极性化合物，并与

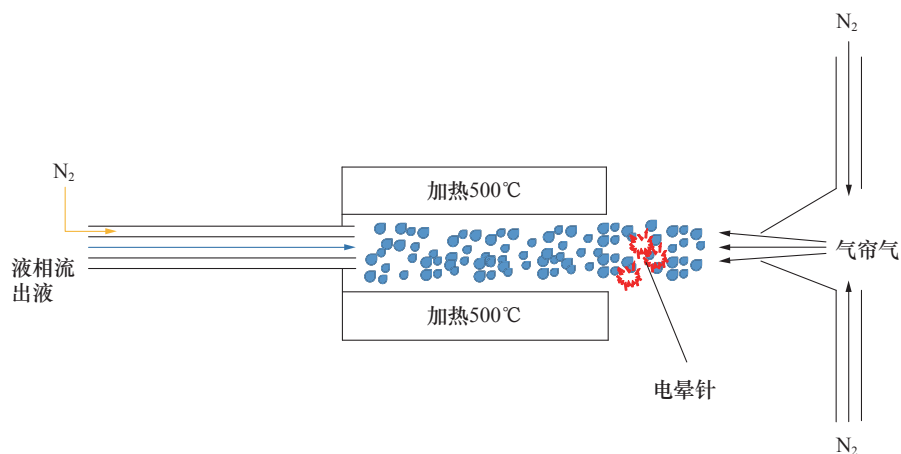


图3-14 APCI离子化示意图

不同溶剂和流动相具有广泛的兼容性。由于其在大气压条件下工作，免除了对真空电离环境的要求。APCI只产生带单电荷的产物，由于不能产生一系列的多电荷离子，因此不适合分析生物大分子。

5. 大气压光致电离 (atmospheric pressure photoionization)

大气压电离源的工作原理是利用电场和化学反应来产生离子。在电场的作用下，气体分子会发生电离，产生正离子和负离子。同时，化学反应也会产生离子。如图3-15所示，样品和流动相进入离子源时，首先在雾化气和高温作用下被气化，进而吸收紫外灯发射的光子后丢失电子并形成自由基离子 (M^+)。溶剂分子的电离能 (ionization energy, IE) 低于10.6 eV时也会被电离。当第一步的光致电离反应发生后，具有较高的质子亲和势 (proton affinities, PA) 的化合物比较容易与自身或溶剂分子反应生成质子化的分子离子 ($M+H$)⁺。

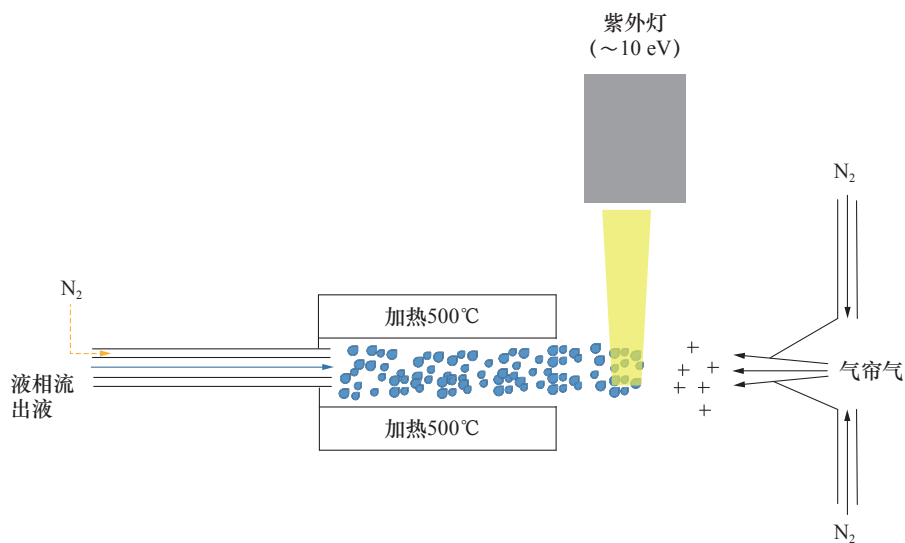


图3-15 APPI离子化示意图

大气压条件下，单凭光致电离的效率是远远不够的，因为光子比较容易被中性分子吸收，经过无辐射衰变过程而失去能量。为了增加离子化效率，经常往APPI离子源中引入掺杂剂 (dopant, D)，要求其IE小于10 eV，该掺杂剂可以高效地被光子电离。在光致电离过程中，掺杂剂形成的分子离子 (D^+ ; $D+h\nu \rightarrow D^++e^-$) 可以进一步与样品分子或离子源中的其他成分反应。当样品分子 (M) 的电离能低于掺杂剂的IE时，可能会发生电荷交换反应 ($D^++M \rightarrow M^++D$)。发生光致电离后， D^+ 可以被水或溶剂 (Solvent, S) 簇溶剂化 ($D^++nS \rightarrow [D^+S_n]$)，这一过程非常迅速，可以导致最初的溶剂簇分解，并形成带电溶剂簇和中性掺杂剂自由基 ($[D^+S_n] \rightarrow S_n+D$ 或 $[D^+S_n] \rightarrow [S_n+H]^++[D-H]$)。带电的溶剂簇可以与样品分子发生缔合反应 ($[S_n+H]^++M \rightarrow [M+S_{n-1}+H]^++S$ 或 $[S_n+H]^++M \rightarrow [M+S_n+H]^+$)。在进入质谱的

质量分析器入口时，上述缔合体经电场驱动的碰撞分解反应后，质子会留在具有高PA的化合物上形成分子离子 $(M+H)^+$ 、溶剂分子离子 $(S+H)^+$ 或掺杂剂分子离子 $(D+H)^+$ 。

APPI适合分析的化合物类型非常广泛，可以使极性和非极性小分子同时离子化，可以分析ESI难于电离的化合物。对于紫外波长有强烈吸收的化合物，APPI的离子化效率和灵敏度非常高，有利于检测复杂样品中低丰度和微量的成分。与ESI和APCI相比，APPI显著降低了基质效应和离子化的抑制，对于缓冲盐有更好的耐受特性。APPI不适合分析热不稳定和难以挥发的成分，不适合分析在紫外波长呈现较弱或无吸收的化合物。APPI引入的掺杂剂经常导致谱图更为复杂和较高的背景噪声。

APPI广泛用于制药、天然产物、人体中的有害物质、食品安全、环境污染、石油化工等领域的分析。

(三) 质量分析器

质量分析器是质谱仪的重要核心部分，其作用是依据 m/z 分离和分析离子。目前常用的主流质量分析器包括四极杆 (quadrupole, Q)、飞行时间 (time-of-flight mass analyzer, TOF)、傅里叶变换离子回旋共振 (fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR)。

1. 四极杆质量分析器 (Quadrupole, Q)

如图3-16所示，四极杆质量分析器是由四根平行的金属棒组成方形或矩形结构，相对的极杆被对角地连接起来，构成两组电极。在两电极间施加射频电场和直流电场。通过对直流电压和射频电压进行扫描，只有选定 m/z 的离子可以稳定地在四极场震荡并顺利通过到达检测器，其余 m/z 离子则被电极中和，而无法通过四极杆过滤器。因此，四极杆质量分析器的功能是起到质量过滤的作用。

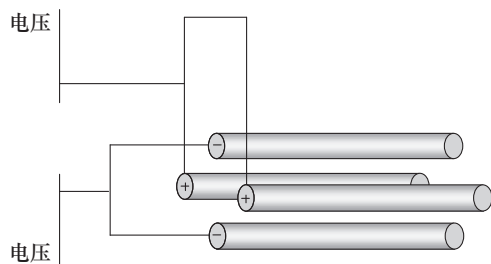


图3-16 四极杆质量分析器结构示意图

四极杆分析器可以和自身串联 (图3-17)，Q1和Q3是两组四极杆，q2是只带有射频电压的碰撞室，共同组成经典的三重四级杆质量分析器 (QqQ)。具有多重扫描功能 (图3-18)，包括子离子扫描 (product ion scan)、母离子扫描 (precursor ion scan)、中性丢失扫描 (neutral loss scan)、选择反应监测 (selected reaction monitoring, SRM)。

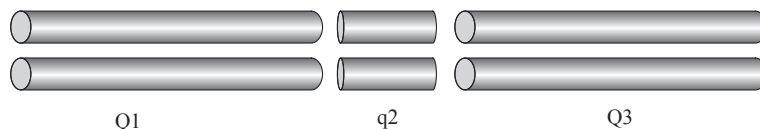


图3-17 串联四极杆结构示意图

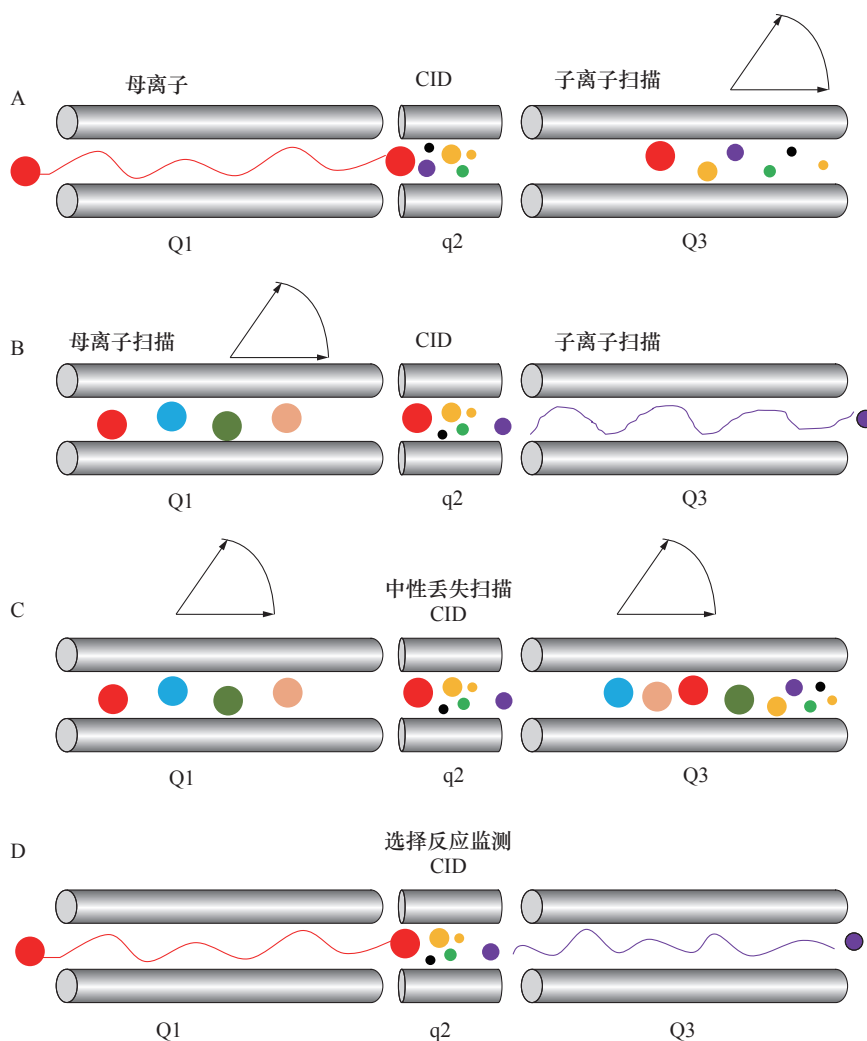


图 3-18 三重四极杆扫描示意图

子离子扫描原理是通过 Q1 选择特定的母离子，允许其进入 q2 碰撞室并与气体发生碰撞导致母离子碎裂，碎裂后的离子进入 Q3 被筛选分析。母离子扫描与子离子扫描顺序相反，先用 Q3 选择来自 q2 碎裂后特定的子离子，然后再用 Q1 扫描分析可能的母离子。该功能可用于筛查具有相同结构片段或官能团的化合物。中性丢失扫描的工作原理是同时设定 Q1 与 Q3 一个固定的扫描范围，要求 Q1 与 Q3 始终有一个恒定的 m/z 差。当扫描 Q1 与 Q3 满足这个质量差时，到检测器的离子信号会被检测到。该功能可从复杂基质中鉴定出具有部分相同结构的成分。比如带有葡萄糖苷结构的化合物，经过裂解会发生中性丢失质量数为 162（葡萄糖苷脱水）道尔顿的反应，因此可以借助中性丢失扫描来筛查并汇总带有葡萄糖苷片段的化合物。SRM 功能是设定 Q1 扫描固定的母离子，Q3 扫描特定的子离子。这一扫描模式可能同时监测多个母离子-子离子对，称作多反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）。MRM 具有很高的特异性和灵敏度，



被称作定量的金标准。

2. 飞行时间质量分析器 (time-of-flight mass analyzer, TOF)

高分辨质谱仪 (high-resolution mass spectrometry, HRMS) 在一次分析中可以精准定性、定量分析样品中成百上千个成分, 已成为现代研究领域不可或缺的分析工具。如图3-19所示, 飞行时间质谱原理是通过检测离子从进入离子源 (ion source) 开始到达检测器的时间和飞行距离, 来计算离子的 m/z 。在 TOF 分析器中, 离子被高压电场加速进入漂移区, 进而穿过没有电场的飞行管 (flight tube), 最终到达检测器 (detector)。

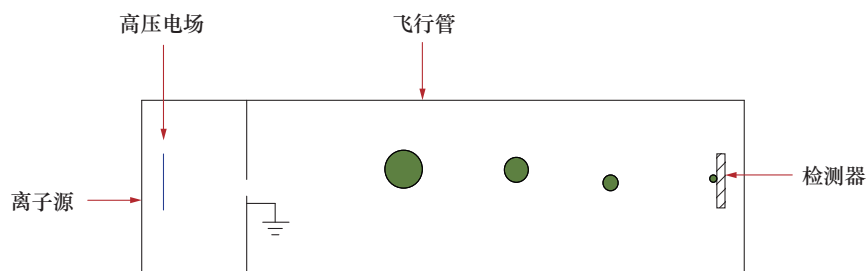


图3-19 TOF分析器工作示意图

与另外两种高分辨质量分析器 FT-ICR 和 Orbitrap 相比, TOF 扫描速度快 2~3 个数量级, 有更宽的质量范围, 结构简单, 造价低廉。其主要的不足之处是分辨率低于 FT-ICR 和 Orbitrap。

3. 傅里叶变换离子回旋共振质量分析器 (fourier transform ion cyclotron resonance mass analyzer, FT-ICR)

1974 年出现了第一台傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (FT-ICR), 其分辨率高于所有其他类型的质谱。对于质荷比小于 1000 道尔顿的分子, FT-ICR 检测的分辨率可以超过 10^7 。

其基本原理是依据离子在均匀磁场中的回旋频率来计算质荷比。如图3-20所示, FT-ICR 质量分析器置于超导磁场中。离子沿着平行于磁场方向进入处于高真空的立方空腔 (分析室), 分析室形状也有圆柱形的潘宁阱。与磁场方向相垂直的捕获电极 (Trap) 被施加一低直流电压, 形成一个静电场, 离子被拘禁在里面。离子由于受到磁场的作用, 在垂直于磁场的平面做回旋运动, 此回旋频率正比于离子的质荷比。在平行于磁场方向上的发射电极施加一个射频电场, 来诱发相干震荡。当离子回旋频率刚好与射频电压的频率相同时, 将共振吸收能量, 其回旋轨道半径与速度会逐渐增加, 频率保持不变。当一组离子发生同步回旋时, 在检测电极上会产生镜像电流。在 FT-ICR 立方体中, 两个检测电极通过电阻接地。在电阻两端形成随时间变化的交变电流, 其频率和离子回旋频率相同。将这一变化的时间和频率经傅里叶变化后, 就可以计算出离子的质荷比。

FT-ICR 具有超高分辨率的优势, 能够区分 m/z 数值极为接近的离子, 质量准确度

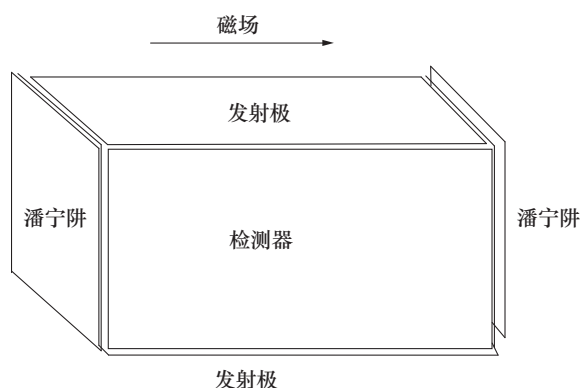


图 3-20 FT-ICR 质量分析器结构示意图

小于 1 ppm，被广泛用于蛋白组学、代谢组学、石油组学和其他领域的小分子研究。但是其价格昂贵，要求复杂的电场、高真空条件和精密的磁场环境，大大限制了其应用。

4. 静电场轨道阱质量分析器 (orbitrap mass analyzer)

Orbitrap 质量分析器由外筒状电极和中心纺锤状电极构成 (图 3-21)，离子被拘禁于内外电极中间的空间电场中，并沿着中心纺锤状电极轨道震荡。根据离子的振荡频率来计算其质荷比。

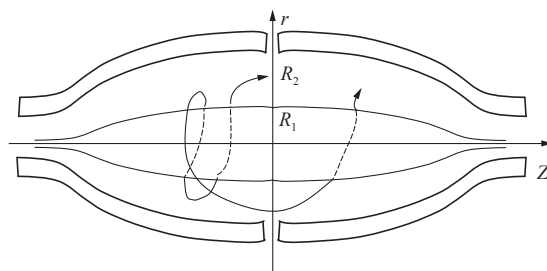


图 3-21 Orbitrap 质量分析器结构示意图

与 FT-ICR 相比，Orbitrap 工作时不需要液氮制冷的超导磁场条件和附加的激发组件，成本相对较低，维护简单，且同时具备超高的分辨率和质量准确度。Orbitrap 分辨率最高可达 10^6 ，其不足之处是当进入分析时的离子过多时会产生空间电荷效应，导致分辨率和质量准确度下降。

三、基于液相色谱的质谱分析方法在环境暴露组学中的应用

近年来，基于各种类型的超高效液相色谱质谱联用技术已经广泛应用于内外暴露组的轮廓分析。例如，Xie 等研究者使用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱从吸烟者和非吸烟者的尿液样本中检测到 116 个硫醇尿酸类代谢物，其中 46 个代谢物的含量在吸烟人群的尿液中显著上升，该研究为烟草烟雾中有毒物质的环境暴露标志物鉴定提供参考。Krausová 等研究者使用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱技术在婴儿粪便中检测到并半定量了 32 种霉菌毒素，该研究在婴儿霉菌毒素暴露下肠道菌群的发育和外源毒素的风险评估方面具有重要意义。

暴露组学分析样本覆盖水、空气、土壤、灰尘、植物、食品、人类样本等，其分析的目标成分包括全氟和多氟烷基物质，水中残留的药物，土壤中残留的杀虫剂和多环芳香族化合物，空气中挥发性和半挥发性有机物，灰尘中的阻燃剂，食品包装中的



塑化剂，人体内的塑化剂、杀虫剂和卤代化合物。暴露组学研究所采用的分析工具中，LC-HRMS使用的比例为51%，GC-HRMS占比为32%。由此可见，虽然LC-HRMS是暴露组学分析的主流技术，仍需要预先评估分析样本中目标成分的理化性质，以便采取更有针对性的分析方法。未来的液质联用技术仍应朝着多维度方向发展，结合多种互补的分析技术，进一步提高对痕量物质的分析灵敏度，同时实现内外暴露组的高精准结构鉴定以及高通量轮廓分析。

第三节 环境暴露组学的离子迁移谱分析方法

一、离子迁移谱的基本原理

离子迁移谱（ion mobility spectrometry, IMS）是依据气相离子在电场作用下的迁移率不同而进行分离和分析的技术，常用于分析化学成分、环境监测和安全筛查等⁵⁹。

离子迁移谱中，来自样品的离子被注入充满缓冲气体的漂移管中，沿着漂移管方向施加一个电场，推动离子向漂移管另一端的检测器移动。其迁移速率取决于离子的大小、形状、所带电荷以及与缓冲气体分子间的相互作用。

当离子穿过漂移管时，会与缓冲气体分子发生碰撞，导致动能损失和速率下降。不同离子速率下降的数值都是固定的且各不相同，因此可以根据这一特征即迁移率将它们彼此分离。

离子经过分离后先后达到检测器被检测和分析，通常用质谱（Mass Spectrometry, MS）作为检测器来定性、定量分析来自样品中的离子。运用离子迁移与质谱联用技术（IMS-MS），可以增强检测与鉴定各种化合物的特异性和灵敏度，包括化学品、爆炸物、药物与环境污染物。

二、离子迁移谱的基本分类

IMS基本可以分为5大类，包括漂移时间离子迁移谱（drift-time ion mobility spectrometry, DTIMS）、高场不对称波形离子迁移谱（high-field asymmetric ion mobility spectrometry, FAIMS）、吸入离子迁移谱（aspiration ion mobility spectrometry, AIMS）、行波离子迁移谱（travelling wave ion mobility spectrometry, TWIMS）、捕集离子淌度质谱（trapped ion mobility spectrometry, TIMS）。

（一）漂移时间离子迁移谱（drift-time ion mobility spectrometry, DTIMS）

DTIMS的研究与应用非常广泛，它是唯一可以直接根据离子迁移率提供碰撞截面积（collision cross sections, CCS）的离子迁移技术。图3-22A展示了一个简单的漂移

管装置，里面充满了缓冲气体，压力方向与电场相反。一系列电阻器与施加的直流电压在漂移管中形成弱电场，这里是一个负压环境（1~15 mBar），电压通常是2.5~20 V/cm。施加的电压需要随着漂移管的压力升高而增加，但是电压的提升不可导致缓冲气体的分散。通常缓冲气体为氦气、氮气、氩气或混合气体。

DTIMS工作时，离子并不是连续不断地被引入漂移管，而是由离子门间歇式地放入一定量的离子进去。这些定量离子注入漂移管的持续时间在100~200 μs。由于对注入离子量的限定，降低了分析方法的灵敏度，仅有0.1%~1%的离子能到达IMS。当离子被引入漂移管后，在穿过缓冲气体的过程中，迁移率不同的离子会被逐渐分开。例如，带有两个电荷的离子，受到电场的驱动力是单电荷离子的2倍，因此当离子的外形相同时，二价离子的迁移率要高于一价离子，会以更快的速度和更短的时间穿过漂移管。同样，大体积的离子会比小体积离子与缓冲气体分子发生更多的碰撞，需要用更长的时间通过漂移管。

离子穿过漂移管的时间一般是毫秒级，因此可以很快地分离不同离子。离子迁移公式表明，漂移管的长度可以影响离子在里面的穿过时间和迁移率。漂移分辨率（ $t/\Delta t$ ）公式表述如下： $t/\Delta t \approx (LEze/16k_B T \ln 2)^{1/2}$ ； t ，离子通过漂移管的时间； Δt ，相邻离子通过漂移管的时间差； L ，漂移管长度； E ，电场力； ze ，离子电荷数； k_B ，玻尔兹曼常数； T ，温度。增加漂移管的长度、电场力，或降低缓冲气体的温度可以增加漂移分辨率。通常漂移管的长度是1 m。有研究表明，将漂移管的长度增加到2 m，可以提升漂移管分辨率。具有低温环境的漂移管，与更高分辨率的IMS联用可以分离高度复杂的混合物或异构体。

（二）高场不对称波形离子迁移谱（high-field asymmetric ion mobility spectrometry, FAIMS）

在高电场作用下（ $>10^4$ V/cm），离子迁移速率并不遵循DTIMS的原理。此时，离

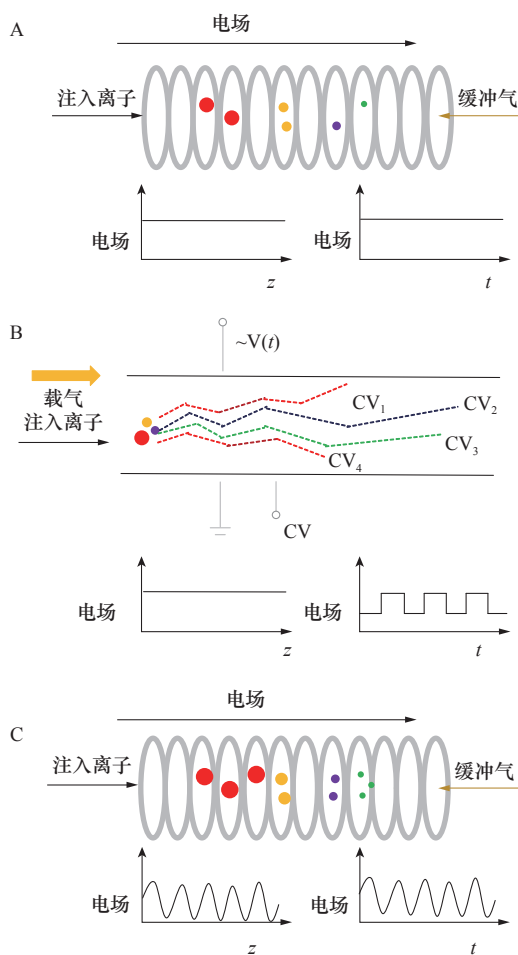


图 3-22 漂移管工作示意图

A. DTIMS 分离原理；
B. FAIMS 分离原理；
C. TWIMS 分离原理



子的迁移率由电场的强度决定，而这一电场强度在离子的整个运动过程中都是在变化的。如图3-22B所示，在距离只有约2 mm的两个平板中间施加一个不对称电场。当离子向其中任何一个平板运动时，受到不断变化的场强影响，而在两个平板间做有规律的震荡。例如，在一个平板上的电场强度可以是另一个平板的2倍。与DTIMS缓冲气体运动的方向相反，HFAIMS的缓冲气体的流动方向与平板平行，并与离子的运动方向一致，使得离子的行进路线垂直于电场方向。通过在平板上施加一个补偿电压，可以使离子在向电极方向运动的同时，不触碰到电极壁，特定的补偿电压，只允许特定的离子通过漂移管。因此，进行补偿电压扫描可以测到一系列不同迁移率的离子，这一原理类似于质谱的四极杆质量分析器。FAIMS允许离子束连续不断地被注入到漂移管，而DTIMS则是脉冲式地让一定量离子进入漂移管。

FAIMS的优势是具有高选择性，可以高效分离复杂的混合物，且样品损失少。与传统的单一质谱仪相比，FAIMS减低了化学基质干扰，并改善了检测限，已应用于各个领域，包括蛋白组学、代谢组学、环境分析和制药分析等。如图3-22C所示，施加的直流电压是脉冲式的，这样离子可以沿着电势墙前行。

（三）行波离子迁移谱（travelling wave ion mobility spectrometry, TWIMS）

TWIMS来自于沃特世公司商业化的离子淌度技术。如图3-22C所示，漂移管由一系列堆叠的环形离子导向器组成，在里面施加的射频电压穿过连续的电极用于阻止离子的径向扩散。直流电压叠加在射频场顶部以使离子沿着漂移管轴方向移动。具有最高迁移率的离子在行波中翻转的次数最少，并以更快的速度穿过环形离子导向器。可以通过改变波幅、速率与缓冲气压力来优化环形离子导向器中的离子传输。在特定的应用中，环形离子导向器可以作为传输和储存装置，或用作碰撞室。TWIMS可以提供离子的构象信息。

TWIMS的优势包括：它可以分离结构异构、构象异构与混合物；在质谱获得离子质荷比的同时，TWIMS可同时补充结构与形状信息。TWIMS的应用领域包括代谢组学、蛋白组学、脂质组学和小分子分析。

（四）吸入离子迁移谱（aspiration ion mobility spectrometry, AIMS）

如图3-23所示，空气持续吹入AIMS。分子离子化后，离子簇在电场作用下穿过离子迁移室（ion mobility cell, IMCell）。IMCell包括8对电极。电场驱动离子簇按照离子迁移率的大小顺序去先后撞击电极。具有高迁移率的离子与第一检测板发生碰撞。具有低迁移率的离子则以较慢的速度摆脱气流飞向检测板，因此这些离子将撞向第二、第三或更靠后的检测板。电场的正、负极会在一个周期内发生转换，从而使得正、负离子都可以被检测到。一系列离子簇通过与电极发生碰撞，并转换成电流（毫安）的形式，被8个正、负电极检测到。背景气流和离子前方气流的差值可以被监测到，正、负离子与总离子流也可以被检测到。AIMS可以提供半定量的结果，气流的振幅正比于

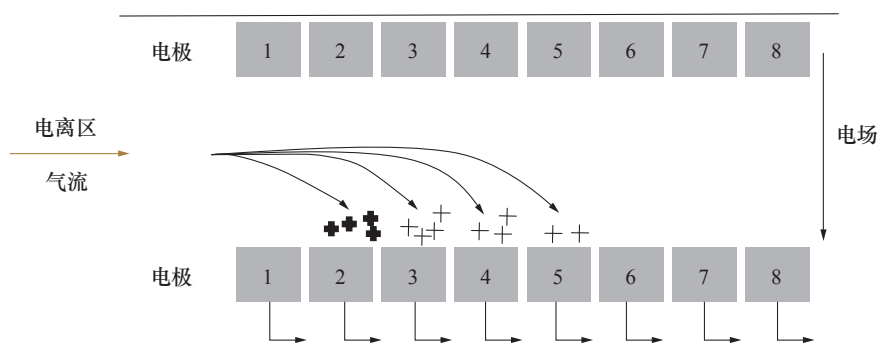


图3-23 AIMS工作示意图

离子的数量。

AIMS具有技术原理和结构简单、仪器体积小等特点。AIMS仅使用几个福特的直流电压来产生横向电场，以使离子发生偏转和分离。这些优点使得AIMS可以实现医疗保健中的快速检查。比如，AIMS可以提供化学指纹图谱，来实现不同菌株的快速筛查。

(五) 捕集离子淌度质谱 (trapped ion mobility spectrometry, TIMS)

如图3-24所示，TIMS由堆叠的环形电极组成，被称作分析器。每一个圆环被分成四个象限。在气流方向施加一个纵向直流电场横穿圆环，圆环的每一个象限给予一个射频电压。稳定的气流推动离子从离子源进入环形质量分析器，并被反向电势限定在圆环中。随着纵向直流电压的减弱，离子依据迁移率的不同先后离开圆环。TIMS的特点是，允许设定离子阱并根据迁移率数值选择离子或不加选择完全通过

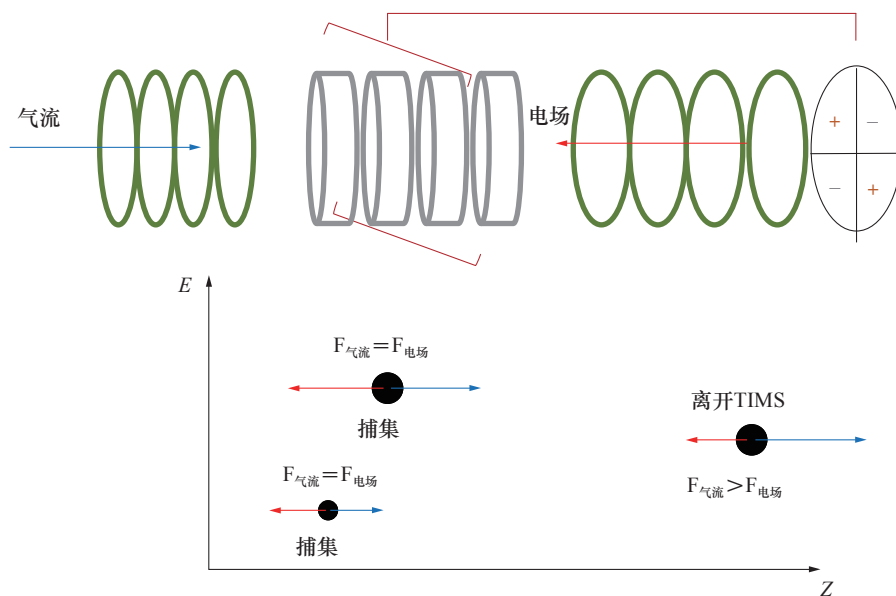


图3-24 TIMS工作示意图。气体驱动离子穿越离子淌度室途中，遇到逆向电场阻力。当气体驱动力与电场力阻力相等时，离子被拘禁于离子淌度室内；当气体驱动力大于电场力阻力时，离子离开TIMS。



模式。

三、离子迁移谱-质谱联用技术在暴露组学中的应用

离子迁移谱通常与质谱联用 (IMS-MS) 常用于分析小分子异构体。代谢组学分析目标包括外源性 (环境中) 和内源性小分子代谢物、代谢中间体和代谢产物。代谢组学可以研究进入体内的化工产品、食物、药物、护肤品等外源性成分, 称作暴露组学。来自环境中的成分非常复杂, 需要有能够在一次分析中从成千上万个分子中筛查与鉴定出目标成分的分析手段。LC-IMS-MS 联用技术具有速度快、多维度分析的优势, 是非靶向检测生物与环境样本中的小分子化合物的强有力工具。IMS-MS 和 LC-IMS-MS 与单一的 MS 或 LC-MS 方法相比, 可以额外提供反映分子结构信息的碰撞横截面积 (collision cross sections, CCS), 从而提升了非靶向代谢组检测的选择性与覆盖度。由于不同分子均有其特定的 CCS 值与 m/z , IMS 拥有强大的分析不同类型小分子化合物的功能。

人们越来越关注环境污染对人体健康的影响。研究已证实, 不完全燃烧的有机物产生的多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs)、多溴联苯醚 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 释放到环境中对人体健康有明确的危害作用, 因此对这类成分的快速定性、定量检测尤为重要。通常的分析手段是采用气质或液质联用技术, 这两个方法的缺点是比较耗时。与之相比, IMS-MS 可以从复杂的环境与生物样本中更为快速地检测到 PAH、PCB、PBDE 的前体与代谢产物及其同分异构体。

由于水循环过程中会带有不同来源的人造污染物, 包括药物、杀虫剂和护肤品等, 因此, 非靶向检测技术是分析废水中污染物成分的强有力工具。LC-IMS-MS 比 LC-MS 单独使用, 在定性方面具有更加快速和提供更多分析维度的优势。二维液相色谱 (two-dimensional LC, 2DLC) 与 IMS-MS 联用具有四维分离的功能, 进一步增加了峰容量。在一项城市污水成分的研究中, 应用 LC-IMS-MS 技术, 结合精确质量数和 CCS 值与数据库比对, 检测到 22 种污染成分。当采用 2DLC-IMS-MS 联用技术分析相同的废水样品, 则鉴定出 53 个污染成分。

IMS 技术显著提升了传统非靶向检测生物样本中外源性成分和环境污染物的定性能力。随着 CCS 数据库的不断扩大, IMS 的定性能力也会随之不断增强。

第四节 环境暴露组学的其他分析方法

现如今, 基于气液相的质谱技术和离子迁移谱技术已经为暴露组的定性和定量分析提供了解决方案, 且都具有高精度、高灵敏度和高通量的特点, 但多种分析技

术联用进行组学分析已成为当今的研究趋势。目前除以上主流的分析技术外，还有核磁共振波谱技术（nuclear magnetic resonance, NMR）、毛细管电泳技术（capillary electrophoresis, CE）和原子光谱技术（atomic spectroscopy, AS）等其他分析方法，这些方法能够在一定程度上与上述主流分析技术互补，从而为暴露组的系统研究提供更全面且深入的见解。本节将详细介绍以上三种分析技术的原理、特点以及在暴露组学研究中的应用。

一、核磁共振波谱技术

（一）基本原理

核磁共振现象是指具有核磁性质的原子核（或称为自旋核），在外加强磁场的作用下，吸收频率为兆赫（MHz）数量级的电磁辐射，引起核自旋能级的跃迁。其中能级跃迁所产生的吸收谱称为核磁共振谱。核磁共振波谱法的基本原理可以概括如下（图3-25）：

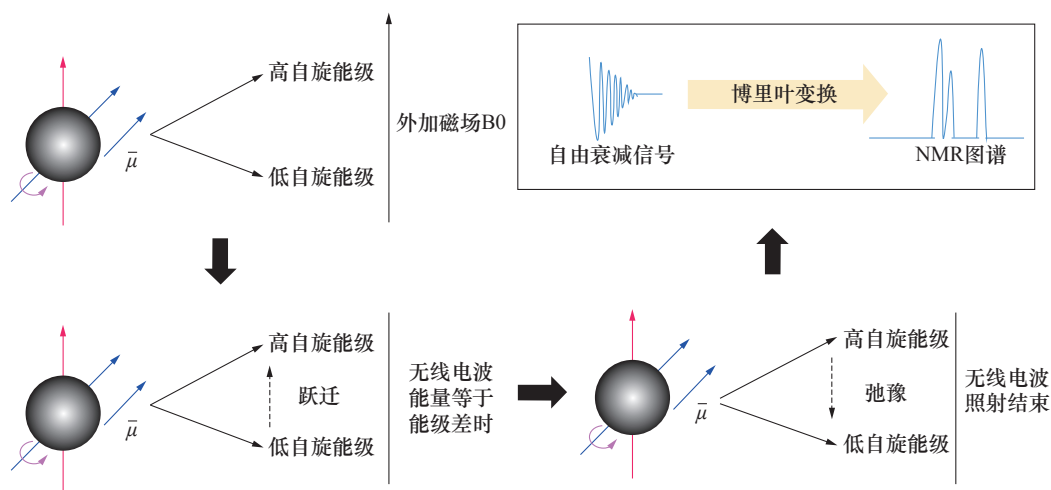


图3-25 核磁共振基本原理示意图

（1）原子核的自旋和磁矩：自旋量子数 I 不等于0的原子核，都有微观的自旋运动。由于原子核都带正电荷，这些电荷绕着自旋轴旋转时会产生电流，进而产生自旋磁场和自旋磁矩。

（2）原子核在外加磁场中的进动：当向原子核施加强外磁场时，核自旋磁场和外磁场会相互作用，使得原子核在自旋的基础上产生回旋，这种微观粒子的自旋和回旋运动称为进动（precession）。这种自旋运动下原子核的磁矩会有取向于外加磁场方向的趋势。



(3) 原子核自旋能级分裂：无外加磁场时，原子核的自旋方向是随机分布的。当施加外磁场时，其自旋方向会产生不同的取向，取向数目等于磁量子数 (magnetic quantum number)。不同的自旋取向所具有的能量不同，因此会形成自旋核磁能级分裂。

(4) 核磁共振的产生：如果使用无线电波来照射样品，当施加的无线电波能量等于某种化学环境下的原子核的两个相邻能级能量差时，原子核就会吸收该无线电波能量，由低自旋能级跃迁至高自旋能级，此过程即为核磁共振现象。

(5) 无线电波的释放和信号检测：当无线电波照射结束后，原子核自旋能级会逐渐由高能态恢复至低能态。在这个过程中原子核会释放出能量，检测器会接收到一个呈螺旋状递减的自由感应衰减信号 (free induction decay, FID)。此信号经过脉冲傅里叶变换 (pulse Fourier transform, PFT) 后，即可得到一张 NMR 谱图。

(6) NMR 谱图解析：从傅里叶变换后的谱图中，我们可以得到不同原子核的激发磁场强度、弛豫时间等参数。通常在核磁共振测定中我们会在样品中添加标准物质，如四甲基硅烷 (tetramethylsilane, TMS) 和 4,4-二甲基-4-硅代戊磺酸钠 (sodium 4,4-dimethyl-4-silapentanesulfonate, DSS) 等。样品中处于不同化学环境的原子核与标准物质原子核的共振频率之差即为化学位移 (chemical shift)。通过对共振信号谱图的解析，我们可以获得样品中不同核自旋的信息，如化学位移、偶合常数等，进而可以实现化合物的结构测定、生物活性的测定以及目标物质的精准定量分析等。

(二) 核磁共振波谱技术的特点和优势

目前使用核磁共振波谱仪研究的原子核有 ^1H 核、 ^{13}C 核、 ^{15}N 核、 ^{19}F 核和 ^{31}P 核等，其中研究最多的两种原子核分别为 ^1H 核和 ^{13}C 核，所获得的谱图分别为氢核磁共振谱 ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) 和碳-13核磁共振谱 ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum)。氢核磁共振谱的特点是可以获得样品中氢核的类型、氢核分布以及氢核间的相互关系等信息，而碳-13核磁共振谱的特点是可以获得样品中化合物的碳骨架信息，两者的结果相互补充，可以帮助我们快速地鉴定目标化合物的结构。

前述一维核磁共振波谱法 (one-dimensional NMR, 1D NMR) 虽然具有操作简单、测试时间短等优势，但是其图谱中不同化学环境原子核的共振谱线容易重叠，导致解谱难度增加。相比之下，二维核磁共振波谱法 (two-dimensional NMR, 2D NMR) 具有一定的解谱优势，其是在两个维度上采用不同的脉冲序列采集核磁共振图谱，图谱中一个坐标表示化学位移，另一个坐标表示偶合常数，或另一个坐标表示同核或异核化学位移。常见的二维核磁共振谱有 2D J 分解谱 (2D J-resolved spectroscopy)、二维相关谱 (correlation spectroscopy, COSY)、杂核单量子相关谱 (heteronuclear single quantum correlation spectroscopy, HSQC)、杂核多量子相关谱 (heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy, HMQC)、二维 NOE 效应谱 (2D nuclear overhauser effect spectroscopy, 2D NOESY) 和扩散序谱 (diffusion ordered spectroscopy, DOSY) 等，其中 2D J 分解谱可以同时获得一维氢谱中各峰的化学位移和偶合常数等信息；图 3-26 是经

典的 ^1H - ^1H 二维相关谱,我们可以根据谱图中的交叉峰获得结构中有偶合关系的H-H峰对信息;杂核单量子和多量子相关谱可以获得样品中C-H、N-H或其他异核峰对的相连关系,其中HSQC比HMQC在f1一维上具有相对更高的分辨率,但测试结果受仪器设置和实验条件的影响较大;二维NOE效应谱可以获得不同氢核在空间上的相对距离和位置信息,从而有助于进一步确定分子空间结构;扩散序谱技术是利用脉冲梯度场核磁共振对样品溶液中具有不同扩散系数(diffusion coefficients, D)的成分进行分离,可以用于研究液体的分子扩散行为。总的来说,二维核磁共振波谱法可以实现对一维的补充,特点是能够优化一维核磁共振谱图中共振峰的谱线干扰和重叠等问题,并可以通过相关峰分析提高复杂化合物结构注释的准确度和可信度。

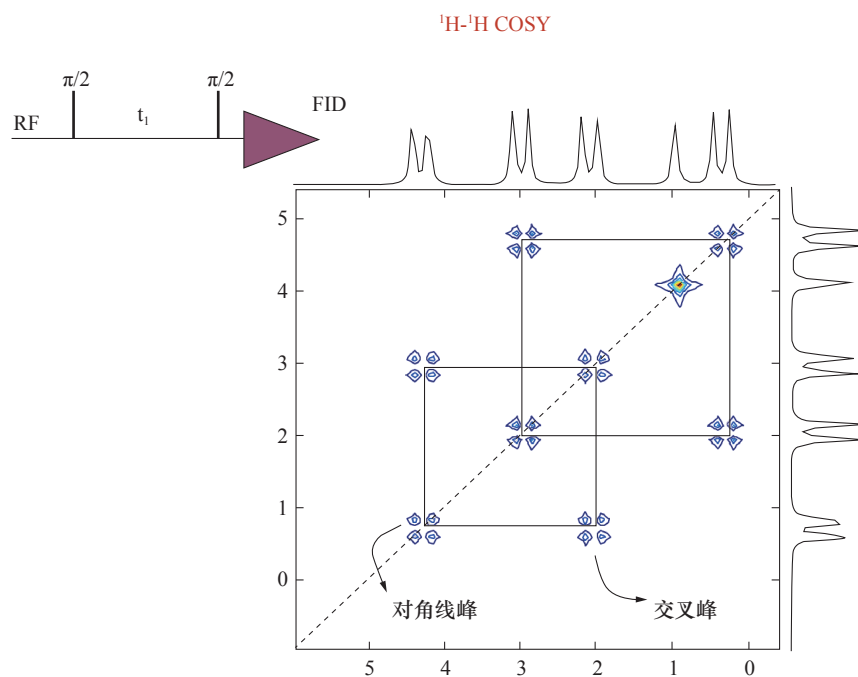


图3-26 ^1H - ^1H COSY二维核磁共振谱的基本原理示意图

核磁共振波谱法是环境暴露组学和代谢组学等其他组学分析最早使用的技术之一。相较于气液相质谱分析技术,核磁共振波谱法具有如下优势:样品前处理简单,且可以做到无创检测;测试重复性好,且检测成本较低;可以获得丰富的结构和动态信息,尤其是样品分子的氢核和碳骨架信息,且对复杂样品中所有化合物的检测灵敏度都一样。但是核磁共振波谱法在小分子化合物检测方面仍具有以下局限性:检测灵敏度相对较低,低丰度的物质可能难以检测到;测量的动态范围较窄;化合物的化学位移容易受样品溶液条件的影响;复杂生物样品的谱峰重叠较严重,虽然目前已经有研究人员开发出各种去卷积算法,但仍需进行系统的评价和验证;缺乏系统完整的物质鉴定数据库等。



(三) 核磁共振波谱技术在环境暴露组学的应用

核磁共振技术在系统生物学的研究中有广泛的应用，在环境暴露组学的研究方面也有更广阔的应用前景。在一定的暴露条件下，机体的体液、组织或其他生物标本中会出现特定的外源性代谢产物，它们可作为环境毒素或化学物质的暴露标志物。通过核磁共振技术对生物体内暴露标志物进行轮廓分析，我们能够确定体内所有的暴露因素，并从“自上而下”的角度揭示与人类疾病相关的未知暴露源，筛选出体内致病的有害外源因子，从而帮助评估环境暴露效果以及环境暴露下生物体生理状态的改变等。同时核磁共振技术也可以通过对空气和饮食等环境介质中的化合物进行定量和定性分析，从“自下而上”的角度研究这些环境因素与疾病和健康结局的相关性，确定与疾病相关的外源性暴露来源。例如，图3-27分别是有毒中药闹羊花暴露小鼠（图3-27A）和正常小鼠（图3-27B）的血清核磁共振氢谱图，其中不同的峰对应不同的代谢物，通过多变量统计分析能够得到该有毒中药暴露下小鼠血清成分的变化，从而可以筛选出潜在的内暴露标志物，为临床上有毒中药的毒性评估提供参考。

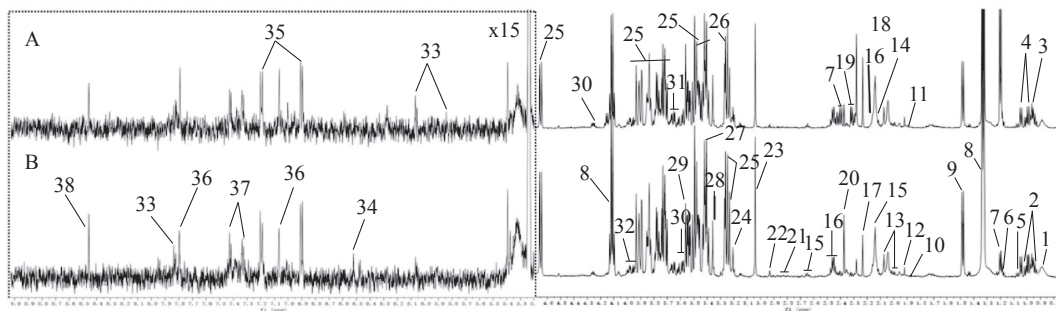


图3-27 有毒中药闹羊花处理的小鼠（A）和正常小鼠（B）血清的600 MHz核磁共振氢谱图

1. 2-羟基丁酸；2. 异亮氨酸；3. 亮氨酸；4. 缬氨酸；5. 异丁酸；6. 乙醇；7. 3-羟基丁酸；8. 乳酸；9. 丙氨酸；10. 精氨酸；11. 赖氨酸；12. 醋酸；13. 脯氨酸；14. 谷氨酸；15. 甲硫氨酸；16. 谷氨酰胺；17. 丙酮；18. 乙酰乙酸；19. 尿囊素；20. 丙酮酸；21. 天冬氨酸；22. 二甲基甘氨酸；23. 肌酸酐；24. 胆碱；25. 葡萄糖；26. 甜菜碱；27. 牛磺酸；28. 甲醇；29. 甘氨酸；30. 苏氨酸；31. 甘油；32. 丝氨酸；33. 胞苷；34. 富马酸；35. 酪氨酸；36. 组氨酸；37. 苯丙氨酸；38. 甲酸盐

除此之外，Maitre和Lea等研究者使用¹H-NMR对孕妇的尿液进行暴露组轮廓分析，发现在外源性砷暴露与孕妇体内的氧化三甲胺、二甲胺和肠道菌群的甲胺代谢紊乱有关；烟草烟雾暴露与体内的咖啡代谢相关，该研究将对进一步了解母胎健康和婴儿生命发育早期的健康提供参考意义。Denis A Sarigiannis等研究采用液相色谱-高分辨率质谱和核磁共振相结合的高通量非靶向分析方法，对暴露于重金属和邻苯二甲酸盐的孕妇尿液样本进行分析，结果发现外源性暴露导致的代谢紊乱大多与三羧酸循环和氧化磷酸化有关，这表明线粒体呼吸可能受到破坏。活性氧（reactive oxygen species, ROS）的过量产生，妊娠期间谷胱甘肽过氧化物酶3（glutathione peroxidase 3, GPx3）

和脐带中谷胱甘肽过氧化物酶1 (glutathione peroxidase 1, GPx1) 的存在与婴儿的语言发育问题相关。

二、毛细管电泳技术

(一) 基本原理

毛细管电泳是一种以内径为10~200 μm 的毛细管柱为分离通道、以高压直流电为驱动力对样品分子进行分离和检测的高效分离技术。和传统的平板凝胶电泳相比,毛细管的散热效率极高,因此可以在0~30 kV的高电压下快速完成样品中不同组分离子的分离。毛细管电泳的基本原理可以概括如下(图3-28):

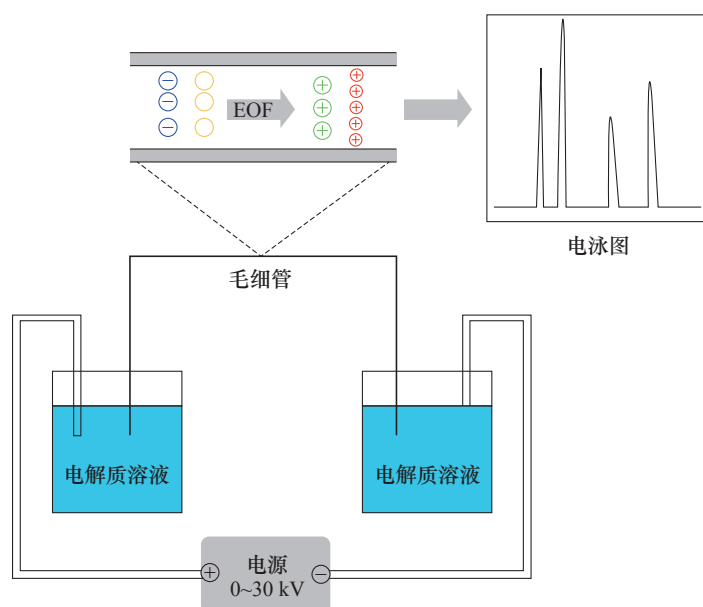


图3-28 毛细管电泳基本原理

(1) 电泳现象: 在电解质溶液中, 处于电场中的带电离子在电场作用下, 向所带电荷相反的电极迁移的现象称为电泳。带电离子的迁移速率取决于离子的尺寸、所带的电荷数以及电解质的性质(如pH, 黏度等)。

(2) 电渗现象: 当毛细管与电解质溶液接触时, 石英毛细管内壁的硅羟基(Si-OH)会解离成硅氧基阴离子(Si-O^-), 同时会吸附电解质溶液中的阳离子(以水合离子的形式存在), 最终在靠近毛细管内壁位置形成双电层。在电场力的驱动下, 双电层中的水合阳离子也会朝所带电荷相反的电极, 即阴极迁移。由于这些阳离子是溶剂化的, 因此毛细管中的电解质溶液会整体朝向阴极移动, 这种现象称为电渗, 电渗现象中流动着的液体称为电渗流。电渗流的迁移速率与双电层的电位、电解质的性质(如



离子强度, pH, 黏度等) 有关。

(3) 带电质点的整体迁移: 在毛细管两端施加电压的情况下, 电泳和电渗流现象共存, 此时带电离子在毛细管中的迁移速率由电泳和电渗流的速率共同决定。样品离子经正极端上样口进入毛细管, 阳离子由于其电泳方向和电渗流方向一致, 因此迁移速率最高; 阴离子的电泳方向和电渗流方向相反, 因此迁移速率最低; 中性粒子无电泳现象, 因此其迁移速率和电渗速率一致。

(4) 检测器接收信号: 样品中不同组分离子的迁移速率不同, 到达检测器的时间也不同, 故可以实现对不同离子的分离、定性及定量分析。

(二) 毛细管电泳的分离模式和特点

与基于色谱保留行为的高效液相色谱法不同, 毛细管电泳是基于电场作用下带电离子的形态尺寸和带电荷数等差异, 导致迁移速率不同而进行分离的, 因此对于极性或本身带电的代谢物(如胆碱等)具有优越的分析能力。由于毛细管电泳技术所使用的毛细管多为空心石英管, 且内壁未装填固定相填料, 因此流体扩散过程中的涡流扩散、传质阻力和二次平衡等因素可以忽略, 从而其分离度和柱效要远高于基于色谱保留行为的高效液相色谱法。施加的高电压使得毛细管电泳的分离效率更高, 分析速度更快。除此之外, 毛细管电泳的溶剂消耗少, 测试成本低, 且进样量在 nL 级别, 而高效液相色谱法的进样量在 μL 级别, 这使得毛细管电泳技术在高通量组学方法开发方面具有广阔的应用前景。

毛细管电泳技术的分离模式较多, 且可以在一台仪器上选择不同的分离模式进行操作, 其中主要包括毛细管区带电泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)、毛细管凝胶电泳 (capillary gel electrophoresis, CGE)、胶束电动毛细管色谱法 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 和毛细管电色谱法 (capillary electrochromatography, CEC) 等。毛细管区带电泳是毛细管电泳技术中操作最简单快捷、使用最广泛的一种分离模式。该模式依赖不同组分的电荷与尺寸的比值不同进行分离, 可以同时检测样品中的阴阳离子和中性粒子。毛细管凝胶电泳是将经典的毛细管区带电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 相结合, 主要用于分离蛋白质等大分子。此方法把背景电解质溶液更换为聚丙烯酰胺凝胶, 同时蛋白样品用 SDS 处理, 最终可以仅根据分子量大小完成对不同蛋白的分离和纯化。胶束电动毛细管色谱法同时利用了经典毛细管电泳和高效液相色谱的分离原理, 在背景电解质溶液中添加胶束溶液和离子型表面活性剂, 随后在待分离粒子周围形成胶团, 胶团充当准固定相 (pseudostationary phase, PSP), 而电渗流充当流动相, 并完成对不同粒子(包括中性粒子)的分离。毛细管电色谱法是将 HPLC 的固定相填充到毛细管中或在毛细管内壁涂布固定相, 以电渗流为流动相驱动力的色谱过程。此分离模式结合了电泳的分离效率和液相色谱的分离选择性, 因此分离范围较广, 分辨率也较高。

毛细管电泳的使用比较灵活，可以串联多种不同类型的检测器，其中典型的有紫外检测器（ultraviolet, UV）、激发诱导荧光检测器（laser-induced fluorescence, LIF）、质谱检测器（mass spectrometry, MS）和核磁共振检测器（nuclear magnetic resonance, NMR）等。其中紫外检测器使用得最多，但由于流体通过毛细管的光径较短导致对紫外吸收偏弱的物质灵敏度较低；激光诱导荧光检测器对基于毛细管电泳的大分子互作研究具有优越的灵敏度，如免疫反应和适配体亲和分析，但前提是互作体系的一方必须带有荧光标记；不同类型的质谱检测器检测具有更高的灵敏度、选择性和专一性，且能够提供丰富的结构信息以帮助样品的定性分析；核磁共振检测器可以辅助质谱检测器进一步阐释化合物的精确结构。毛细管电泳串联质谱法（capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS）具有相对较高的分辨率和选择性，目前已逐渐发展成一种常规的组学分析技术。毛细管电泳可以串联不同类型的质谱检测器，需要结合样品性质和实验目的选择最适的检测器类型，以达到最佳的检测灵敏度和选择性。尽管和GC-MS和LC-MS相比，CE-MS在检测灵敏度、重现性和稳健性方面有一定的局限性，但是在分析带电或强极性化合物及其同分异构体方面仍具有优势。

（三）毛细管电泳技术在环境暴露组学的应用

近年来毛细管电泳技术，尤其是毛细管电泳串联质谱法在系统生物学（环境暴露组学、代谢组学等）、环境检测和药物研发中有着越来越广泛的应用。Biban Gill等研究者开发了一种新型的多段进样毛细管电泳法（Multisegment injection-capillary electrophoresis, MSI-CE），同时与三重四极杆质谱仪进行串联使用，能够实时监测人体尿液中的烟雾暴露标志物羟基芘（hydroxypyrene, HP），且具有前处理简单、分析效率高、分析时间短等优势，同时重现性和回收率均符合要求。该方法为临床上大规模监测空气污染物的暴露标志物提供了新的思路。除此之外，Lue Sun等研究者使用毛细管电泳串联飞行时间质谱仪的方法对X-射线暴露下的小鼠血细胞进行轮廓分析，最终筛选出2-氨基丁酸、2'-脱氧胞苷和胆碱作为电离辐射的潜在标志物，并且建立的预测模型对这种电离辐射具有良好的预测性能；Javier Domínguez-Álvarez使用毛细管电泳串联质谱法的方法靶向检测饮用水中的四种有毒砷类化合物：二甲基砷酸盐，一甲基砷酸盐，亚砷酸盐和砷酸盐，并达到了0.02~0.04 μg (As)/L的检测限。该工作证实了毛细管电泳串联质谱法可以作为一种高灵敏度的替代分析方法应用于环境饮用水的检测。

三、原子光谱技术

（一）基本原理及特点

原子光谱技术是由一种以原子为研究对象的分析方法，其根据分析原理不同可以分为原子吸收光谱法（atomic absorption spectrometry, AAS）和原子发射光谱法（atomic





emission spectrometry, AES)。原子光谱法的基本原理和分析流程可以概括如下:

1. 原子能级分布: 原子由原子核和核外电子组成, 其中每一个核外电子都排布在核外电子轨道中, 且不同的电子轨道具有不同的能量。正常情况下电子以能级最低的基态形式存在。

2. 原子化: 将待测样品溶解后, 通过原子化器将样品由液态转移至气态, 随后将其转化为基态原子。常见的原子化方法有火焰法和管式石墨炉法等。

3. 激发: 当原子吸收共振辐射后, 核外电子会从基态跃迁至更高的能级上, 此时原子的状态称为激发态。在原子光谱中提供共振辐射的元件称为光源。原子吸收光谱常见的光源为空心阴极灯 (hollow cathode lamp, HCL), 其中包含待测元素的阴极材料、能够辐射出其特征吸收波长的光线。原子发射光谱常用的光源有直流电弧、交流电弧、高压电火花、电感耦合等离子体 (inductively coupled plasma, ICP) 和激光光源等。

4. 吸收或发射: 从光源处发出的光线通过样品池时, 样品中的待测金属原子会吸收特定波长的光线, 形成的含有暗带的光谱称为原子吸收光谱; 由于处于激发态的原子极不稳定, 会迅速跃迁至低能级或基态。在此过程中会释放出能量并以一定波长的电磁波的形式辐射出去, 所形成的光谱称为原子发射光谱。

5. 检测信号: 计算机控制光电倍增管或光电二极管等检测器来检测不同波长的光被吸收或发射的辐射强度变化, 并形成原子吸收或发射光谱图。

原子光谱中共振辐射吸收或发射强度与样品中该金属元素的浓度成正比, 因此可以通过比较样品溶液的吸收或发射光谱与标准溶液的强度差异来测量样品中目标金属元素的浓度, 常用的方法包括标准曲线法和标准添加法等。

原子光谱法可以测定 70 多种金属元素和部分非金属元素, 具有灵敏度高、精准度高、测试耗时短等优点, 但在同时测定多个金属元素时灵敏度会降低。电感耦合等离子体原子发射光谱法 (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES) 可同时分析多个金属元素, 且拥有相对更高的分析效率和准确度。

(二) 原子光谱技术在环境暴露组学的应用

原子吸收光谱在环境暴露组学中有广泛的应用, 可用于评估重金属 (如汞、铅等) 等其他环境污染物暴露下对人类健康的潜在风险。Marta Szukalska 等研究者使用电感耦合等离子体原子发射光谱法和原子吸收光谱法测试了人乳脂中的有毒重金属含量, 发现长期吸入香烟或二手烟会提高产妇产乳中重金属的水平, 而且母乳中的烟草暴露标志物可铁宁水平和镉镉等金属元素浓度具有显著相关性, 从而会对婴儿的生长发育造成不利的影 响。Leslie A. Hoo Fung 等研究者使用原子吸收光谱法和电感耦合等离子体原子发射光谱法对引入北美地区的新物种狮子鱼的肉质进行了分析, 从微量元素的角 度系统评估了该新物种饮食暴露下的营养安全性。总体而言, 原子光谱法可以对金属元素和部分金属元素进行准确定量, 但在环境暴露组学研究中, 通常需要结合其他技术和方法进行系统的分析以获得更准确和全面的结果。

本节总结了用于环境暴露组学分析的核磁共振波谱技术,毛细管电泳技术和原子光谱技术原理、特点以及具体应用。除此之外还有分子光谱法(如紫外可见分光光度法、分子荧光和磷光分析法、红外光谱法和化学发光法等)和电化学法(如伏安法和电位分析法)等,这些分析技术在环境暴露组分析方面也具有一定的应用价值。以上各种分析技术都有各自的特点,我们须根据实际情况选用合适的方法,以达到最终的检测目的。总体来说,无论是采用“自下而上”还是“自上而下”的研究策略,环境暴露组分析方法应该在各种主流检测技术的基础上,不断尝试结合多种互补分析手段来改善分析效率和通量,提高对内外暴露组标志物检测的灵敏度和准确度,为实现系统深入的内外暴露评估提供技术可行性,并最终推动环境暴露组学发展迈入新阶段。

参 考 文 献

- [1] Mametov R, Ratiu I A, Monedeiro F, et al. Evolution and Evaluation of GC Columns [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2021, 51: 150-173.
- [2] James A T, Martin A J P. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid [J]. *Biochem J*, 1952, 50 (5): 679-690.
- [3] Desty D H, Haresnape J N, Whyman B H F. CONSTRUCTION OF LONG LENGTHS OF COILED GLASS CAPILLARY [J]. *Analytical Chemistry*, 1960, 32: 302-304.
- [4] Dandeneau R D, Zerenner E H. An investigation of glasses for capillary chromatography [J]. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1979, 2: 351-356.
- [5] Rahman M M, Abd El-Aty A M, Choi J-H, et al. Basic Overview on Gas Chromatography Columns [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [6] Ettre L S. Development of gas-chromatography [J]. *Journal of Chromatography*, 1975, 112: 1-26.
- [7] Budiman H, Nuryatini, Zuas O. Comparison between GC-TCD and GC-FID for the determination of propane in gas mixture [J]. *Procedia Chemistry*, 2015, 16: 465-472 .
- [8] Sevcik, Jiri. Detectors in gas chromatography.
- [9] Yin M K, Lim J S, Moon D M, et al. Analysis of trace impurities in neon by a customized gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1463: 144-152.
- [10] Frink L A, Armstrong D W. The utilisation of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2016, 205: 23-27.
- [11] Lenz C, Neubert H, Ziesche S, et al. Development and Characterization of a Miniaturized Flame Ionization Detector in Ceramic Multilayer Technology for Field Applications [J]. *Procedia Engineering*, 2016, 168: 1378-1381.
- [12] Bai J, Baker S M, Goodrich-Schneider R M, et al. Aroma Profile Characterization of Mahi-Mahi and Tuna for Determining Spoilage Using Purge and Trap Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. *J Food Sci*, 2019, 84 (3): 481-489.
- [13] Ponphaiboon J, Limmatvapirat S, Chaidedgumjorn A, et al. Optimization and comparison of GC-FID and HPLC-ELSD methods for determination of lauric acid, mono-, di-, and trilaurins in modified coconut oil [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1099: 110-116.
- [14] Buse J, Robinson J L, Shyne R, et al. Rising above helium: A hydrogen carrier gas chromatography





- flame ionization detection (GC-FID) method for the simultaneous quantification of toxic alcohols and ethylene glycol in human plasma specimens [J]. *Clin Biochem*, 2019, 73: 98-104.
- [15] Bornhop D J. Microvolume index of refraction determinations by interferometric backscatter [J]. *Appl Opt*, 1995, 34 (8): 3234-3239.
- [16] Lovelock J E, Lipsky S R. ELECTRON AFFINITY SPECTROSCOPY-A NEW METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL GROUPS IN CHEMICAL COMPOUNDS SEPARATED BY GAS CHROMATOGRAPHY [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82: 431-433.
- [17] Schedl A, Zweclunair T, Kikul F, et al. Pushing the limits: Quantification of chromophores in real-world paper samples by GC-ECD and EI-GC-MS [J]. *Talanta*, 2018, 179: 693-699.
- [18] Scott R P W. *Chromatographic Detectors*. (1996).
- [19] Dressler M. *Selective gas chromatographic detectors*. Elsevier, (1986).
- [20] Sparkman O D. *Mass Spectrometry Desk Reference* [M]. Global View Publishing: Pittsburgh, PA, 2000: 106.
- [21] 熊喜悦, 盛小奇, 王华, 等. 代谢组学气相色谱-质谱分析方法中样品衍生化技术的新进展 [J]. *化学通报*, 2015, 82 (7): 602-607.
- [22] Greenburg L. Studies on the Industrial Dust Problem: II. A Review of the Methods Used for Sampling Aerial Dust [J]. *Public Health Reports (1896-1970)*, 1925, 40: 765-786.
- [23] Zhao Y, Hennigan C J, May A A, et al. Intermediate-volatility organic compounds: a large source of secondary organic aerosol [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48 (23): 13743-13750.
- [24] Benfenati E, Tremolada P, Chiappetta L, et al. Simultaneous analysis of 50 pesticides in water samples by solid phase extraction and GC-MS. *Chemosphere*, 1990, 21 (12): 1411-1421.
- [25] Mikolajczyk S, Warenik-Bany M, Maszewski S, et al. Dioxins and PCBs-Environment impact on freshwater fish contamination and risk to consumers [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 263 (Part B): 114611.
- [26] Lara-Guzmán O J, Álvarez-Quintero R, Osorio E, et al. GC/MS method to quantify bioavailable phenolic compounds and antioxidant capacity determination of plasma after acute coffee consumption in human volunteers [J]. *Food Research International*, 2016, 89 (Part 1): 219-226.
- [27] Fang L, Qiu F M, Li Y, et al. Determination of carbazole and halogenated carbazoles in human serum samples using GC-MS/MS [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 184: 109609.
- [28] Hu X, Walker D L, Liang Y L, et al. A scalable workflow to characterize the human exposome. *Nat Commun*, 2021, 12, 5575.
- [29] Sarkanj B, Ezekiel C N, Turner P C, et al. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1019: 84-92.
- [30] Zhang M Z, Yu Q, Guo J Q, et al. Review of Thin-Layer Chromatography Tandem with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Analytes in Mixture Samples [J]. *Biosens-Basel*, 2022: 12: 13 .
- [31] Van Berkel G J, Tomkins B A, Kertesz V. Thin-layer chromatography/desorption electrospray ionization mass spectrometry: Investigation of goldenseal alkaloids [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 2778-2789.
- [32] Zuvela P, Skoczylas M, Liu J J, et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography [J]. *Chem Rev*, 2019, 119 (6): 3674-3729. .
- [33] Grun C H, Besseau S. Normal-phase liquid chromatography-atmospheric-pressure photoionization-mass spectrometry analysis of cholesterol and phytosterol oxidation products [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1439: 74-81.

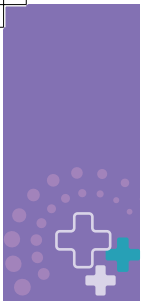
- [34] Jandera P, Janas P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 967: 12-32.
- [35] Marrubini G, Appelblad P, Maietta M, et al. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review [J]. *Food Chem*, 2018, 257: 53-66.
- [36] Saurat D, Raffy G, Bonvallot N, et al. Determination of glyphosate and AMPA in indoor settled dust by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry and implications for human exposure [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 446: 130654.
- [37] Flasch M, Fitz V, Rampler E, et al. Integrated exposomics/metabolomics for rapid exposure and effect analyses [J]. *JACS Au*, 2022, 2: 2548-2560.
- [38] Ngere J B, Ebrahimi K H, Williams R, et al. Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research [J]. *Anal Chem*, 2023, 95: 152-166.
- [39] Fekete S, Beck A, Veuthey J L, et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 113: 43-55.
- [40] Zhou J, Chen X H, Pan S D, et al. Contamination status of bisphenol A and its analogues (bisphenol S, F and B) in foodstuffs and the implications for dietary exposure on adult residents in Zhejiang Province [J]. *Food Chem*, 2019, 294: 160-170.
- [41] Michalski R, Pecyna-Utylska P, Kernert J. Ion Chromatography and Related Techniques in Carboxylic Acids Analysis [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2021, 51: 549-564.
- [42] Zhang J H, Xie S M, Yuan L M. Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45: 51-77.
- [43] Stalcup A M. Chiral Separations. In: *Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 3* (eds Yeung ES, Zare RN). Annual Reviews (2010).
- [44] Arora S, Saxena V, Ayyar B V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification [J]. *Methods*, 2017, 116: 84-94.
- [45] Chen M J, Guan Y S, Huang R, et al. Associations between the Maternal Exposome and Metabolome during Pregnancy [J]. *Environ Health Perspect*, 2022, 130 (3): 12.
- [46] Gilar M, Olivova P, Daly A E, et al. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 6426-6434.
- [47] Zuo T T, Zhang C X, Li W W, et al. Offline two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry enabling four-dimensional separation and characterization of the multicomponents from white ginseng and red ginseng [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10 (6): 597-609.
- [48] Covey T R, Thomson B A, Schneider B B. Atmospheric pressure ion sources [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28: 870-897.
- [49] Singhal N, Kumar M, Kanaujia P K, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 791.
- [50] Hanold K A, Fischer S M, Cormia P H, et al. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS [J]. *Analytical chemistry*, 2004, 76: 2842-2851.
- [51] Raffaelli A, Saba A. Ion scanning or ion trapping: Why not both? [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42: 1152-1173.
- [52] Lai Y H, Wang Y S. Advances in high-resolution mass spectrometry techniques for analysis of high mass-to-charge ions [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42 (6): 2426-2445.
- [53] Marshall A G, Hendrickson C L, Jackson G S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass



- spectrometry: a primer [J]. *Mass Spectrom Rev*, 1998, 17 (1): 1-35.
- [54] Deschamps E, Calabrese V, Schmitz I, et al. Advances in Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry for Pharmaceutical Analysis [J]. *Molecules*, 2023, 28 (5): 2061.
- [55] Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis [J]. *Analytical chemistry*, 2000, 72: 1156-1162.
- [56] Xie Z Z, Chen J Y, Gao H, et al. Global Profiling of Urinary Mercapturic Acids Using Integrated Library-Guided Analysis [J]. *Environ Sci Technol*, 2023, 57 (29): 10563-10573.
- [57] Krausova M, Ayeni K I, Wisgrill L, et al. Trace analysis of emerging and regulated mycotoxins in infant stool by LC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414: 7503-7516.
- [58] Manz K E, Feerick A, Braun J M, et al. Non-targeted analysis (NTA) and suspect screening analysis (SSA): a review of examining the chemical exposome [J]. *J Expo Sci Env Epid*, 2023, 33 (4): 524-536.
- [59] Delvaux A, Rathahao-Paris E, Alves S. Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2022, 41: 695-721.
- [60] Koeniger S L, Merenbloom S I, Valentine S J, et al. An IMS-IMS analogue of MS-MS. *Analytical chemistry*, 2006, 78 (12): 4161-4174.
- [61] Kanu A B, Dwivedi P, Tam M, et al. Ion mobility-mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43 (1): 1-22.
- [62] Purves R W, Guevremont R. Electrospray ionization high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry [J]. *Analytical chemistry*, 1999, 71 (13): 2346-2357.
- [63] Baird M A, Shliaha P V, Anderson G A, et al. High-Resolution Differential Ion Mobility Separations/Orbitrap Mass Spectrometry without Buffer Gas Limitations [J]. *Analytical chemistry*, 2019, 91 (10): 6918-6925.
- [64] Shvartsburg A A, Smith R D. Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry [J]. *Analytical chemistry*, 2008, 80 (24): 9689-9699.
- [65] Smith D P, Knapman T W, Campuzano I, et al. Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies [J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2009, 15 (2): 113-130.
- [66] Rasanen R M, Hakansson M, Viljanen M. Differentiation of air samples with and without microbial volatile organic compounds by aspiration ion mobility spectrometry and semiconductor sensors [J]. *Build Environ*, 2010, 45 (10): 2184-2191.
- [67] Ratiu I A, Bocos-Bintintan V, Patrut A, et al. Discrimination of bacteria by rapid sensing their metabolic volatiles using an aspiration-type ion mobility spectrometer (a-IMS) and gas chromatography-mass spectrometry GC-MS [J]. *Analytica chimica acta*, 2017, 982: 209-217.
- [68] May J C, McLean J A. Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation [J]. *Analytical chemistry*, 2015, 87 (3): 1422-1436.
- [69] Zheng X, et al. Utilizing ion mobility spectrometry and mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and their metabolites [J]. *Analytica chimica acta*, 2018, 1037: 265-273.
- [70] Burnum-Johnson K E, Zheng X Y, Dodds J N, et al. Ion Mobility Spectrometry and the Omics: Distinguishing Isomers, Molecular Classes and Contaminant Ions in Complex Samples [J]. *Trends Analyt Chem*, 2019, 116: 292-299.
- [71] Stephan S, Jakob C, Hippler J, et al. A novel four-dimensional analytical approach for analysis of complex samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408 (14): 3751-3759.
- [72] Stephan S, Hippler J, Kohler T, et al. Contaminant screening of wastewater with HPLC-IM-qTOF-MS

- and LC+LC-IM-qTOF-MS using a CCS database [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408 (24): 6545-6555.
- [73] Schulze-Sunninghausen D, Becker J, Luy B. Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136 (4): 1242-1245.
- [74] Vogeli B. The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2014, 78: 1-46.
- [75] Evans R. The interpretation of small molecule diffusion coefficients: Quantitative use of diffusion-ordered NMR spectroscopy [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2020, 117: 33-69.
- [76] Vignoli A, Ghini V, Meoni G, et al. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR [J]. *Angew Chem-Int Edit*, 2019, 58 (4): 968-994.
- [77] Takis P G, Schafer H, Spraul M, et al. Deconvoluting interrelationships between concentrations and chemical shifts in urine provides a powerful analysis tool [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 1662.
- [78] Wieske L H E, Peintner S, Erdelyi M. Ensemble determination by NMR data deconvolution [J]. *Nat Rev Chem*, 2023, 7 (7): 511-524.
- [79] Vermeulen R, Schymanski E L, Barabasi A L, et al. The exposome and health: Where chemistry meets biology [J]. *Science*, 2020, 367 (6476): 392-396.
- [80] Maitre L, Robinson O, Martinez D, et al. Urine Metabolic Signatures of Multiple Environmental Pollutants in Pregnant Women: An Exposome Approach [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52 (22): 13469-13480.
- [81] Sarigiannis D A, Papaioannou N, Handakas E, et al. Neurodevelopmental exposome: The effect of in utero co-exposure to heavy metals and phthalates on child neurodevelopment [J]. *Environ Res*, 2021, 197: 110949.
- [82] Ramautar R. Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Clinical Metabolomics. *Adv Clin Chem*, 2016, 74: 1-34.
- [83] Bertoletti L, Schappler J, Colombo R, et al. Evaluation of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of the conformational heterogeneity of intact proteins using beta (2)-microglobulin as model compound [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 945: 102-109.
- [84] Zhang A H, Sun H, Wang P, et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis [J]. *Analyst*, 2012, 137 (2): 293-300.
- [85] Bhimwal R, Rustandi R R, Payne A, et al. Recent advances in capillary gel electrophoresis for the analysis of proteins [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1682: 463453.
- [86] Terabe S. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2009, 2: 99-120.
- [87] Ouimet C M, D'Amico CI, Kennedy RT. Advances in capillary electrophoresis and the implications for drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discovery*, 2017, 12 (2): 213-224.
- [88] Ramautar R, Somsen G W, de Jong G J. CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* 30, 276-291 (2009).
- [89] Yu F Z, Zhao Q, Zhang D P, et al. Affinity Interactions by Capillary Electrophoresis: Binding, Separation, and Detection [J]. *Anal Chem*, 2019, 91 (1): 372-387.
- [90] Gill B, Jobst K, Britz-McKibbin P. Rapid Screening of Urinary 1-Hydroxypyrene Glucuronide by Multisegment Injection-Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry: A High-Throughput Method for Biomonitoring of Recent Smoke Exposures [J]. *Anal Chem*, 2020, 92 (19): 13558-13564.
- [91] Sun L, Inaba Y, Kanzaki N, et al. Identification of Potential Biomarkers of Radiation Exposure in Blood Cells by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *2020, 21 (3): 812*.
- [92] Dominguez-Alvarez J. Capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry for the determination of organic and inorganic arsenic compounds in water samples [J]. *Talanta*, 2020, 212:





120803.

- [93] Bings N H, Bogaerts A, Broekaert J A C. Atomic Spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (2): 670-704.
- [94] Singh P, Singh M K, Beg Y R, et al. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples [J]. *Talanta*, 2019, 191: 364-381.
- [95] Szukalska M, Merritt T A, Lorenc W, et al. Toxic metals in human milk in relation to tobacco smoke exposure [J]. *Environ Res*, 2021, 197: 111090.
- [96] Fung L A H, Antoine J M R, Grant C N, et al. Evaluation of dietary exposure to minerals, trace elements and heavy metals from the muscle tissue of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus 1758) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 205-212.