生物效应导向的污染物分析研究新进展

马千驰^{1,2}, 刘艳娜^{1,2}, 史建波^{1,2}, 曲广波^{1,2*}, 江桂斌^{1,2}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: gbqu@rcees.ac.cn

收稿日期: 2018-04-10; 接受日期: 2018-06-15; 网络版发表日期: 2018-09-21

国家自然科学基金(编号: 21527901)资助项目

摘要 与日俱增的化学污染导致环境形势日益严峻. 效应导向分析技术(effect-directed analysis, EDA)是分析复杂基质中效应污染物的实用工具, 该方法结合了生物效应测试、有机污染物分离、污染物浓度测定和结构鉴定等分析评价方法. 本文综述了近年来EDA在样品提取、生物效应测试、分离制备流程和质谱鉴定方法等方面的最新研究进展. 同时, 本文介绍了高通量筛选在EDA中的应用, 并对EDA未来的研究方向和挑战进行了展望.

关键词 效应导向分析, 污染物鉴定, 生物效应测试, 毒性筛查, 复合效应, 高通量筛选

1 引言

随着新化学物质的大量使用, 潜在污染物的数量迅猛增长. 面对与日俱增的化学污染, 污染物的毒性鉴定、生物效应测试和健康效应评价均面临着严峻挑战. 为了高效地完成化合物的毒性测试及其分子机制研究, 2008年美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)开展了Toxicology in the 21st Century (Tox21)项目^[1]. 该项目以细胞模型为基础, 通过高通量筛选, 进行有机化合物毒性通路的系统研究, 以建立可用于预测化合物毒性的构效关系模型. 与动物实验相比, 体外生物效应测试周期短, 速度快, 价格低廉. 类似地, 欧盟于2000年发布了水框架指令(water framework directive, WFD), 要求各成员国对流域内的所有水体进行综合监测, 并依据环境质量标准(envir-

onmental quality standards, EQS)对优先控制的化学污染物进行化学评估^[2]. 以上化学品检测与评估项目, 更多的是对纯品化合物进行毒性筛查, 或者通过传统的化学分析方法监测样品中的优先控制污染物, 进而限制有害物质的排放. 然而, 此类评价方法只能简单呈现样品中所检测化合物的浓度及毒性效应, 无法体现实际环境介质中有害物质的含量, 也无法评估其整体的环境健康风险. 20世纪80年代, Schuetzle和Lewtas^[3]提出了生物测试导向的化学分析(bioassay-directed chemical analysis). 他们首先测定了空气颗粒样品的整体致突变生物效应, 进一步通过样品组分分离及各组分生物测试收集到高致突变效应的样品组分, 最后通过化学分析鉴定出了其中的硝基PAH等效应污染物. 这种将生物效应测试、样品分离和效应污染物鉴定相结合, 进行样品的生物效应评价及效应污染物鉴定的

引用格式: Ma Q, Liu Y, Shi J, Qu G, Jiang G. Effect-directed analysis in environment research: current status and future challenges. *Sci Sin Chim*, 2018, 48, doi: 10.1360/N032018-00092

方法, 称为效应导向分析方法(effect-directed analysis, EDA).

EDA总体策略流程如图1所示, 在Step 1中, 样品经有机溶剂提取、初步净化后转溶至生物相容性助溶剂中进行特定生物效应测试. 具有活性的样品随后被转入Step 2中进行组分分离^[4], 并对获得的若干子代馏分进一步进行生物效应测试以筛选活性组分. 因此, EDA通过逐步排除非活性组分达到纯化和富集效应污染物的目的^[5]. 样品的分离制备取决于样品的特性、候选混合物的性质(极性、分子量及官能团等)以及生物效应测试的种类等^[6]. 在Step 3中, 获得的活性组分可通过分析技术手段进行鉴定. 利用商业或者合成的标准品, 可以最终确认所鉴定的污染物, 及其与生物效应间的因果关系(Step 4); 进一步通过定量污染物, 可以计算该污染物对样品总生物效应的贡献百分比. 目前EDA已经被用于分析包括大气颗粒物^[7]、土壤^[8]、沉积物^[9]、污水^[10]、室内灰尘^[11]、地表及地下水^[12]、石油提取物^[13]和食物接触用纸^[14]等在内的各类型环境样品中. 此外, 在兴奋剂分析^[15]、法医毒理学^[16]和食品安全^[17]等领域, EDA也表现出一定的应用潜力.

2 样品提取

2.1 常规样品提取方法

常规的样品提取方法包括液-液萃取法(liquid-liquid extraction, LLE)^[18]和固相萃取法(solid phase extraction, SPE)^[19,20]. 为了获得足量的水样提取物, 可使用超大容固相萃取(large volume-solid phase extraction, LV-SPE)装置^[21,22]. 例如, LV-SPE可快速完成现场1000 L水样的提取, 克服了样品采集量的限制. 超声萃取^[23]和加速溶剂萃取(ASE)等^[24]常用来提取土壤、沉积物、空气颗粒物和食品等固体样品, 可有效提取样品中中度疏水性至强疏水性的化合物^[25], 具有节省溶剂、流程快速、基质影响小和重现性好等优点. 近年来, 运用EDA技术对生物样品(如哺乳动物血液^[20,26]、动物器官组织^[27,28]和植物提取液^[29,30])的研究逐渐增多. Suzuki等^[27]基于海豹肝脏建立了生物组织样品的丙酮-正己烷萃取方法, 再以硫酸钠-硫酸硅胶柱进行样品净化, 该方法对1,2,3,7,8-PeCDD、PCB126和 p,p' -DDE的回收率能达到79%~110%, 可有效应用于海豹、鸕鹚、浣熊和江豚等动物的脂肪和肝脏样品的前

图1 复杂混合物的效应分析方案

Figure 1 Process of effect-directed analysis in complex mixture.

处理工作. 加速膜辅助清理(accelerated membrane-assisted cleanup, AMAC)技术适用于富含脂质的生物样品的前处理^[31,32], 能够在除去生物样品中90%脂质的同时保持对PCB-28、芘、 p,p' -DDE和 γ -六氯环己烷等化合物大于70%的回收率.

2.2 基于生物有效性的样品提取方法

以水系沉积物为研究对象, 研究者所使用的样品提取方法往往为耗竭式提取, 这种提取方法虽然适用于多种化学定量分析方法的前处理需求, 但是未能考虑有机污染物的实际生物有效性, 常会导致EDA研究中疏水性污染物的风险被高估^[33]. 在EDA的研究中, 人们开始考虑生物有效性这一重要因素^[34], 以实现更为客观的环境样品风险评估.

为了尽可能地还原有机体在环境介质中吸附污染物的情况, 有报道提出了生物可及性导向的提取(bioaccessibility-directed extraction, BDE)策略, 以丁醇或者超临界二氧化碳等为萃取剂进行温和提取, 以减弱有机物在提取溶剂中的溶解度^[35,36]. 也可以通过在样品中加入TENAX^[37]、XAD^[38]或羟丙基- β -环糊精(HPCD)^[9]等强萃取剂, 形成沉积物-水-强萃取剂系统, 使得系统只萃取解吸至水相中的有机物. 另有研究者提出了基于分配的被动采样法(partitioning-based passive sampling, PBPS), PBPS法是一种借助浓度差使污染物在样品介质和采样膜之间达到被动平衡, 以模拟污染物在环境介质和生物体的分配行为的采样方法. 然而, 以上两方法均有诸多局限性(如PBPS法平衡时间过长), 因而需要探索适用于提取沉积物中绝大多数化合物的通用分析方法^[39].

3 生物效应测试

生物效应测试终点的选择, 除需考虑与相应的污染物类型匹配外, 也需要考虑筛选通量、特异性、灵敏度和重复性等因素. 生物效应测试方法主要包括体外(*In vitro*)暴露和体内(*In vivo*)暴露两种. 在EDA中, 应充分考虑有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP), 为效应靶点的选择和环境健康风险的评估提供指导^[40]. AOP是在现有的毒理学、生物学和代谢组学等基础之上, 结合分子起始事件(molecular initiating event, MIE)与生物学水平上的细胞效应而形成的概念性生物学框架. 其中MIE指外源性化合物和特定的生物分子之间的反应, 包括代谢、防御和修复机制以及一系列适应性应激反应^[41]. MIE的研究, 可运用计算毒理学方法将细胞毒性实验结果外推至器官、个体、群落以及生态系统^[42], 从而实现体外细胞实验逐渐取代动物实验和人类毒性评价实验的目标. AOP对消除EDA实验操作技术差异、明确生物测定优先级、确定暴露组各种组分的相对贡献, 以及鉴定复杂混合物中的主要风险驱动因素均具有重要的帮助^[43].

3.1 体外生物效应测试(*In vitro*)

体外生物效应测试可以实现不同基质中污染物的毒性评价, 包括地表水、沉积物及沉积物孔隙水、生物组织提取液等. 体外生物效应测试具有耗时短、灵敏度高和特异性强的特点. 大部分体外生物效应测试适用于高通量的自动化方法开发, 如美国Tox21项目^[44].

3.1.1 遗传毒性效应

一些污染物(如某些多环芳烃, PAHs)及其生物转化产物可以与DNA结合, 形成DNA加合物, 造成点突变、链断裂或DNA重组, 该作用可诱发癌变、畸变和DNA损伤等效应^[45]. Ames波动测定法^[46]和碱性DNA解旋(彗星)测定法^[47]是两种广泛使用的遗传毒性评价方法. 研究者通过对菌株中转入萤光素酶报告基因(pET-28-*LacI/Lux*)培育成TA98Lux和TA100Lux菌株^[48], 优化了Ames法, 缩短了检测时间, 有利于更快更高通量地筛选样品中的致突变剂. 随着化学诱导萤光素酶检测方法(chemically activated luciferase gene expression assay, CALUX)的广泛运用, 用于检测遗传毒

性的p53-CALUX方法也已成功建立^[49]. 该方法以放线菌素D或环磷酸胺作为阳性对照, 通过检测p53蛋白的激活强度来确定样品的毒性效应, 能够识别多种类型的遗传毒性化合物, 具有较高的灵敏度和特异性.

3.1.2 芳香烃受体效应

二噁英类芳香族化合物指含有一个或多个苯环的有机化合物, 常被认为是一级致癌物质^[50], 是环境领域的优先控制污染物. 芳香烃受体蛋白(aryl hydrocarbon receptor, AhR)是一种胞质受体蛋白^[51], 可以特异性结合二噁英类化合物, 并在细胞核内转录激活细胞色素P4501A (CYP1A)等响应基因^[52]. 通过测定7-乙氧基异氟醚-*O*-脱乙基酶(EROD)活性可以测算芳香族化合物的含量^[53]. 除了EROD测定法, 基于重组细胞的二噁英应答化学激活萤光素酶表达(DR-CALUX)测定法^[54,55]也可用于测定样品中的二噁英毒性当量. 其原理是通过激活细胞内的萤光素酶报告基因, 测定萤光素的发光强度, 进而获得样品中效应物质的二噁英毒性当量(toxic equivalents, TEQs). 常见的重组细胞系包括人类骨肉瘤细胞系(U2-OS)^[56]、大鼠肝癌细胞系(H4IIE-*luc*)^[57]和小鼠肝癌细胞系(CBG2.8D)^[58]. Grung等^[59]利用转染了萤光素酶的小鼠肝癌细胞系(H1L6.1c3)对挪威两个受污染海域的底泥沉积物进行了毒性效应筛查, 结果显示奥斯陆港和格林兰地区样品中的AhR激动剂分别为PAH和含氮/含氧的多环芳烃化合物. 化学激活萤光蛋白表达测定法(chemically activated fluorescent gene expression assay, CAFLUX)是在DR-CALUX的基础上, 利用水母(*Aequorea victoria*)的绿色萤光蛋白酶(*gfp*)代替萤光素酶作为报告基因, 具有较低的检测成本. Vrabie等^[60]利用小鼠肝癌细胞系(H1G1-*luc*)鉴定出原油中芳香烃效应污染物主要集中在log K_{OW} 为5~8 (C_{14} ~ C_{32} 烷烃范围)的中高沸点馏分当中.

3.1.3 内分泌干扰效应

根据国际化学品安全署(International Program on Chemical Safety, IPCS)的定义, 能够改变内分泌系统功能并引起个体或种群可逆性或不可逆性生物学效应的外源化合物为内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[61]. EDCs引发内分泌效应的机制主要包括核受体(NR)、胞浆受体和非受体等途径. EDA中常

见的核受体途径检测终点包括雌雄激素受体(ER/AR)、糖皮质激素受体(GR)、过氧化物酶增殖物激活核受体(PPAR)、甲状腺激素(TR)、孕激素(PR)、维甲酸受体(RAR)和维甲酸X受体(RXR)等。非受体途径指EDCs通过影响下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)、下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT轴)和/或者下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)中的某些环节,从而参与或影响类固醇激素的正常合成、代谢、转化和活性^[62]。

近期的一篇综述中列出了11种核受体的34种激素检测方法^[63],涵盖了可用于EDCs研究的多种工具。除了常用的萤火虫荧光素酶报告基因检测法(*luc*, CA-LUX assay)^[64,65]和绿色荧光素酶报告基因检测法(*gfp*, CAFLUX assay)^[66]外, GeneBLAzer测定法^[67]也是常用于各类EDCs(如激动剂和抑制剂)的检测方法。该测定法通过检测520 nm波长下的绿色荧光或447 nm波长下的蓝色荧光信号确定 β -内酰胺酶(*bla*(M))的表达水平。König等^[68]回顾了近年来GeneBLAzer方法在EDC研究中多个受体(包括ER-/Anti-ER、AR-/Anti-AR、PR-/Anti-PR、GR-/Anti-GR、PPAR-/Anti-PPAR、RXR-和RAR-)检测中的应用。Zwart等^[69]通过使用CRISPR/Cas9基因组编辑法开发了糖皮质激素受体敲除突变体,消除雄激素和抗雄激素检测法中糖皮质激素干扰的同时提高了检测特异性。

对于以非受体途径产生的内分泌干扰效应作为评价终点的研究,EDA中也有所涉及。例如,某些咪唑类杀真菌剂和植物黄酮类物质可分别通过影响芳香化酶(CYP19)和17 β -羟基类固醇-脱氢酶(17 β -HSD)的活性调节激素,干扰内分泌系统^[70]。定量分析类固醇及代谢基因含量、CYP19芳香化酶活性和类固醇激素等方法也常被用来探究效应化合物对类固醇生成的影响^[71]。

3.1.4 神经毒性效应

乙酰胆碱酯酶(acetyl cholinesterase, AChE)的活性是常用的神经毒性效应评价指标。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是存在于神经突触间隙的神经递质,在传递神经兴奋后被AChE水解为乙酸和胆碱^[72]。AChE的失活会导致ACh的降解受阻,后者持续与受体结合产生激动效应,会诱导神经元细胞的过度兴奋。Tufti等^[73]采用EDA技术,以AChE的活性作为生物效应的测试终点,鉴定出地表水中的主要AChE活性抑制剂为吡虫

啉、噻虫啉和抗蚜威3种杀虫剂。Ouyang等^[74]通过使用二维液相色谱分离制备法结合高分辨率飞行时间质谱(LC $\times$ LC-TOF-MS),明确了泰必利、氨磺必利和拉莫三嗪是捷克某污水处理厂废水中的主要AChE抑制剂。

对神经元细胞的直接毒性暴露也可用于评价化合物的神经毒性。Qu等^[75]选取新生大鼠小脑颗粒神经元(CGN)的原代培养细胞作为神经毒性的评价体系,建立了神经毒性导向的环境污染物分析方法(neurotoxicity assay-directed analysis, NADA),分析结果显示四溴双酚A双丙烯基醚是污染地区样品中的主要效应污染物。

3.1.5 细胞应激效应

当细胞响应外界环境压力(如毒素暴露、活性氧损伤或机械损伤等)时会产生一系列防御或适应性变化,以增强细胞生存能力,称为细胞应激效应。细胞应激效应中的短期机制会尽可能地减少急性伤害对细胞的损伤,而长期机制则为细胞对抗不利环境因素提供一系列必要条件^[76]。EDA中选用的细胞应激效应除前文所述的p53蛋白遗传毒性通路外,还有ARE/Nrf2通路介导的氧化应激^[77]以及启动细胞内信号通路进而调节靶蛋白活性(如促进NF- κ B转录因子的表达)介导的炎症效应^[78]。

Wang等^[77]将荧光素酶报告基因ARE转录因子整合到人乳腺癌细胞系MCF7中,构建了能够应答引起氧化应激化学物质的AREc32细胞系,该细胞系通过激活Nrf2介导的氧化应激反应来检测效应化合物。Escher团队^[79,80]利用AREc32细胞系,以叔丁基氢醌作为阳性对照,苯酚作为阴性对照,检测了污水、再生水、雨水和饮用水等9种环境样品中269种化学物质的含量,然而检测到的化学物质只能解释样品氧化应激诱导中0.1%的贡献,其余毒性效应化合物仍需进一步鉴定。NF- κ B参与调控免疫反应的早期和炎症反应,据统计,ToxCast数据库中3%的化学物质能够在NF- κ B-*bla*试验中产生诱导效应^[81],该效应终点有助于识别环境介质中的致炎性有毒污染物。

3.2 体内生物效应测试(*In vivo*)

体内生物效应测试多采用水生生物^[82],即将模式生物暴露于环境样品中或其提取物的暴露系统中,通

过评价模式生物的死亡率、孵化率、胚胎发育和个体生长等效应实现生物效应的测试. 体内生物效应测试是最早应用到EDA中的生物评价方法, 能够反映污染物的生态毒理学效应. 常见的模式生物包括藻类^[83,84], 浮游动物及小型昆虫(水蚤^[23]、水生寡毛虫^[60]、摇蚊^[85]、跳虫^[86]), 小型动物(新西兰泥螺^[87]、淡水蜗牛^[73]、钩虾^[88])和鱼类^[24,89-91]等.

在绿藻的生长抑制测试实验中, 确认了三氯苯氧氯酚等极性化合物是绿藻生长抑制效应的主要贡献物^[83]. 污染诱导的群落耐受性(pollution-induced community tolerance, PICT)检测法最早由Blanck和Wängberg^[92]提出, 是通过检测藻类群落功能的变化来评价毒性效应的高灵敏度方法. 该方法假设, 暴露期间暴露群落的敏感成分(如物种、基因型或表型性状等)会被更耐受的成分所代替, 从而导致群落耐受性增加. 一项以PICT为指导方法的研究通过检测藻类群落光合作用的变化, 确定了*N*-苯基-2-萘胺(PNA)、三丁基锡(TBT)和普罗米芬3种主要的毒性污染物^[84].

小型昆虫和动物的体内生物效应测试也是EDA研究中经常采用的毒性筛选方法. Qi等^[85]以摇蚊(*Chironomus dilutus*)体内酶反应作为生物效应测试终点, 证明了广州珠江底泥提取物中的氯氰菊酯、烯酰吗啉、卵磷脂和噻吩氯等化合物是诱导摇蚊氧化应激反应的主要污染物. Inostroza等^[88]选取钩虾(*Gammarus pulex*)作为模式生物, 用辛醇-水分配系数(K_{OW})和线性溶剂化能量关系(linear solvation energy relationship, LSER)等指标, 讨论了不同污染物的体内积累机制, 结果显示亲水性新烟碱类杀虫剂(吡虫啉)在钩虾体内有明显累积. 该研究在预测沉积物中的有机碳、脂质和蛋白质在水中的分配系数和活性比率方面具有很好的应用前景. 在以土壤跳虫(*Folsomia candida*)为评价对象的研究中^[86], 发现吡虫啉具有明显的致死毒性. 此外, 较高的半数致死浓度/半数有效浓度(LC_{50}/EC_{50})值表明噻虫啉对跳虫的繁殖有更显著的影响.

鱼类及鱼胚胎毒性试验(fish embryo toxicity test, FET)^[89-91]是非常重要的体内生物效应测试方法. 斑马鱼(*Danio rerio*)因具有体积小、繁殖力强、发育迅速、易饲养以及胚胎透明等优点而常作为毒性评价模型. 评价指标通常有心率、水肿形成、头长、血液循环以及神经毒性等^[93]. Marić等^[91]将斑马鱼暴露于当地入侵物种*Caulerpa taxifolia*海藻的代谢产物中, 观

察到斑马鱼有机阴离子转运蛋白(Oatp1d1)受到显著抑制. 进一步通过液相色谱串联四级杆时间飞行质谱(LC-QqTOF MS), 鉴定出该代谢产物中的主要效应毒物为Caulerpenyne. Tufi等^[94]利用亲水相互作用液相色谱偶联串联质谱(HILIC-MS MS)研究了农药对斑马鱼胚胎和幼鱼神经递质系统的影响.

4 效应物质鉴定

EDA研究中活性组分的化学成分确认在分析层面上主要有两种策略: 针对已知污染物的靶标分析(target analysis)和针对未知物的非靶标分析(nontarget analysis).

4.1 靶标分析

得益于毒理学研究, 我们对一些常见化合物的毒性效应有一定了解. 因而, 在进行一些特定生物效应的EDA研究时(如雌激素激动效应), 研究者会假定效应组分中含有一些常见的已知雌激素激动污染物(如Genistein^[95]), 借助于标准品进行结构确认和浓度测定, 并最终计算其在总生物效应中的贡献百分比. 这类有确切的化合物信息并有标准品提供的分析称为靶标分析法.

标准品可以提供物质的特征分析参数, 如色谱保留时间、光谱吸收特点、精确质量数、碎片离子信息(MS/MS)和仪器响应. 通过比对标准品和样品数据, 可以确认效应组分中是否含有该化合物, 并借助标准品曲线获得浓度数据. 质谱分析, 尤其是色谱质谱联用技术是目前目标化合物分析的最常用分析技术. 气相色谱质谱联用(GC-MS)和液相色谱质谱联用(LC-MS)可分别用于分析非/低极性和中高极性的化合物^[96,97]. 质谱中经常装备四级杆、三重四级杆和离子阱等低分辨高灵敏度的质量分析器.

4.2 非靶标分析

在实际EDA分析中, 所测定的已知化合物往往仅能解释很小一部分的生物效应, 而大部分的生物效应则是来自于未知物^[4]. 对未知化合物的鉴定方法称为非靶标分析.

区别于靶标分析, 非靶标化合物分析中没有标准品, 且没有化合物的相关分析参数可供对比. 早期发

展起来的光谱技术, 如紫外(UV)、红外(IR)和核磁共振(NRM), 能够提供化合物的官能团信息, 可用来进行未知化合物的比对。但是较低的仪器灵敏度(mg级别)和特异性限制了在痕量环境分析中的应用。高灵敏和特异性的质谱分析, 通过提供化合物质量数及其碎片信息, 是未知物分析中最常用的鉴定技术。

GC-MS是EDA中未知物鉴定的常用方法, 也是早期EDA的主要技术。借助于电子轰击(EI)或者化学电离(CI)离子源, 被分析物可以在源内形成分子碎片, 提供分子离子、碎片离子的质量数和相对强度信息, 这些信息可以用于反向推测被分析物的结构。经过多年发展, 建立了有大量化合物的标准谱图(如MS/MS谱图, 表1), 用于未知物鉴定中的比对分析, 如NIST和Wiley数据库^[99]分别含约70万和80万个谱图^[100]。但是GC-MS仅适合分析热稳定性强的非极性或低极性化合物^[96], 不能用来分析极性化合物(如体内代谢物)。此外, 对图谱数据库的严重依赖, 使得其对数据库外的化合物鉴定也颇为困难。但是随着近年来高分辨质谱(HRMS)的发展, GC-HRMS联用技术为不依赖数据库进行完全的未知物鉴定提供了可能。GC联用飞行时间质谱(TOF-MS)也已被应用于食品包装盒中多环芳烃的测定^[14]。

LC-MS适用于分析极性化合物^[97], 弥补了GC-MS的不足。装配的电喷雾电离源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)或大气压光电离源(APPI), 使其可以对大范围的不同极性化合物进行分析。不同于GC-MS, LC-MS在未知物分析中多是完全的未知物鉴定而较少依赖数据库, 这主要是由于LC-MS(/MS)中碎片离子少, 重现性差, 标准谱图少。

运用LC-MS进行未知物鉴定主要依赖高灵敏度的全扫描HRMS, 目前主要有飞行时间质谱(TOF)、轨道阱质谱(Orbitrap)和傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR) 3类。HRMS的主要特点是高分辨率和高质量精度。在全扫描LC-HRMS分析中, 所有从色谱柱流出并在质谱离子源离子化的物质都会被检测到, 因而会产生有大量化合物的质谱信号。HRMS的高分辨率可以用于区分不同物质, 尤其是质量数非常接近的化合物。例如, FT-ICR MS的超高分辨率(450000~650000, $m/z=500$)能够分离相差小于3 mDa的质谱峰^[101]。高质量精度可以用于推测可能的化学分子式。TOF和Orbitrap的质量精度一般在5 ppm之内^[102], 而FT-ICR则达

表1 未知物非靶标鉴定中常用的数据库^[98]

Table 1 Commonly used databases in nontarget discovery [98]

数据库	项目	获取方式
ChemIndex	>1000000	免费, 在线
ChemINDEX	>75000	订阅
ChemSpider	~60000000	免费, 在线
Merck Index	>10000	购买或订阅
NIST MS	>220000	购买
NIST WebBook	>60000	免费, 在线
PubChem Substance	>60000000	免费, 在线
SciFinder	>140000000	购买
Wiley Registry of MS	>660000	购买

到2 ppm之内^[103]。

在EDA研究中, 基于HRMS的未知物分析鉴定已经应用于多种环境(如水^[104]、土壤^[90])和生物样品(如北极熊血浆^[20])中。一般分析流程如下: (1) 效应组分经色谱分离后进入HRMS进行高分辨率和高质量精度的扫描, 获得所有检出离子的保留时间和分子离子质量信息。考虑到基质的复杂性, 一般的指导性原则是, 分析环境样品和生物样品的质谱分辨率应该分别不低于30000^[105]和100000^[106]。(2) 分析全扫图谱, 挑选出疑似效应物离子。HRMS会产生庞大的数据量, 因而如何从中挑选出疑似效应物离子往往是未知物效应物鉴定的关键步骤。考虑到组分富集效应, 一般推荐从主要的色谱峰中的高响应离子开始, 然后向次要离子, 次要色谱峰过渡。(3) 利用软件(如Xcalibur)对选定的疑似效应物离子进行分子式组成分析。HRMS的高质量精度可以帮助首先排除2 ppm (FT-ICR)或者5 ppm (TOF和Orbitrap)以外的大量分子式。Kind等^[107]提出的“7项黄金准则”可被用于进一步缩小可能的分子式范围。(4) 对选出的疑似效应物离子进行MSⁿ分析, 通过碎片信息反向验证提出的分子式, 并推断结构信息。同时, 可以利用相关数据库(表1)进行分子量、分子式以及MS/MS谱图的搜索和比对, 推测可能的化合物结构。(5) 通过商业或者合成标准品对比色谱保留时间和质谱行为最终确认结合物结构。(6) 验证所鉴定化合物与其生物效应的因果关系并计算其在样品中的生物效应贡献百分比。

以上基本流程要求先获得疑似效应物质的分子离

子质量数信息, 然后对目标质量数一一进行MSⁿ分析, 这种针对某些目标分子离子进行裂解的分析方式称为数据依赖性采集(data dependent acquisition, DDA). 环境/生物样品基质复杂, 痕量的生物效应物质往往并不是全扫描(步骤1)图谱中的高响应离子. 要在大量数据中找到正确的生物效应化合物(步骤2)往往需要经过步骤2~4的反复多次分析. 近年发展起来的数据非依赖性采集(data independent acquisition, DIA)则可以同时获得大量物质的分子离子和碎片离子信息, 大大提高了数据采集通量, 加快了分析速度. DIA的基本原理为快速的双通道切换扫描, 在全扫描的同时对全扫描中的全部或者特定离子(如高于某信号强度的离子, 处于某质量范围的离子等)进行MS/MS裂解并扫描子离子. ABSciex QqQ-TOF 6600的SWATH功能^[108]、Waters Xevo qTOF的MS^E功能^[109]以及Thermo Q-Exactive MS的AIF (all-ions fragmentation)功能即为自动DIA分析. 目前该技术已经应用于代谢组学^[110,111]和蛋白质组学^[112,113]的研究中. 在EDA高通量筛选策略中, 可以结合DIA技术尽可能多地提供效应组分中的化合物信息, 为环境中有害化合物的识别和鉴定提供新思路.

5 高通量组分的分离和收集

在EDA流程中, 样品的分离和制备流程繁琐, 耗时长, 因而发展快速制备和收集的自动化前处理方法是提升EDA分析速度的有效途径. 样品的自动收集需要引入自动化的分离制备装置, 收集装置应搭载玻璃瓶、反应管、96孔甚至384孔板^[114,115]等通用规格的批处理容器. 除根据模式化合物保留时间进行收集外, 也可基于特定时间间隔或特定体积等参数的分离制备策略^[90], 将各组分体积控制在微升剂量^[116]或毫升剂量^[75].

GC-MS对于挥发性化合物具有高效的分离能力和优越的检测灵敏度. 除了常规的对气体的解析和同位素的分析外, 在EDA分析中GC-MS也常被用于效应毒物的分析鉴定^[117]. 然而GC的分离制备和组分收集往往在开放的管状阱中进行, 气溶胶的形成容易导致目标产物的损失^[118]. 针对GC分离制备的局限性, Kool等^[114,119,120]开发了基于384孔板的在线GC-MS连续分离制备与分析方法. 该分离制备系统在GC柱的出口

处通过Y型接头分流色谱组分至MS检测器, 剩余大部分洗脱组分引至倒置Y型接头中, 与气化的正辛烷捕集溶剂相混合, 以毛细管导出至GC柱箱外, 将含有分析物的液体级分在384孔板上冷凝并收集. 通过对384孔板中收集的各时间点的馏分进行分析重建质谱图, 并与在线记录的MS色谱质谱图进行比较, 以此来研究馏分收集性能. 该系统成功应用于灰尘样品的分离, 并进行了活性组分中雄激素和抗雄激素的成分分析.

与GC分离制备收集系统相比, LC分离制备系统对强极性化合物具有更好的分离制备能力. 在对底泥样品提取液进行分离时, Lübcke-von Vare等^[121]建立了氰丙基柱(CN)、硝基苯基柱(NO)和多孔石墨碳柱(PGC)的三级串联色谱分离程序. 首先, 样品被导入CN柱, 极性化合物(如硝基-PAHs)因偶极-偶极力与氢键作用被保留而获得分离; 接着, 流出液被导入NO柱, 其中的非/弱极性PAHs因与NO柱之间的电子作用被吸附保留; 缺电子氯化芳香族化合物如PCBs、PCDD/Fs和氯化萘等则被洗脱并导入PGC柱进行最终分离. Booi等^[100]采用HPLC对样品提取物进行96孔板制备, 重复试验产生两块同样的96孔板, 一块用于化学分析, 另一块用于进行生物测定来确定生物活性组分. 为了降低二级分离制备中化合物的损失, 他们在进行生物测试的96孔板中加入甘油作为保持剂, 用于减少蒸发过程中化合物的损失(以文中测试的绿谷隆为例, 其回收率从17%±1%增加到64%±3%).

2005年, Jiang等^[82]搭建了“成组/整合毒理学分析仪(integrated toxicity analyzer, ITA)”. 该仪器能够快速完成样品分离、组分收集以及生物测定等一系列分析. Qu等^[75]利用该分析系统成功地进行了河流底泥中神经毒性效应物的鉴定. 样品经ASE提取和凝胶排阻色谱净化后, 通过硅胶SPE被粗分为F1和F2两个组分. 以大鼠小脑颗粒神经元细胞(cerebellar granule cells, CGNs)作为生物评价模型, Qu等选取了具有显著神经毒性的F2组分, 并将其置于ITA中继续进行分析. ITA以反相制备色谱对F2进行细分, 以1 min为时间间隔自动收集馏分, 并完成生物测试的点样. 借助ITA中的紫外检测器和质谱检测器, 确定了四溴双酚A双丙烯基醚为活性组分F2.17中的主要效应污染物.

为进一步增加毒性评价通量, 提高污染物筛查效率, Jiang等^[122]在“成组毒理学分析仪”的基础上提出

“高通量多功能成组毒理学分析系统”的研制计划。该系统获得2016年“国家自然科学基金委重大科研仪器研制项目”资助, 集成了分离与制备装置、仪器分析鉴定装置、生物效应测试装置和综合数据分析及控制装置4个模块, 为未知毒物的筛选及复合毒性效应等领域的研究提供全新的技术与通用平台。

6 总结与展望

种类逐年增多的化学品带来的潜在环境污染日益严峻。因此, 样品中混合污染物可能引起的环境健康效应以及对其中的效应污染物的鉴定将会是未来环境领域的一个重要研究方向, 跨国间的科学研究和技术合作也将日益密切^[123]。然而, EDA的实际应用仍然面临诸多挑战: (1) 环境样品中未知的副产物和环境代谢产

物大量赋存, 并产生环境效应, 鉴定未知效应污染物仍然是EDA识别中的主要瓶颈。(2) 未知物鉴定主要基于HRMS, 数据量庞大, 分析费时。此外, HRMS过于昂贵, 样品分析成本高, 大范围推广使用比较困难。因此发展廉价、快速、易于大范围推广的未知物鉴定方法是一个重要方向。(3) EDA涉及样品提取、组分分离、生物效应测试和化学分析等多个过程。低通量是EDA研究的主要瓶颈, 样品准备繁琐费时, 稳定性重现性稍差。亟待发展自动化、高通量的一体化标准分析方法。目前正在建的“高通量多功能成组毒理学分析系统”以期在该方面发挥重大作用, 并对未来EDA在环境健康领域的大范围应用起到推进作用。(4) 如何有效整合体外生物评价结果、生物有效性和暴露方法, 进而更加准确地预测环境污染物对生物和生态群落的风险与影响也是未来面临的挑战之一。

参考文献

- Huang R, Xia M, Sakamuru S, Zhao J, Shahane SA, Attene-Ramos M, Zhao T, Austin CP, Simeonov A. *Nat Commun*, 2016, 7: 10425
- Union E. *Off J Eur Union*, 2013, 226: 1–17
- Schuetzle D, Lewtas J. *Anal Chem*, 1986, 58: 1060A–1075A
- Brack W. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377: 397–407
- Buchinger S, Spira D, Bröder K, Schlüsener M, Ternes T, Reifferscheid G. *Anal Chem*, 2013, 85: 7248–7256
- Brack W, Ait-Aïssa S, Burgess RM, Busch W, Creusot N, Di Paolo C, Escher BI, Mark Hewitt L, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jonker W, Kool J, Lamoree M, Muschket M, Neumann S, Rostkowski P, Ruttkies C, Schollee J, Schymanski EL, Schulze T, Seiler TB, Tindall AJ, De Aragão Umbuzeiro G, Vrana B, Krauss M. *Sci Total Environ*, 2016, 544: 1073–1118
- Wang J, Xie P, Xu Y, Kettrup A, Schramm KW. *Atmos Environ*, 2004, 38: 6157–6166
- Wölz J, Schulze T, Lübcke-von Varel U, Fleig M, Reifferscheid G, Brack W, Kühlers D, Braunbeck T, Hollert H. *J Soil Sediment*, 2011, 11: 82–92
- Zielke H, Seiler TB, Niebergall S, Leist E, Brinkmann M, Spira D, Streck G, Brack W, Feiler U, Braunbeck T, Hollert H. *J Soil Sediment*, 2011, 11: 352–363
- Välitalo P, Massei R, Heiskanen I, Behnisch P, Brack W, Tindall AJ, Du Pasquier D, Küster E, Mikola A, Schulze T, Sillanpää M. *Water Res*, 2017, 126: 153–163
- Kassotis CD, Hoffman K, Stapleton HM. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 8735–8745
- Schulze T, Ahel M, Ahlheim J, Aït-Aïssa S, Brion F, Di Paolo C, Froment J, Hidasi AO, Hollender J, Hollert H, Hu M, Kloth A, Koprivica S, Krauss M, Muz M, Oswald P, Petre M, Schollée JE, Seiler TB, Shao Y, Slobodnik J, Sonavane M, Suter MJF, Tollefsen KE, Touseva Z, Walz KH, Brack W. *Sci Total Environ*, 2017, 581–582: 350–358
- dos Anjos NA, Schulze T, Brack W, Val AL, Schirmer K, Scholz S. *Aquat Toxicol*, 2011, 103: 46–52
- Bengtström L, Rosenmai AK, Trier X, Jensen LK, Granby K, Vinggaard AM, Driffield M, Højslev Petersen J. *Food Addit Contam A*, 2016, 33: 1080–1093
- Nielen MWF, Bovee TFH, van Engelen MC, Rutgers P, Hamers ARM, van Rhijn JHA, Hoogenboom LRAP. *Anal Chem*, 2006, 78: 424–431
- Redshaw N, Dickson SJ, Ambrose V, Horswell J. *Forensic Sci Int*, 2007, 172: 106–111
- Akkad R, Schwack W. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 1337–1345
- Tufi S, Lamoree MH, De Boer J, Leonards PEG. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 1901–1912

- 19 Guo F, Liu Q, Qu G, Song S, Sun J, Shi J, Jiang G. *J Chromatogr A*, 2013, 1281: 9–18
- 20 Simon E, van Velzen M, Brandsma SH, Lie E, Løken K, de Boer J, Bytingsvik J, Jenssen BM, Aars J, Hamers T, Lamoree MH. *Environ Sci Technol*, 2013, 47: 8902–8912
- 21 Tousova Z, Oswald P, Slobodnik J, Blaha L, Muz M, Hu M, Brack W, Krauss M, Di Paolo C, Tarcai Z, Seiler TB, Hollert H, Koprivica S, Ahel M, Schollée JE, Hollender J, Suter MJF, Hidasi AO, Schirmer K, Sonavane M, Ait-Aissa S, Creusot N, Brion F, Froment J, Almeida AC, Thomas K, Tollefsen KE, Tufi S, Ouyang X, Leonards P, Lamoree M, Torrens VO, Kolkman A, Schriks M, Spirhanzlova P, Tindall A, Schulze T. *Sci Total Environ*, 2017, 601–602: 1849–1868
- 22 Muz M, Krauss M, Kutsarova S, Schulze T, Brack W. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 1830–1839
- 23 Cristale J, García Vázquez A, Barata C, Lacorte S. *Environ Int*, 2013, 59: 232–243
- 24 Chibwe L, Geier MC, Nakamura J, Tanguay RL, Aitken MD, Simonich SLM. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 13889–13898
- 25 Jonker W, Ballesteros-Gómez A, Hamers T, Somsen GW, Lamoree MH, Kool J. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 12385–12393
- 26 Plassmann MM, Schmidt M, Brack W, Krauss M. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 7047–7054
- 27 Suzuki G, Tue NM, van der Linden S, Brouwer A, van der Burg B, van Velzen M, Lamoree M, Someya M, Takahashi S, Isobe T, Tajima Y, Yamada TK, Takigami H, Tanabe S. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 10203–10211
- 28 Martinez-Gomez C, Lamoree M, Hamers T, van Velzen M, Kamstra JH, Fernandez B, Benedicto J, Leon VM, Vethaak AD. *Aquat Toxicol*, 2013, 134: 1–10
- 29 Krüger S, Mirgos M, Morlock GE. *J Chromatogr A*, 2015, 1426: 209–219
- 30 Nickavar B, Rezaee J, Nickavar A. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15: 241–246
- 31 Schulze T, Magerl R, Streck G, Brack W. *J Chromatogr A*, 2012, 1225: 26–36
- 32 Streck HG, Schulze T, Brack W. *J Chromatogr A*, 2008, 1196–1197: 33–40
- 33 Booij P, Lamoree MH, Leonards PEG, Cenijn PH, Klamer HJC, van Vliet LA, Akerman J, Legler J. *Environ Toxicol Chem*, 2011, 30: 898–904
- 34 Brack W, Bandow N, Schwab K, Schulze T, Streck G. *TrAC Trends Anal Chem*, 2009, 28: 543–549
- 35 Hawthorne SB, Lanno R, Kreitinger JP. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24: 1893
- 36 Liste HH, Alexander M. *Chemosphere*, 2002, 46: 1011–1017
- 37 Hong S, Yim UH, Ha SY, Shim WJ, Jeon S, Lee S, Kim C, Choi K, Jung J, Giesy JP, Khim JS. *Chemosphere*, 2016, 144: 706–712
- 38 Plewa MJ, Wagner ED, Richardson SD. *J Environ Sci*, 2017, 58: 208–216
- 39 Goss KU, Schwarzenbach RP. *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 1–9
- 40 Li H, Zhang J, You J. *Environ Pollut*, 2017, 237: 944–954
- 41 Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL. *Environ Toxicol Chem*, 2010, 29: 730–741
- 42 Smith MT, de la Rosa R, Daniels SI. *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56: 715–723
- 43 Rayaroth MP, Aravind UK, Aravindakumar CT. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24: 6261–6269
- 44 Tice RR, Austin CP, Kavlock RJ, Bucher JR. *Environ Health Perspect*, 2013, 121: 756–765
- 45 Blankenship A. *Organohalogen Compd*, 1999, 42: 217–220
- 46 Muz M, Dann JP, Jäger F, Brack W, Krauss M. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 4681–4688
- 47 Deutschmann B, Kolarevic S, Brack W, Kaisarevic S, Kostic J, Kracun-Kolarevic M, Liska I, Paunovic M, Seiler TB, Shao Y, Sipos S, Slobodnik J, Teodorovic I, Vukovic-Gacic B, Hollert H. *Sci Total Environ*, 2016, 573: 1441–1449
- 48 Zwart N, Lamoree MH, Houtman CJ, de Boer J, Kool J, Hamers T. *Toxicol in Vitro*, 2018, 46: 350–360
- 49 van der Linden SC, von Bergh ARM, van Vught-Lussenburg BMA, Jonker LRA, Teunis M, Krul CAM, van der Burg B. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagenesis*, 2014, 760: 23–32
- 50 Singh KP, Wyman A, Casado FL, Garrett RW, Gasiewicz TA. *Carcinogenesis*, 2009, 30: 11–19
- 51 Giesy JP, Kannan K. *Critical Rev Toxicol*, 1998, 28: 511–569
- 52 Hilscherova K, Machala M, Kannan K, Blankenship AL, Giesy JP. *Environ Sci Pollut Res*, 2000, 7: 159–171
- 53 Regueiro J, Matamoros V, Thibaut R, Porte C, Bayona JM. *Chemosphere*, 2013, 91: 1165–1175
- 54 Houtman CJ, Cenijn PH, Hamers T, Lamoree MH, Legler J, Murk AJ, Brouwer A. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23: 32–40
- 55 Houtman CJ, Booij P, Jover E, Pascual del Rio D, Swart K, van Velzen M, Vreuls R, Legler J, Brouwer A, Lamoree MH. *Chemosphere*, 2006,

- 65: 2244–2252
- 56 Weiss JM, Hamers T, Thomas KV, van der Linden S, Leonards PEG, Lamoree MH. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1385–1397
- 57 Brack W, Bláha L, Giesy JP, Grote M, Moeder M, Schrader S, Hecker M. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27: 519–528
- 58 Zhang S, Li S, Zhou Z, Fu H, Xu L, Xie HQ, Zhao B. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 2926–2933
- 59 Grung M, Næs K, Fogelberg O, Nilsen AJ, Brack W, Lübcke-von Varel U, Thomas KV. *J Toxicol Environ Health A*, 2011, 74: 439–454
- 60 Vrabie CM, Sinnige TL, Murk AJ, Jonker MTO. *Environ Sci Technol*, 2012, 46: 1572–1580
- 61 Wang C, Wang T, Liu W, Ruan T, Zhou Q, Liu J, Zhang A, Zhao B, Jiang G. *Environ Health Perspect*, 2012, 120: 119–125
- 62 Liu C, Zhang X, Deng J, Hecker M, Al-Khedhairi A, Giesy JP, Zhou B. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 769–775
- 63 Grimaldi M, Boulahouf A, Delfosse V, Thouennon E, Bourguet W, Balaguer P. *Front Endocrinol*, 2015, 6: 62
- 64 Houtman CJ, van Houten YK, Leonards PEG, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 2455–2461
- 65 Peng H, Sun J, Alharbi HA, Jones PD, Giesy JP, Wiseman S. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 7816–7824
- 66 Fetter E, Krauss M, Brion F, Kah O, Scholz S, Brack W. *Aquat Toxicol*, 2014, 154: 221–229
- 67 Fang M, Webster TF, Stapleton HM. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 10065–10073
- 68 König M, Escher BI, Neale PA, Krauss M, Hilscherová K, Novák J, Teodorović I, Schulze T, Seidensticker S, Kamal Hashmi MA, Ahlheim J, Brack W. *Environ Pollut*, 2016, 220: 1220–1230
- 69 Zwart N, Andringa D, de Leeuw WJ, Kojima H, Iida M, Houtman CJ, de Boer J, Kool J, Lamoree MH, Hamers T. *Toxicol in Vitro*, 2017, 45: 1–9
- 70 He Y, Wiseman SB, Zhang X, Hecker M, Jones PD, El-Din MG, Martin JW, Giesy JP. *Chemosphere*, 2010, 80: 578–584
- 71 Houtman CJ, Legler J, Thomas K. Effect-directed analysis of endocrine disruptors in aquatic ecosystems. In: Brack W, Ed. *Effect-directed Analysis of Complex Environmental Contamination. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol 15*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 237–265
- 72 Soreq H, Seidman S. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 294–302
- 73 Tufi S, Wassenaar PNH, Osorio V, de Boer J, Leonards PEG, Lamoree MH. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 3937–3944
- 74 Ouyang X, Leonards PEG, Touseva Z, Slobodnik J, de Boer J, Lamoree MH. *Anal Chem*, 2016, 88: 2353–2360
- 75 Qu G, Shi J, Wang T, Fu J, Li Z, Wang P, Ruan T, Jiang G. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 5009–5016
- 76 Bakkenist CJ, Kastan MB. *Cell*, 2004, 118: 9–17
- 77 Wang XJ, Hayes JD, Wolf CR. *Cancer Res*, 2006, 66: 10983–10994
- 78 Jin L, Gaus C, Escher BI. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 6963–6973
- 79 Escher BI, van Daele C, Dutt M, Tang JYM, Altenburger R. *Environ Sci Technol*, 2013, 47: 7002–7011
- 80 Escher BI, Dutt M, Maylin E, Tang JYM, Toze S, Wolf CR, Lang M. *J Environ Monit*, 2012, 14: 2877–2885
- 81 Knight AW, Little S, Houck K, Dix D, Judson R, Richard A, McCarroll N, Akerman G, Yang C, Birrell L, Walmsley RM. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 55: 188–199
- 82 Qu GB, Shi JB, Jiang GB. *Prog Chem*, 2011, 23: 2389–2398
- 83 Bandow N, Altenburger R, Lübcke-von Varel U, Paschke A, Streck G, Brack W. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 3891–3896
- 84 Rotter S, Gunold R, Mothes S, Paschke A, Brack W, Altenburger R, Schmitt-Jansen M. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 10048–10056
- 85 Qi H, Li H, Wei Y, Mehler WT, Zeng EY, You J. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 6414–6421
- 86 van Gestel CAM, de Lima E Silva C, Lam T, Koekkoek JC, Lamoree MH, Verweij RA. *Ecotoxicology*, 2017, 26: 320–328
- 87 Schmitt C, Vogt C, Machala M, de Deckere E. *Environ Sci Pollut Res*, 2011, 18: 1398–1404
- 88 Inostroza PA, Massei R, Wild R, Krauss M, Brack W. *Environ Pollut*, 2017, 231: 339–347
- 89 Higley E, Grund S, Jones PD, Schulze T, Seiler TB, Lübcke-von Varel U, Brack W, Wölz J, Zielke H, Giesy JP, Hollert H, Hecker M. *Environ Toxicol Chem*, 2012, 31: 1053–1062
- 90 Legler J, van Velzen M, Ceniñ PH, Houtman CJ, Lamoree MH, Wegener JW. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 8552–8558
- 91 Marić P, Ahel M, Senta I, Terzić S, Mikac I, Žuljević A, Smital T. *Chemosphere*, 2017, 174: 643–654
- 92 Blanck H, Wängberg SÅ. *Can J Fish Aquat Sci*, 1988, 45: 1816–1819
- 93 Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, Cheung CYJ, Mateus R, Healey D, Kim S, Werdich AA, Haggarty SJ, Macrae CA, Shoichet B, Peterson RT. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 231–237

- 94 Tufi S, Leonards P, Lamoree M, de Boer J, Legler J, Legradi J. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 3222–3230
- 95 Kawanishi M, Takamura-Enya T, Ermawati R, Shimohara C, Sakamoto M, Matsukawa K, Matsuda T, Murahashi T, Matsui S, Wakabayashi K, Watanabe T, Tashiro Y, Yagi T. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6424–6429
- 96 Liao W, Draper WM, Perera SK. *Anal Chem*, 2008, 80: 7765–7777
- 97 Ehrenhauser FS, Wornat MJ, Valsaraj KT, Rodriguez P. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 1351–1357
- 98 Schymanski E, Schulze T, Hermans J, Brack W. Computer tools for structure elucidation in effect-directed analysis. In: Brack W, Ed. *Effect-directed Analysis of Complex Environmental Contamination. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 15*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 167–198
- 99 Schymanski EL, Bataineh M, Goss KU, Brack W. *TrAC Trends Anal Chem*, 2009, 28: 550–561
- 100 Booiij P, Vethaak AD, Leonards PEG, Sjollem SB, Kool J, de Voogt P, Lamoree MH. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 8003–8011
- 101 Byer JD, Siek K, Jobst K. *Anal Chem*, 2016, 88: 6101–6104
- 102 Liu Y, Pereira ADS, Martin JW. *Anal Chem*, 2015, 87: 4260–4268
- 103 D'Agostino LA, Mabury SA. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 121–129
- 104 Gallampos CMJ, Schymanski EL, Bataineh M, Buchinger S, Krauss M, Reifferscheid G, Brack W. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 9101–9112
- 105 Krauss M, Singer H, Hollender J. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 943–951
- 106 Mao Y. Application of FT-ICR mass spectrometry in study of proteomics, petroleomics and fragmentomics. *Dissertation for the Doctoral Degree*. Tallahassee, FL: The Florida State University, 2013
- 107 Brack W, Kind T, Hollert H, Schrader S, Möder M. *J Chromatogr A*, 2003, 986: 55–66
- 108 ABSciex. Advance Discovery with High Resolution LC-MS. <https://sciex.com/products/mass-spectrometers/qtof-systems/tripletof-systems/tripletof-6600-system>. Accessed on 2018-03-08
- 109 Waters. MSE is the ultimate technology for comprehensive, reproducible profiling and characterization. http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10205700&alias=Alias_mse_INS&locale=en_GB. Accessed on 2018-03-20
- 110 Herrmann A, Rebensburg S, Helfer M, Schindler M, Brack-Werner R. *Retrovirology*, 2016, 13: 69
- 111 Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. *Nat Methods*, 2015, 12: 523–526
- 112 Moran D, Cross T, Brown LM, Colligan RM, Dunbar D. *J Virol Methods*, 2014, 195: 9–17
- 113 Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: O111.016717
- 114 Pieke E, Heus F, Kamstra JH, Mladic M, van Velzen M, Kamminga D, Lamoree MH, Hamers T, Leonards P, Niessen WMA, Kool J. *Anal Chem*, 2013, 85: 8204–8211
- 115 Escher BI, Neale PA, Leusch FDL. *Water Res*, 2015, 81: 137–148
- 116 Jonker W, Zwart N, Stöckl JB, de Koning S, Schaap J, Lamoree MH, Somsen GW, Hamers T, Kool J. *Talanta*, 2017, 168: 162–167
- 117 Meinert C, Moeder M, Brack W. *Chemosphere*, 2007, 70: 215–223
- 118 Eyres GT, Urban S, Morrison PD, Dufour JP, Marriott PJ. *Anal Chem*, 2008, 80: 6293–6299
- 119 Jonker W, Clarijs B, de Witte SL, van Velzen M, de Koning S, Schaap J, Somsen GW, Kool J. *J Chromatogr A*, 2016, 1462: 100–106
- 120 Zwart N, Nio SL, Houtman CJ, De JB, Kool J, Hamers T, Lamoree MH. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 4367–4377
- 121 Lübcke-von Varel U, Streck G, Brack W. *J Chromatogr A*, 2008, 1185: 31–42
- 122 国家自然科学基金委员会. 2015年度报告. <http://www.nsf.gov.cn/nsfc/cen/ndbg/2015ndbg/05/052.html>. Accessed on 2018-03-20
- 123 Escher BI, Allinson M, Altenburger R, Bain PA, Balaguer P, Busch W, Crago J, Denslow ND, Dopp E, Hilscherova K, Humpage AR, Kumar A, Grimaldi M, Jayasinghe BS, Jarosova B, Jia A, Makarov S, Maruya KA, Medvedev A, Mehinto AC, Mendez JE, Poulsen A, Prochazka E, Richard J, Schifferli A, Schlenk D, Scholz S, Shiraishi F, Snyder S, Su G, Tang JYM, van der Burg B, van der Linden SC, Werner I, Westerheide SD, Wong KKC, Yang M, Yeung BHY, Zhang X, Leusch FDL. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 1940–1956

Effect-directed analysis in environment research: current status and future challenges

Qianchi Ma^{1,2}, Yanna Liu^{1,2}, Jianbo Shi^{1,2}, Guangbo Qu^{1,2*}, Guibin Jiang^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: gbqu@rcees.ac.cn)

Abstract: The increasingly severe chemical pollution poses treats to environmental and human health. Effect-directed analysis (EDA), based on a combination of biotesting, sample fractionation and chemical identification and quantification, is a powerful tool for identification of environmental toxicants in complex chemical mixtures in the environment. This review summarized recent advances in EDA, including sample extraction and fractionation, biological tests and chemical identification. The application of high throughput screening in EDA was discussed and challenges in future studies were also identified.

Keywords: effect-directed analysis, pollutant identification, bioassay, toxicity screening, composition effect, high-throughput screening

doi: [10.1360/N032018-00092](https://doi.org/10.1360/N032018-00092)