

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

团 体 标 准

T/CSES XXXX—XXXX

场地土壤污染物人体暴露组解析技术规范 总纲

Technical specification for exposome analysis of human exposure to soil
contaminants from sites general principles

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国环境科学学会 发布

目 次

前 言	III
引 言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 暴露组解析	1
3.2 内源性代谢物	2
3.3 暴露生物标志物	2
3.4 目标物分析	2
3.5 可疑目标筛查	2
3.6 非目标筛查	2
4 总则	2
4.1 基本原则	2
4.2 工作程序	2
5 初步调查	4
5.1 调查启动	4
5.2 资料收集	4
5.3 现场踏勘	4
5.4 人员访谈	4
5.5 初步调查结果分析	4
6 场地调查	4
6.1 场地调查方案的制定	4
6.2 调查区域的选择	5
6.3 采样点布设与环境样品采集	5
6.4 环境样品分析	5
6.5 健康风险评估	6
7 人群调查	7
7.1 人群调查方案的制定	7
7.2 调查人群的选择	7
7.3 生物样品采集	7
7.4 问卷调查和体格检查	8
7.5 生物样品分析	8
8 暴露生物标志物的确定	9
8.1 回归分析	9
8.2 综合判断	10
9 质量控制	10
9.1 总体要求	10

9.2 样品采集、保存、运输与实验室分析.....	11
9.3 数据审核与处理.....	11
10 报告编制.....	11
附录 A （资料性） 常见场地类型及特征污染物.....	12
附录 B （资料性） 人体血液和尿液中金属的分析方法.....	14
B.1 适用范围.....	14
B.2 方法原理.....	15
B.3 实验试剂与材料.....	15
B.4 仪器和设备.....	15
B.5 样品前处理.....	16
B.6 仪器分析.....	16
B.7 标准系列的配制.....	16
B.8 试样测定.....	17
B.9 试验数据处理.....	17
B.10 精密度和准确度.....	17
B.11 质量控制.....	19
B.12 说明.....	19
附录 C （资料性） 人体血液和尿液中污染物及其代谢物可疑/非目标筛查分析方法.....	20
C.1 适用范围.....	20
C.2 实验原理.....	20
C.3 试剂与材料.....	20
C.4 仪器与设备.....	22
C.5 样品.....	23
C.6 仪器分析.....	24
C.7 试验数据处理.....	24
C.8 精密度和准确度.....	25
C.9 质量保证和控制.....	26
附录 D （资料性） 人体血液和尿液中内源性代谢物非靶向筛查分析方法.....	28
D.1 适用范围.....	28
D.2 实验原理.....	28
D.3 试剂与材料.....	28
D.4 仪器与设备.....	28
D.5 样品.....	28
D.6 试验步骤.....	28
D.7 试验数据处理.....	29
D.8 质量保证和控制.....	29

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东工业大学提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：广东工业大学、生态环境部华南环境科学研究所、中国科学院广州地球化学研究所、华中科技大学、中国科学院生态环境研究中心、复旦大学。

本文件主要起草人：安太成、罗伟铿、麦碧娴、郑晶、高艳蓬、李桂英、沈先涛、蔡亚岐、严骁、徐燕意、唐斌。

引 言

随着我国工业化进程的加快，工业企业在生产、关停、搬迁过程中形成了大量污染场地，对周边人群健康造成潜在影响。

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国土壤污染防治法》和《土壤污染防治行动计划》，规范和指导场地土壤污染物暴露标志物筛选工作，推进场地环境保护监督管理技术的创新、示范和推广，开展暴露组解析并获得暴露生物标志物，评估场地污染物对人体健康风险，特制定场地土壤污染物人体暴露组解析技术规范系列文件。本系列文件分为总纲和不同工业行业场地土壤污染物暴露组解析技术规范。

场地土壤污染物人体暴露组解析技术规范 总纲

1 范围

本文件规定了场地土壤污染物人体暴露组解析的基本原则、工作程序、内容方法和质量控制等技术要求。

本文件适用于我国工业企业在生产、关停、搬迁过程中形成的污染场地中土壤污染物（仅限化学污染物）暴露人群的暴露组解析工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 3095 环境空气质量标准
- GB 36600 土壤环境质量建设用地土壤污染风险管控标准(试行)
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 16126 生物监测质量保证规范
- GBZ 159 工作场所空气中有害物质监测的采样规范
- HJ 25.1 建设用地土壤污染状况调查技术导则
- HJ 25.2 建设用地土壤污染风险管控和修复监测技术导则
- HJ 25.3 建设用地土壤污染风险评估技术导则
- HJ/T 91.2 地表水环境质量监测技术规范
- HJ 164 地下水环境监测技术规范
- HJ/T 167 室内环境空气质量监测技术规范
- HJ 194 环境空气质量手工监测技术规范
- HJ 605 土壤和沉积物 挥发性有机物的测定 吹扫捕集/气相色谱-质谱法
- HJ 630 环境监测质量管理技术导则
- HJ 834 土壤和沉积物 半挥发性有机物的测定 气相色谱-质谱法
- HJ 839 环境与健康现场调查技术规范 横断面调查
- HJ 875 环境污染物人群暴露评估技术指南
- HJ 1111 生态环境健康风险评估技术指南 总纲
- NY/T 398 农、畜、水产品污染监测技术规范
- DB 11/T 1278 污染场地挥发性有机污染物调查与风险评估技术导则
- DB 50/T 725 场地环境调查与风险评估技术导则
- 《健康体检管理暂行规定》（卫医政发【2009】77号）
- 《医疗机构临床实验室管理办法》（卫医发【2006】73号）

3 术语和定义

HJ 25.3、HJ 682和DB 50/T 725界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

暴露组解析 *exposome analysis*

通过对场地中环境影响和人群相关生物反应的累积测量，分析场地及人群暴露特征，并利用统计学方法筛选人群暴露生物标志物的过程。

3.2

内源性代谢物 endogenous metabolites

机体物质和能量代谢过程中所形成的代谢产物或中间产物。

3.3

暴露生物标志物 exposure biomarkers

反映机体组织、体液或排泄物中的外源化学物质或其代谢产物或其与内源性物质相互作用产物数量的指标。可用于评估体内负荷剂量或靶剂量，提供机体暴露于外源化学物质的信息。

3.4

目标物分析 target analysis

已知目标物的化学结构信息、且能够获得标准品，根据标准品的保留时间以及前体离子和产物离子的准确质荷比来实现目标物的定性和定量分析。

3.5

可疑目标筛查 suspect screening

已知分析物的化合物信息（如分子式、化学结构和理化性质），但尚未有参考标准品，通过高分辨质谱获得化合物前体离子同位素组成以及质谱碎片信息确定化合物分子式和结构信息，结合谱库比对，实现对潜在的目标化合物筛查鉴定及半定量分析的方法。

3.6

非目标筛查 non-target screening

针对未知分子式、化学结构和理化性质等信息质，且尚未有参考标准品的分析物，通过对高分辨质谱获得的化合物前体离子同位素组成以及质谱碎片信息进行鉴定，确定化合物分子式和结构信息，实现对潜在的目标化合物定性分析的方法。

4 总则

4.1 基本原则

4.1.1 系统性

充分考虑初步调查、场地调查、人群调查、暴露生物标志物筛选等各环节之间的衔接性，确保解析结果的协调性、一致性和可靠性。

4.1.2 全面性

广泛收集信息，综合考虑潜在土壤污染物种类、暴露情景、人体代谢转化机制等因素，保证采集样品类型的适用性及筛查污染物的全面性。

4.1.3 代表性

以程序化和系统化的方式规范调查过程，保证环境样品和人群样本具有代表性，获得的暴露生物标志物可最大程度反映场地土壤污染特征。

4.1.4 可行性

在满足场地调查、人群调查等各阶段监测要求和调查目的的条件下，综合考虑调查方法、监测成本、技术应用水平等因素，保证调查过程切实可行。

4.2 工作程序

场地土壤污染物人体暴露组解析可分为初步调查、场地调查、人群调查、暴露生物标志物筛选和报告编制5个阶段，工作程序如图1所示。

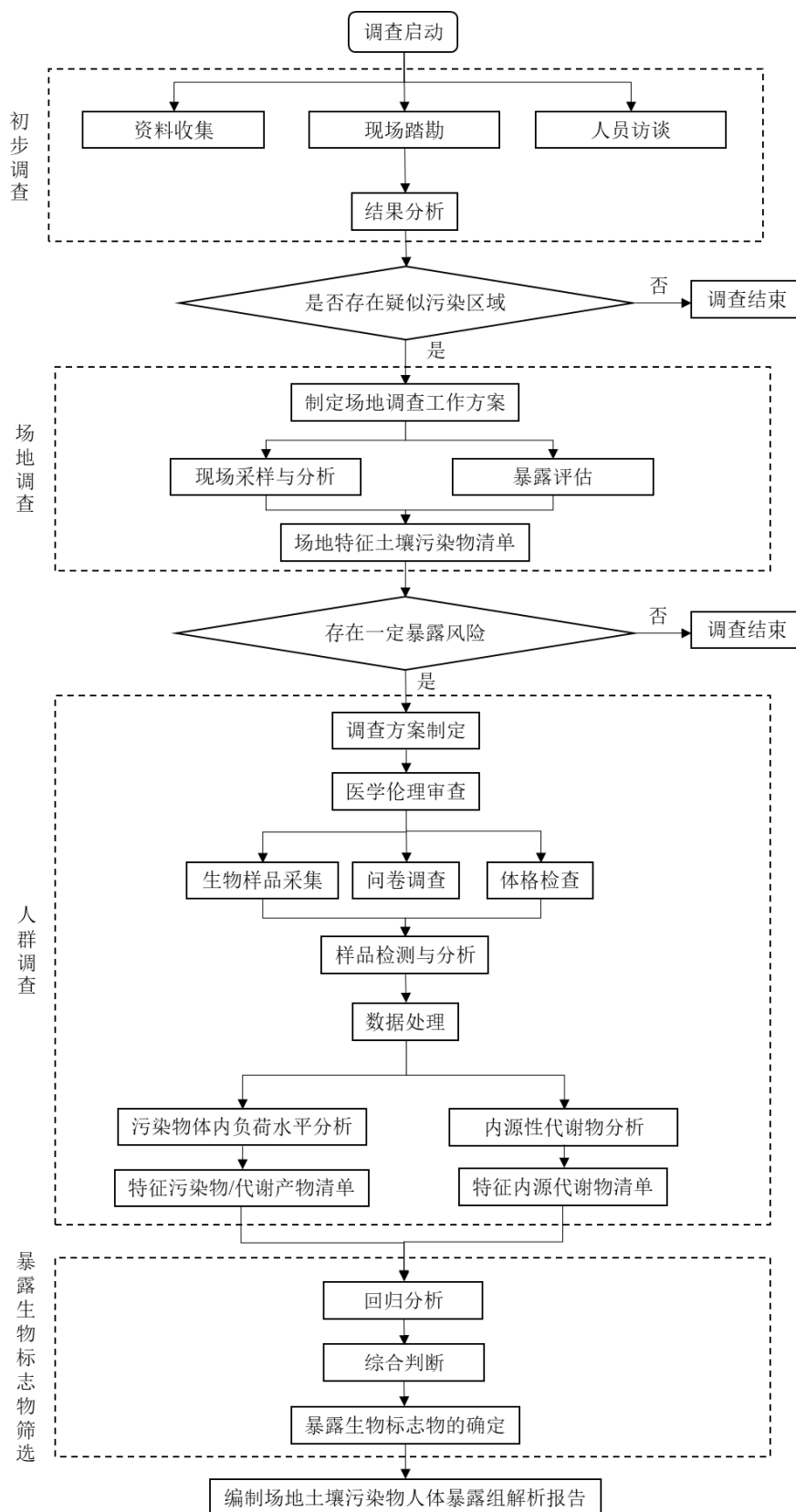


图 1 解析程序

5 初步调查

5.1 调查启动

根据已有资料，判定场地土壤存在污染且可能具有健康风险时，可启动初步调查。

5.2 资料收集

5.2.1 自然和社会信息资料

场地及周边区域的自然信息资料包括地理位置、地形、地貌、土壤、水文和气象资料、卫星遥感图像、航空图像或测绘图等；社会信息资料包括人口密度及分布，敏感目标分布、土地利用方式、经济社会发展状况和规划、国家和地方政策、法规与标准等。

5.2.2 土地利用历史及环境资料

场地利用变迁过程中的场地内建筑物、设施等的变化情况，场地及周边区域的土地使用、规划及环境污染相关资料（用来辨识场地及相邻区域开发及活动状况的航片或卫星图片、区域环境保护规划、生态和水源保护区规划，土地利用规划、水文地质勘察报告、区域环境监测与风险评估报告、场地建设及拆除记录、新闻报道和公众通知等），以及其它有助于评价场地状况的历史资料。

5.2.3 工业污染资料

场地及周边区域当前及历史工业企业的行业类型，产品、原辅材料和中间体清单及生产使用量、工艺流程图、平面布置图、各类储存设施及管网分布资料、环保设施分布及使用情况、“三废”排放状况及去向等，以及相关工业企业的环境影响评价报告书或报告表、清洁生产审核报告、排污许可及排放记录、污染治理设施运行状况记录、环境污染事故记录、企业环境管理文件、职工健康评估报告、环保投诉等文件或文字资料。

5.3 现场踏勘

在资料收集和初步分析的基础上，通过现场踏勘进一步了解场地及周边区域的现状和历史情况，以及敏感目标的分布和暴露人群的特征。现场踏勘的范围、方法、主要内容及重点参照HJ 25.1和HJ 839。

5.4 人员访谈

对资料收集与现场踏勘所涉及的疑问，通过访谈形式进行信息补充和资料考证。具体访谈对象、方法、内容整理等要求参照HJ 25.1。

5.5 初步调查结果分析

对经收集、踏勘和访谈获得的资料信息进行分析，明确场地内及周边区域有无可能的污染源，并进行不确定性分析。若有可能的污染源，说明可能的污染类型、污染状况和来源，提出目标暴露人群，明确是否需要开展场地调查。判断需开展场地调查宜同时满足以下条件：

- a) 场地当前或历史上存在化学污染来源；
- b) 场地存在土壤污染区域和暴露人群；
- c) 根据掌握资料，可初步判断存在的场地土壤污染物类型；
- d) 从现有流行病学调查、毒理学研究等资料可初步判断该场地污染具有潜在健康风险。

6 场地调查

6.1 场地调查方案的制定

根据初步调查结论制定场地调查方案，内容包括调查目的、调查周期、调查区域、采样点布设、样品采集、保存、运输、实验室分析、数据处理、质量控制等。通过场地调查，确定场地存在污染物种类、浓度（程度）和空间分布，识别场地特征污染物的人群暴露情景和暴露途径，评估健康风险。

6.2 调查区域的选择

6.2.1 污染区的确定

- a) 综合分析场地土壤污染物的来源特征、迁移转化、暴露途径和人群分布等，确定污染区的范围。污染区包括场地及以场地为中心的周边潜在污染区域。
- b) 根据土地使用功能，宜进一步将场地内划分为生产区、办公区、生活区分区，其中生产区考虑生产工艺、构筑物及可能存在的污染物分布差异可划分为不同生产单元。

6.2.2 对照区的确定

设置调查对照区，要求对照区不存在场地潜在特征土壤污染物相关污染源，与污染区具有类似的自然条件、社会经济状况和人口基本特点，且居住人群相对稳定，满足后续人群调查的要求。

6.3 采样点布设与环境样品采集

6.3.1 污染区和对照区应分别布设采样点，污染区的点位布设应尽量涵盖所有分区单元。场地常年季风下风向及重要居民区应加密布点，且采样点应远离交通干道，并结合污染物、构筑物和土壤特征进行布设。污染区与对照区的样本量宜保持一致或接近。

6.3.2 采集的环境介质主要为土壤，必要时可包括环境水体、环境空气、室内积尘、农作物和土壤气等。

- a) 土壤：采样点的布设方法包括系统随机布点法、系统布点法和分区布点法，点位布设原则和采样方法参照 HJ 25.2 执行，一般开展一期调查。
- b) 环境水体：对污染较重的场地，当地下水或地表水为饮用水源，可考虑开展地下水或地表水监测，地下水和地表水监测点位布设与样品采集、保存和流转宜分别参照 HJ/T 164 和 HJ/T 91.2 执行，一般根据实际情况分别在枯水期、丰水期和平水期开展调查。
- c) 环境空气：当污染场地的工业企业为在产，且排放废气中存在特征污染物时，可考虑开展环境空气监测。采样类型包括室内、室外和工作场所，采样点的布设与样品采集可分别参考 HJ/T 167、HJ 194 和 GBZ 159 执行，一般开展冬、夏两季调查。
- d) 室内积尘：当污染场地的工业企业为在产，且排放废气中存在特征污染物时，可考虑开展室内积尘监测。包括污染区工作场所和周边居民家庭、以及对照区居民家庭的灰尘样品，点位布设和样品采集参照 HJ 839 执行，点位布设和采样频次与室内空气调查保持一致。
- e) 农作物：当污染区存在农用地土壤且主要为自产自食时，可考虑开展农作物调查。根据当地膳食结构及食用频率确定调查主要农作物种类，每种农作物不少于 6 个样品。以土壤采样为采样单元，采集对应粮食、蔬菜等主要农产品，种植农作物应与土壤样品同步采集，样品采集、保存、运输及质量控制参照 NY/T 398 执行。
- f) 土壤气：初步调查判断场地可能存在挥发性有机物等可以气态形式赋存于土壤气中的污染物时，可结合土壤、地下水采样点的布置，设置监测井对土壤气进行采样调查，土壤气监测井的设置、样品采集、保存等环节的技术要求参照 DB11/T 1278 执行。

6.4 环境样品分析

6.4.1 根据初步调查确定的场地潜在污染源及土壤污染物，同时考虑污染物的迁移转化规律，制定样品分析方案。常见场地类型及特征污染物见附录 A。

6.4.2 可疑目标筛查和非目标筛查。为获得调查区域内土壤污染的总体信息，宜结合色谱-高分辨质谱定性分析等可疑/非目标筛查手段对潜在有机污染物进行分析，筛选判断场地特征污染物及/或其分解产物。土壤中挥发性有机物和半挥发性有机物筛查的前处理及分析方法分别参照 HJ605 和 HJ 834，宜根据不同场地中潜在污染物的特性差异进行优化，提高筛查的灵敏度。

- a) 本地化筛查数据库构建。宜根据场地调查获得的土壤污染物清单和文献调研，结合化合物标准品和开源数据库（如 METLIN、T3DB、PubChem 等），建立包含化合物信息的本地化筛查数据库。
- b) 谱图预处理。环境样品气相或液相色谱-高分辨质谱（GC/LC-HRMS）全扫描数据采用开源软件（如 XCMSonline 等）批量提取数据特征并预处理，具体包括峰提取、峰筛选、峰对齐、背景峰扣除和数据优选等过程。
- c) 差异峰识别。结合不同行业场地特征污染物类型，选择合适的内标以标准化各特征峰面积，获得目标物的相对响应值。采用变异倍数分析（Fold Change Analysis, FC Analysis）、T 检验/非参数检验等单变量统计方法，提取污染区显著高于对照区的差异特征峰。
- d) 差异峰鉴定。将筛选获得的差异特征峰数据导入本地化数据库及在线开源的质谱信息数据库（如 mzCloud、MassBank、ChemSpider 等）进行匹配和鉴定，获得对应化合物名称。化合物鉴定按其可信度共分为 5 个等级，如表 1 所示。

表 1 化合物鉴定可信度等级划分

可信度等级	数据质量要求
L1	化合物精确质量、二级碎片与数据库匹配，且经标准品质谱库验证、确定化学结构
L2	化合物精确质量、二级碎片与数据库匹配，但未经标准品质谱库验证，化学结构不确定
L3	未达到 L1 和 L2 级置信度，但采用结构相似性算法，通过在线分子式库匹配的化合物
L4	仅化合物精确质量或分子式与数据库匹配的
L5	仅提取特征峰，未匹配化合物精确分子量和结构

6.4.3 目标物分析。对筛查获得的场地特征污染物及/或其分解产物、其它根据已有资料判断需重点关注的目标污染物、金属元素等，可采用定量分析方法获得其定量浓度。

- a) 环境样品中目标物的分析宜优先采用国家、地方和行业相关标准。标准中未涵盖目标物的分析可采用经验证的实验室自建方法。土壤样品分析方法参照 GB 36600 和 HJ 834 执行；地表水、地下水、环境空气、农作物和土壤气样品中目标物的分析检测参照 HJ/T 91.2、HJ 164、GB 3095、HJ 194、NY/T 398 和 DB 11/T 1278 执行，室内积尘样品的分析检测可参照土壤样品分析方法进行优化。
- b) 对环境样品中检出的目标污染物浓度水平进行统计描述，预处理和数据质量评价。根据数据特征采用 T 检验/非参数检验进行组间比较，对于污染区显著高于对照区的化合物（ $p < 0.05$ ），经判断其合理性后作为场地特征污染物保留。

6.4.4 整理调查信息和调查结果，评估数据的质量，分析数据的有效性和充分性，以及结果的可靠性，确定是否需要补充采样分析。根据环境介质中污染物定性和定量分析结果，对获得的污染区显著高于对照区的化合物进行分析评判，提出场地关注污染物清单，以及污染物分布特征等信息。

6.5 健康风险评估

6.5.1 暴露评估

采用暴露情景评价法进行人群暴露评估。分析场地关注污染物经由不同途径迁移和到达受体人群的情景，计算受体人群在不同暴露情景下对应的暴露量。

a) 根据评估目的，通过情景分析确定人群暴露于关注污染物的暴露情景，具体技术要求参照 HJ 1111 执行。接触不同污染物类型、不同分区、不同生产单元的人群宜分组进行暴露情景识别。

b) 土壤和地下水暴露途径的确定、暴露量的计算和暴露参数获取的技术要求参照 HJ 25.3 执行，其中生产区内人群参照第二类用地，非生产区内人群参照第一类用地。地表水、环境空气、室内积尘、农作物暴露途径的确定、暴露量的计算和暴露参数获取的技术要求参照 HJ 875 执行。

6.5.2 风险表征

场地关注污染物的毒性效应分析、毒性参数获取、风险计算、不确定性分析的技术要求参照HJ 25.3和HJ 1111执行。

6.5.3 风险判断

根据评估结果判断是否存在人群健康风险。若存在则开展人群调查，若不存在或暴露风险可忽略则结束调查。

7 人群调查

7.1 人群调查方案的制定

根据场地土壤污染物清单中污染物特点及其暴露途径，识别潜在体内负荷污染物及其代谢产物，制定人群调查方案。人群调查方案包括调查人群选择、人数确定、抽取调查人群的方法、问卷调查、体格检查、健康状况调查、污染物体内负荷水平分析、内源性代谢物分析等内容。在开展人群调查前，应组织开展医学伦理审查并取得知情同意。

7.2 调查人群的选择

7.2.1 调查人群的确定

充分考虑场地土壤特征污染物的敏感人群和高暴露人群，确定调查人群。调查人群可分为高暴露人群（该场地内污染企业工人）、一般暴露人群（污染区非职业暴露居民）和对照人群（对照区非职业暴露居民）。

- a) 根据高暴露人群工种差异、一般暴露人群居住地污染状况等信息，可进一步在组内细分不同暴露等级的人群分组。
- b) 暴露人群和对照人群宜在当地居住不少于3年，且每年居住时间不少于6个月，污染区人群与对照区人群的空间采样要求宜参考不同的环境介质采样布点要求，选择近距离居住人群。

7.2.2 调查人数的确定

可按公式(1)分别计算职业暴露工人、污染区和对照区所需调查人数。每组的调查人数不宜小于50人，对照区调查人数宜与污染区一致或接近。

$$N = \frac{Z_{\alpha}^2 \times S^2}{d^2} \quad (1)$$

式中：

N ——调查人数；

Z_{α} ——统计学上标准正态分布的 Z 值；

S ——总体标准差的估计值；

d ——允许误差。

7.2.3 调查人群的抽取方法

分别对不同组别人群进行抽样，具体抽取方法和程序参照HJ 839。组内调查人群宜尽量涵盖不同暴露等级的人群分组。

7.3 生物样品采集

7.3.1 生物样品的采集宜综合考虑污染物筛查、内源性代谢物分析、生化指标及特征效应指标检测所需要的生物样品类型、用量及采集储存方式，统筹安排并同时采集。

7.3.2 一般选择血液、尿液、毛发、指甲等人体生物材料开展污染物体内负荷水平分析和内源性代谢物分析。人体生物材料的选择、采集时间、采集量、采集方式、保存与运输条件的具体操作参照 GB/T 16126 执行。

7.4 问卷调查和体格检查

7.4.1 问卷调查

采集生物样品的同时，对调查人群开展问卷调查，问卷应包括基本情况、行为生活方式、职业相关情况、环境相关情况、患病史情况、最近三个月身体状况等内容。

7.4.2 体格检查及健康状况调查

根据场地土壤污染物可能引起的健康效应，选择相关指标对调查人群开展体格检查和健康状况调查，内容可包括症状和体征检查、影像学检查、生化指标及特征效应指标检测等。体格检查实验室及操作要求应符合《健康体检管理暂行规定》及《医疗机构临床实验室管理办法》相关规定。

7.5 生物样品分析

7.5.1 污染物体内负荷水平分析

7.5.1.1 结合生物样品类型和场地土壤污染物特征，宜综合采用目标物分析、可疑目标筛查和非目标筛查方法对潜在体内负荷污染物及其代谢产物进行分析。

7.5.1.2 可疑目标筛查和非目标筛查。在考虑场地关注污染物清单的基础上，为获得调查人群污染物体内负荷的总体信息，宜结合色谱-高分辨质谱定性分析等可疑/非目标筛查手段对潜在有机污染物进行分析，筛选人体生物样品中的特征污染物及/或其代谢产物。血液和尿液样品可疑目标筛查和非目标筛查方法见附录 C。

- a) 结合场地调查获得的场地关注污染物清单和文献调研，推导行业场地人群生物样品中可能的特征污染物及/或其代谢产物；在 6.4.3 (a) 所构建数据库的基础上，补充扩展代谢产物信息，建立包含场地特征污染物及其代谢产物分子结构信息的本地化筛查数据库。
- b) 谱图预处理、差异峰识别和差异峰鉴定的具体流程见 6.4.3 (b)。

7.5.1.3 目标物分析。对筛查获得的人群特征污染物及/或其代谢产物、其它根据已有资料或场地关注污染物清单判断需重点关注的目标物、金属元素等，可采用定量分析方法获得其定量浓度。

- a) 目标物的分析宜优先采用国家、地方和行业相关标准。标准中未涵盖目标物的分析可采用经验证的实验室自建方法。人体血液和尿液中金属元素的分析方法见附录 B。
- b) 对暴露人群和对照人群检出的目标污染物浓度水平进行统计描述，预处理和数据质量评价。根据数据特征采用 T 检验/非参数检验进行组间比较，对于暴露人群显著高于对照人群的化合物 ($p < 0.05$)，经判断其合理性后作为特征污染物保留。

7.5.1.4 整理调查信息和调查结果，评估数据的质量，分析数据的有效性和充分性，以及结果的可靠性，确定是否需要补充采样分析。根据生物样品中污染物定性和定量分析结果，对获得的暴露人群显著高于对照人群的化合物进行分析评判，提出特征体内负荷污染物及/或其代谢产物清单。

7.5.2 内源性代谢物分析

7.5.2.1 根据生物样品和目标代谢物类型，确定内源性代谢物分析方案；宜采用血液和/或尿液，目标物类型可包括糖类代谢物、脂类代谢物、氨基酸类代谢物、核苷酸类代谢物等，分析技术可采用质谱和核磁共振等。基于液相色谱-高分辨质谱的血液和尿液中多种内源性代谢物非目标分析流程见附录 D。

7.5.2.2 对内源性代谢物分析所获原始数据文件（包含质控样本和检测样本），根据目标物的类型及对应仪器分析技术的要求，结合仪器自带软件开展数据清理、质量评价、标准化等处理。

- a) 缺失值过滤及填充：根据样本或分组内缺失值的比例，进行数据过滤。对于未被过滤的缺失值，需进行模拟填充，主要方法有极小值、中位数（适合偏态分布）、平均值（适合正态分布）、随机森林、最大期望值和补零。
- b) 数据归一化：常用数据归一化方法有中位数、平均数、总和、指定样本和内参。
- c) 质控样本验证：计算某个离子在质控样本中的 RSD（标准差/均值），一般 RSD > 30% 的变量在实验过程中波动较大，不参与差异定量分析。
- d) 数据转换：数据通过转化为正态分布或者高斯分布，以满足后续统计分析需求。

- e) 样本比较分析: 根据内源性代谢物在不同样本间的表达情况, 对样本的进行相关性分析和 PCA 主成分分析, 评价组内样本的相似性和组间样本的差异性。相关系数越接近于 1, 表明代谢物在样本间的表达量相似度越高, 即样本间相关性越好。根据 PCA 结果找出离群点进行样品信息核对, 并结合问卷调查数据进行合理性分析, 剔除显著异常数据或样品。
- 7.5.2.3 使用多变量化学计量学方法衡量和验证各离子对各组样本分类判别的影响强度和解释能力, 挖掘具有生物学意义的差异离子, 并通过进一步结构鉴定得到特征内源性代谢物。

- a) 差异离子的筛选: 采用随机森林 (Random Forest)、线性支持向量 (SVM) 和偏最小二乘法 (PLS-DA) 等算法区分污染区人群和对照区人群, 并根据 VIP 评分 (PLS-DA)、精度下降 (Random Forest) 或加权系数 (SVM) 来评价每个离子的重要性。对分组贡献较大的离子组合进行 ROC 分析, 计算区分效果 (AUC) 值, 根据 AUC 值选取最优的离子组合。
- b) 差异离子的鉴定: 对于非靶向代谢组学分析技术, 可进一步对差异离子进行靶向验证和结构鉴定。通过与本地数据库或开源数据库 (HMDB、PubChem 等) 中代谢物的保留时间、分子质量 (分子质量误差在 <10 ppm 内)、二级碎裂谱图、碰撞能等信息进行匹配, 对生物样本中的代谢物进行结构鉴定 (具体流程参考 6.4.3 (d)), 并对鉴定结果进行严格的人工二次核对、确认, 确定特征内源性代谢物。利用 KEGG 等数据库获得特征内源性代谢物的生物学信息、分析代谢通路, 评估污染场地暴露对人体代谢网络的影响。

8 暴露生物标志物的确定

8.1 回归分析

8.1.1 以特征内源性代谢物等健康效应指标为因变量, 特征污染物为自变量, 采用回归模型定量分析场地特征污染物暴露与健康效应指标之间的关联。考虑研究对象的人口学特征 (如年龄、性别、文化水平、BMI 等)、行为活动情况 (如饮食、吸烟、饮酒、运动习惯等)、健康因素情况 (如职业暴露史、既往患病情况、家族史、就医行为等) 的影响, 作为协变量纳入关联分析。自变量、因变量和协变量的选取应有科学依据及生物学理论基础。根据变量类型选取场地特征污染物与健康效应指标的关联分析方法, 并采用错误发现率 (false discovery rate, FDR) 对显着相关性进行多重验证。一般认为 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

8.1.1.1.1 当因变量 (y) 为计量变量, 符合正态分布或数据转换后符合正态分布, 采用简单线性回归或多重线性回归。简单线性回归方程与多重线性回归方程分别采用公式 (2) 与公式 (3)。

$$Y = b_0 + b_1 X + \varepsilon \quad (2)$$

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_m X_m + \varepsilon \quad (3)$$

式中:

$X_1 \sim X_m$ ——自变量, 可以为计量变量、有序分类变量或二分类变量;

b_0 ——常数项的估计值;

$b_1 \sim b_m$ ——偏回归分析系数的估计值;

m ——自变量个数;

ε ——去除自变量对 y 影响后的随机误差, 通过计算机软件完成迭代算法得到。

8.1.1.1.2 当因变量 (y) 为二分类变量, 或为计量变量但经数据转换后仍不符合正态分布, 采用 Logistic 回归。人群设计未匹配且健康效应指标多为二分类变量或可转换成二分类变量, 宜使用非条件的二元 Logistic 回归模型分析特征污染物对健康效应结局指标的影响。

即因变量 (y) 为二分类变量, 可采用二分类 Logistic 回归; 如果因变量为计量变量, 也可将因变量转换成二分类变量, 再采用二分类 Logistic 回归。回归方程采用公式 (4)。

$$P = e^{b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_m X_m} / (1 + e^{b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_m X_m}) \quad (4)$$

式中：

P ——出现y的概率；

E ——自然数；

$x_1 \sim x_m$ ——自变量，可以为计量变量、有序分类变量或二分类变量；

b_0 ——为常数项的估计值；

$b_1 \sim b_m$ ——为偏回归分析系数的估计值，通过计算机软件完成迭代算法得到；

m ——自变量个数。

8.1.1.1.3 当因变量（y）为计数变量，且符合均值为 λ 的Poisson分布，采用Poisson回归。常见的Poisson回归模型包括相加模型和相乘模型，相加模型适用于各影响因素对y的影响是叠加的情况，相乘模型适用于各影响因素对y的影响是呈指数相乘的情况。相加模型回归方程与相乘模型回归方程采用公式（5）与公式（6）。

$$\lambda = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \cdots + b_mx_m \quad (5)$$

$$\lambda = e^{b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \cdots + b_mx_m} \quad (6)$$

式中：

$x_1 \sim x_m$ ——自变量，可以为计量变量、有序分类变量或二分类变量；

b_0 ——常数项的估计值；

$b_1 \sim b_m$ ——偏回归分析系数的估计值，通过计算机软件完成迭代算法得到；

e ——自然数；

m ——自变量个数。

8.1.2 考虑因变量和自变量之间的非线性关系，可构建非线性回归，如多项式（polynomial）回归和样条（spline）回归。考虑多个自变量对健康结果的联合效应，可采用加权分位数和（Weighted Quantile Sum, WQS）回归、贝叶斯核机回归（Bayesian kernel machine regression, BKMR）、弹性网络回归（ElasticNet Regression）等模型分析多种特征污染物混合暴露与健康效应指标之间的关联。

8.2 综合判断

组织权威专家对特征污染物/代谢产物进行讨论，根据相关资料及研究与应用需要进行综合判断，最终确定暴露生物标志物及对应的样品类型。获得的暴露生物标志物应具有代表性、敏感性、关联性和可行性，一般不宜多于10种/类污染物。综合判断时主要考虑因素包括：

- a) 与特征健康效应指标的关联程度；
- b) 与场地特征土壤污染物的关联、人群潜在暴露风险；
- c) 人体负荷水平、检出率；
- d) 分析方法的成熟度；
- e) 毒性效应。

9 质量控制

9.1 总体要求

9.1.1 项目参与人员应接受技术培训，考核合格后上岗。

9.1.2 承担分析任务的实验室需具备相关资质。实验室运行管理规范，配备所承担任务相配套的实验室仪器设备和人员，有完备的质量控制与质量保证管理系统。

9.1.3 项目实施过程中严格执行对应的技术规范、标准等条款，保证仪器设备、样品采集、实验室条件、实验室质量控制、标样试剂等全方位符合调查要求。

9.1.4 校准和比对所需测量分析的工具及仪器，包括体格检查、环境监测仪器及实验室分析仪器的准

确度和精密度，合格率应达到 100%。

9.2 样品采集、保存、运输与实验室分析

9.2.1 环境样品的采集、保存、运输的质量控制按 HJ 630 和 HJ 25.2 执行；人群生物样品的采集、保存、运输的质量控制按 GB /T 16126 执行；体格检查的质量控制按《医疗机构临床实验室管理办法》执行。

9.2.2 环境样品和人体生物样品分析方法原则上优先选择国家标准、行业标准、国际标准、国外标准等规范性方法，或者公认权威的分析方法。分析过程的质量控制与质量保证技术要求执行对应标准中相关要求，对特殊监测项目应按照相关标准要求在规定时间内进行监测。

9.2.3 自行扩充和修改过的标准方法、实验室自建方法宜参照 HJ 630 进行方法确认，建立实验室分析质量控制技术要求并严格执行。每批次监测至少做 1 个全程序空白实验；实验室内部质量控制包括校准曲线（中间浓度点校正）、仪器稳定性检查、全程序空白、有证标准物质、加标回收及平行样品等；实验室外部质量控制包括密码平行样或密码样、实验室比对、实验室间平行样品测定等；质控样品的检测不在合格范围内应即时查找原因进行纠正。

9.2.4 开展可疑目标筛查和非目标筛查时，宜结合场地污染物类型选择合适的内标物质；通常采用多个同位素标记的化合物作为内标物，并确保其保留时间均匀覆盖色谱图或全部保留时间窗口。

9.3 数据审核与处理

9.3.1 数据的录入、整理与分析处理按 GB/T 8170 执行。编制数据清理计划，按统一的标准化方式处理所有数据，检查数据的规范性、完整性、合理性、唯一性、准确性、可溯源性，将核查问题汇总并分析后，采取标准化、修订、补遗或去除等处理。

9.3.2 异常数据或样品的识别和剔除需具有充分理由并考虑可能影响因素及合理性。

9.3.3 根据数据特征选择正确的统计分析方法，注意辨析混杂因素及其影响。

10 报告编制

场地土壤污染物人体暴露组解析报告应全面、真实的反映人体暴露组解析工作，文字应简洁、准确。调查方案、原始数据、计算和分析过程可编入报告附录。报告应包括背景介绍（场地基本情况、解析目的、程序和方法）、初步调查、场地调查、人群调查、暴露生物标志物筛选、质量控制、结论及建议等章节。其中结论及建议部分应包括以下内容：

- a) 暴露生物标志物基本信息，包括理化性质、人体代谢转化情况等；
- b) 暴露生物标志物与场地土壤污染物的关联，在不同暴露情景下的主要暴露途径分析，以及对应土壤污染物相关信息，包括理化性质、环境中的浓度和空间分布、工业来源等；
- c) 暴露生物标志物对应的生物样品类型和适用人群，生物样品的推荐采集方法、检测分析方法、质量控制与质量评价方案；
- d) 暴露生物标志物的当前研究情况，包括人体负荷水平、流行病学和毒理学研究等；
- e) 应用建议及局限性。

附 录 A
(资料性)
常见场地类型及特征污染物

常见场地类型及潜在特征污染物可参考表A.1。实际调查过程中应根据具体情况确定。

表A.1 常见场地类型及特征污染物

行业分类	场地类型	特征污染物类型
制造业	化学原料及化学品制造	挥发性有机物（苯系物、卤代烃、石油烃、有机溶剂等）、半挥发性有机物（阻燃剂、全氟化合物、多环芳烃等）、重金属（砷、镍、铅等）、农药、塑料助剂、表面活性剂
	电气机械及器材制造	重金属（砷、镍、铅、汞等）、有机氯溶剂、半挥发性有机物（多环芳烃、醚类等）、挥发性有机物（石油烃、苯系物、卤代烃）
	纺织业	重金属（铬、六价铬等）、氯代有机物、半挥发性有机物（苯胺类、全氟化合物等）、染料、染料助剂、表面活性剂
	造纸及纸制品	重金属、氯代有机物、挥发性有机物（苯系物、石油烃、羰基化合物类等）、半挥发性有机物（苯酚类等）
	金属制品业	重金属、挥发性有机物（卤代烃、苯系物、石油烃等）、氯代有机物
	有色金属冶炼	重金属、持久性有机污染物（二噁英类、多氯联苯、多氯萘）
	机械制造	重金属、挥发性有机物（石油烃、苯系物、卤代烃等）
	塑料和橡胶制品	半挥发性有机物（硝基苯类、氯代苯类等）、挥发性有机物（苯系物、石油烃、卤代烃等）、重金属（砷、铅等）、增塑剂
	石油化工	挥发性有机物（苯系物、石油烃、卤代烃等）、半挥发性有机物（酚类、苯胺类、多环芳烃等）、重金属（汞、镉、镍、铅、铊、铬、锡、铜、锰、钒、砷等）
	炼焦化学	挥发性有机物（苯系物等）、半挥发性有机物（酚类、苯胺类、多环芳烃等）、重金属（汞、铅、钒、钴、砷等）、氰化物
	皮革、皮毛制造	重金属、挥发性有机物（苯系物、烃类、有机溶剂）、半挥发性有机物、染料、染料助剂等
	废弃资源和废旧材料回收加工	半挥发性有机物（二噁英类、多环芳烃、阻燃剂等）、重金属、农药、塑化剂
	采矿业	煤炭开采和洗选业
黑色金属和有色金属矿采选业		重金属、氰化物
非金属矿物采选业		重金属、氰化物、半挥发性有机物（氟化物、多环芳烃）、挥发性有机物（石油烃、苯系物）
石油和天然气开采业		挥发性有机物（石油烃、烷烃、烯烃、芳香烃等）、半挥发性有机物（多环芳烃等）

行业分类	场地类型	特征污染物类型
电力燃气 及水的生产 和供应	火力发电	重金属、二噁英类、多环芳烃等
	电力供应	二噁英类、多环芳烃等
	燃气生产和供应	半挥发性有机物、重金属、挥发性有机污染物
水利、环 境和公共设 施管理业	水污染治理	半挥发性有机物（二噁英类、多环芳烃、全氟化合物、塑化剂等）、重金属、农药、药物及个人护理品
	危险废物治理	半挥发性有机物（二噁英类、多环芳烃、全氟化合物等）重金属、挥发性有机物（苯系物、烃类等）
	其它环境治理（工业固废、生活垃圾处理）	半挥发性有机物（二噁英类、多环芳烃、全氟化合物等）、重金属、挥发性有机物（苯系物、烃类等）

附 录 B
(资料性)
人体血液和尿液中金属元素的分析方法

B.1 适用范围

本标准规定了测定血清和尿液中金属元素的电感耦合等离子体质谱法。

本标准适用于血清和尿液中26种金属元素的测定；当血清取样量为90 μl 、尿液取样量为180 μl ，定容体积为1.80 ml时，金属测定方法检出限和方法定量限分别如表B.1所示。

表 B.1 尿液和血清中金属分析方法检出限和定量限

元素	尿液		血清	
	方法检出限($\mu\text{g/L}$)	方法定量限($\mu\text{g/L}$)	方法检出限($\mu\text{g/L}$)	方法定量限($\mu\text{g/L}$)
Mg	0.0504	0.1513	0.0005	0.0017
Al	0.2966	0.8897	0.0302	0.1007
Ti	0.0703	0.2110	0.0266	0.0888
V	0.0015	0.0046	0.0022	0.0072
Cr	0.0028	0.0084	0.0005	0.0016
Mn	0.0021	0.0064	0.0016	0.0052
Fe	0.0176	0.0529	0.0085	0.0282
Co	0.0004	0.0012	0.0002	0.0006
Ni	0.0027	0.0081	0.0017	0.0058
Cu	0.0053	0.0159	0.0040	0.0132
Zn	0.0244	0.0732	0.0099	0.0331
Ge	0.0011	0.0033	0.0010	0.0035
As	0.0014	0.0043	0.0070	0.0233
Se	0.0736	0.2209	0.1407	0.4691
Sr	0.0057	0.0170	0.0010	0.0032
Nb	0.0002	0.0005	0.0007	0.0024
Mo	0.0051	0.0153	0.0076	0.0254
Cd	0.0003	0.0008	0.0003	0.0009
Sn	0.0033	0.0098	0.0017	0.0056
Sb	0.0003	0.0010	0.0009	0.0030
Ba	0.0174	0.0521	0.0012	0.0039
W	0.0005	0.0014	0.0014	0.0046

元素	尿液		血清	
	方法检出限($\mu\text{g/L}$)	方法定量限($\mu\text{g/L}$)	方法检出限($\mu\text{g/L}$)	方法定量限($\mu\text{g/L}$)
Re	0.0001	0.0002	0.0001	0.0003
Hg	0.0008	0.0025	0.0019	0.0064
Tl	0.0004	0.0012	0.0001	0.0003
Pb	0.0074	0.0222	0.0006	0.0020

B.2 方法原理

血清或样品用稀硝酸消解，离心后取上清，采用电感耦合等离子体质谱法，以钪(Sc)、钇(Y)、铟(In)、铽(Tb)、铋(Bi)作为内标元素校正基体的干扰及仪器造成的信号漂移，测定镁(Mg)、铝(Al)、钛(Ti)、钒(V)、铬(Cr)、锰(Mn)、铁(Fe)、钴(Co)、镍(Ni)、铜(Cu)、锌(Zn)、锗(Ge)、砷(As)、硒(Se)、锶(Sr)、铌(Nb)、钼(Mo)、镉(Cd)、锡(Sn)、锑(Sb)、钡(Ba)、钨(W)、铼(Re)、汞(Hg)、铊(Tl)和铅(Pb)共26种金属元素含量。

B.3 实验试剂与材料

B.3.1 超纯水。

B.3.2 硝酸：优级纯，65%。

B.3.3 Triton X-100，分析纯。

B.3.4 正丁醇，分析纯。

B.3.5 元素标准溶液

直接购买市售国家认可的元素标准溶液Mg、Al、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ge、As、Se、Sr、Nb、Mo、Cd、Sn、Sb、Ba、W、Re、Hg、Tl、Pb（目标元素）；Sc、Y、In、Tb、Bi（内标元素）；金(Au)（用于消除仪器测汞时的记忆效应）。参考标准溶液证书进行保存，开封后于4℃密闭、避光保存。

B.3.6 元素质控标准品

直接购买市售国家认可的元素质控标准品。参考说明书进行保存和使用。本试验采用的质控品为ClinChek- Control, Plasma Control (Level I, II)。开封溶解后于-20℃保存。

B.4 仪器和设备

B.4.1 聚乙烯离心管，2 ml。

B.4.2 聚乙烯离心管，15 ml。

B.4.3 容量瓶，50 ml。

B.4.4 容量瓶，500 ml。

B.4.5 微量移液器，20 μl ，100 μl ，200 μl ，1000 μl ，5 ml。

B.4.6 超纯水系统。

B.4.7 涡旋振荡器。

B.4.8 水浴超声仪。

B. 4. 9 电感耦合等离子体质谱仪。

B. 4. 10 其他一般实验室常用仪器和设备。

B. 5 样品前处理

B. 5. 1 消解液配制：使用硝酸、Triton X-100、正丁醇、Au标准溶液、超纯水配制含1%（体积分数）稀硝酸-0.01%（体积分数）Triton-0. 3%（体积分数）正丁醇-50 $\mu\text{g/L}$ Au溶液的消解液，混匀待用。

B. 5. 2 血清样品前处理：血清样品在4°C下解冻，取出恢复至室温，充分摇匀后，移取 90 μl 置于 2 mL 聚乙烯离心管内，加入900 μl 消解液和810 μl 超纯水，振荡摇匀。再进行45°C超声水浴20 min。将消解完全的血清样12000 rpm离心10 min，再取1.5 ml上清液待仪器分析。

B. 5. 3 尿液样品前处理：取出尿样在室温下解冻，充分摇匀后，移取180 μl 置于 2 ml 聚乙烯离心管内，加入1620 μl 消解液，振荡摇匀，室温消解过夜。再进行45°C超声水浴60 min。将消解完全的尿样12000 rpm离心10 min，再取1.5 ml上清液待仪器分析。

B. 6 仪器分析

B. 6. 1 ICP-MS仪器开机后，先用 5 ml/min 的氦气吹扫碰撞池 5~10 min，保证碰撞反应池处于洁净状态，降低其他气体的干扰，提高检测的灵敏度。

B. 6. 2 打开循环水、氩气阀、排风等辅助设备，将进样管置于5%硝酸溶液中，等离子气、辅助气、载气和补偿气分别设置为15、1、1、1 L/min，吹扫2~5 min，点火，仪器进入自动优化。要求仪器的参数满足灵敏度：锂（Li，分子量7）>3000，钇（Y，分子量89）>10000，铈（分子量205）>6000，氧化铈（CeO，分子量156）/ 铈（Ce，分子量140）<2%，双电荷离子比例 $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{+}$ <3%，质量轴误差在 ± 0.1 内，分辨率10%峰宽介于0.65~0.80之间。

B. 7 标准系列的配制

B. 7. 1 待测元素混合标准应用液的配制

精确吸取相应体积元素标准溶液置于 50 ml容量瓶，用稀释剂[1%（体积分数）稀硝酸-0.01%（体积分数）Triton-0. 3%（体积分数）正丁醇-50 $\mu\text{g/L}$ Au溶液]的定容至刻度，此为标准贮备液，浓度为标准应用液的10倍，临用时再用相同的稀释剂将标准贮备液稀释成标准应用液。标准应用液相应元素浓度如下：Mg, 2000 $\mu\text{g/L}$; Al, 100 $\mu\text{g/L}$; Ti, 2 $\mu\text{g/L}$; V, 1 $\mu\text{g/L}$; Cr, 1 $\mu\text{g/L}$; Mn, 1 $\mu\text{g/L}$; Fe, 200 $\mu\text{g/L}$; Co, 1 $\mu\text{g/L}$; Ni, 1 $\mu\text{g/L}$; Cu, 200 $\mu\text{g/L}$; Zn, 100 $\mu\text{g/L}$; Ge, 1 $\mu\text{g/L}$; As, 1 $\mu\text{g/L}$; Se, 20 $\mu\text{g/L}$; Sr, 20 $\mu\text{g/L}$; Nb, 1 $\mu\text{g/L}$; Mo, 2 $\mu\text{g/L}$; Cd, 1 $\mu\text{g/L}$; Sn, 1 $\mu\text{g/L}$; Sb, 1 $\mu\text{g/L}$; Ba, 1 $\mu\text{g/L}$; W, 1 $\mu\text{g/L}$; Re, 1 $\mu\text{g/L}$; Hg, 1 $\mu\text{g/L}$; Tl, 1 $\mu\text{g/L}$; Pb, 1 $\mu\text{g/L}$ 。

B. 7. 2 待测元素系列标准溶液的配制

用稀释剂[1%（体积分数）稀硝酸-0.01%（体积分数）Triton-0. 3%（体积分数）正丁醇-50 $\mu\text{g/L}$ Au溶液]将待测元素混合标准应用液配成不同梯度的标准溶液（Mg: 0、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000 $\mu\text{g/L}$; Fe、Cu: 0、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$; Al、Zn: 0、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/L}$; Se、Sr: 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{g/L}$; Ti、Mo: 0、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 $\mu\text{g/L}$; V、Cr、Mn、Co、Ni、Ge、As、Nb、Cd、Sn、Sb、Ba、W、Re、Hg、Tl、Pb: 0、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1 $\mu\text{g/L}$ ）。

B. 7. 3 内标元素混合溶液的配制

精确吸取相应体积的内标元素标准溶液和稀释剂[1%（体积分数）稀硝酸-0.01%（体积分数）Triton-0. 3%（体积分数）正丁醇-50 $\mu\text{g/L}$ Au溶液]，配制200 $\mu\text{g/L}$ 的内标元素混合溶液。

B. 7. 4 标准曲线的绘制与计算

对系列标准溶液进行上机检测，同时在线检测内标元素混合溶液，以标准系列相应元素的响应值对内标响应值的比值对相应的元素浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）绘制标准曲线或计算回归方程（Mg、Al、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu对应的内标元素为Sc；Zn、Ge、As、Se、Sr、Nb、Mo对应的内标元素为Y；Cd、Sn、Sb、Ba对应的内标元素为In；W、Re对应的内标元素为Tb；Hg、Tl、Pb对应的内标元素为Bi）。标准曲线的相关系数 ≥ 0.999 ，否则，重新建立标准曲线。

B.8 试样测定

用测定标准系列的操作条件（B.6）进行试样的测定；每20~30个样品为一批。由标准曲线或回归方程得元素的浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）。

B.9 试验数据处理

按式（B.1）计算血清和尿液样品中某种元素的浓度：

$$C = d \times C_0 \quad (\text{B.1})$$

式中：

C——血清中某种元素的浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

d——样品稀释倍数，血清和尿液分别为20和10；

C_0 ——由标准曲线或回归方程得的稀释血清中某种元素的浓度， $\mu\text{g/L}$ 。

B.10 精密度和准确度

3家实验室分别对同一加标浓度的统一血清或尿液进行分析测定。方法的精密度通过分析结果的实验室内相对标准偏差和实验室间相对标准偏差加以评价；方法准确度采用目标元素的加标回收率加以评价。精密度和准确度数据汇总于表B.2和B.3所示。

表 B.2 血清中金属分析方法精密度和准确度汇总

元素	加标回收率%	实验室内相对标准偏差%	实验室间相对标准偏差%	重复性限 r	再现性限 R
Mg	101	0.60	2.40	0.97	0.90
Al	117	1.20	9.80	0.21	0.42
Ti	81	9.00	7.40	0.24	0.69
V	98	2.10	6.60	0.31	0.50
Cr	106	2.20	6.10	0.25	0.42
Mn	119	2.30	3.00	0.23	0.22
Fe	92	1.10	1.10	0.28	0.37
Co	110	0.90	2.50	0.24	0.61
Ni	117	3.50	4.40	0.23	0.32
Cu	103	1.10	2.10	0.29	0.61
Zn	91	2.20	1.90	0.20	0.25
Ge	100	3.70	6.30	0.35	0.54
As	113	4.40	6.40	0.41	1.47
Se	109	2.90	3.90	0.45	0.98
Sr	97	1.10	2.50	0.13	0.23

元素	加标回收率%	实验室内相对标准偏差%	实验室间相对标准偏差%	重复性限 r	再现性限 R
Nb	100	1.10	3.60	0.12	0.54
Mo	108	2.60	7.30	0.28	0.94
Cd	102	5.40	6.20	0.11	0.39
Sn	104	4.80	7.10	0.44	0.36
Sb	105	1.00	2.10	0.42	0.59
Ba	108	0.90	3.90	0.33	0.63
W	102	3.00	3.90	0.18	0.32
Re	101	0.90	2.70	0.31	0.31
Hg	110	1.50	1.90	0.16	0.27
Tl	103	0.70	2.00	0.23	0.34
Pb	103	4.40	2.80	1.20	1.57

表 B.3 尿液中金属分析方法精密度和准确度汇总

元素	加标回收率%	实验室内相对标准偏差%	实验室间相对标准偏差%	重复性限 r	再现性限 R
Mg	105	2.16	2.00	0.27	1.08
Al	100	0.46	0.94	0.54	4.41
Ti	103	0.54	1.53	4.05	3.33
V	108	0.68	1.12	0.95	2.97
Cr	105	0.55	0.94	0.99	2.75
Mn	104	0.52	0.48	1.04	1.35
Fe	97	0.63	0.83	0.50	0.50
Co	105	0.54	1.35	0.41	1.13
Ni	103	0.51	0.70	1.58	1.98
Cu	92	0.64	1.35	0.50	0.95
Zn	97	0.45	0.55	0.99	0.86
Ge	100	0.78	1.19	1.67	2.84
As	108	0.91	3.26	1.98	2.88
Se	99	0.99	2.17	1.31	1.76
Sr	100	0.29	0.52	0.50	1.13
Nb	100	0.26	1.21	0.50	1.62

元素	加标回收率%	实验室内相对标准偏差%	实验室间相对标准偏差%	重复性限 r	再现性限 R
Mo	104	0.63	2.09	1.17	3.29
Cd	101	0.24	0.86	2.43	2.79
Sn	97	0.97	0.79	2.16	3.20
Sb	114	0.94	1.31	0.45	0.95
Ba	108	0.74	1.39	0.41	1.76
W	100	0.41	0.70	1.35	1.76
Re	98	0.68	0.69	0.41	1.22
Hg	108	0.35	0.59	0.68	0.86
Tl	113	0.52	0.76	0.32	0.90
Pb	102	2.67	3.48	1.98	1.26

B.11 质量控制

B.11.1 每批样品至少做2个实验室空白试样，其测定结果均应低于测定下限。

B.11.2 每次分析应建立标准曲线，其相关系数应大于0.999。每20个样品或每批次（少于20个样品/批）样品，应分析一个标准曲线中间浓度点，其测定结果与实际浓度值的相对偏差应不大于10%，否则应查找原因或重新建立标准曲线。每20个样品或每批次（少于20个样品/批）样品分析完毕后，应进行一次标准曲线零点分析，其测定结果与实际浓度值的相对偏差应不大于30%。

B.11.3 每批次样品至少按10%的比例进行平行双样测定，样品数量少于10个时，应至少测定一个平行双样。平行双样测定结果中，26种金属元素的相对偏差应小于30%。

B.11.4 每批次样品至少分析10%的加标回收样，样品数量小于10个时，应至少做一个加标回收样。加标回收样测定结果中，26种金属元素的加标回收率应控制在70%~125%之间。

B.11.5 ICP-MS对试剂纯度要求较高，应使用纯度高的试剂，且每批次试剂须通过空白实验检验，试剂空白值不得大于方法检出限。同一批次样品应使用同一批次实验用水，实验用水应进行空白实验，空白值不得大于方法检出限。

B.11.6 每次分析应测定内标的响应强度，试样中内标的响应值应介于标准曲线响应值的70%~130%，否则说明仪器发生漂移或有干扰产生，应查找原因后重新分析。若发现基体干扰，须稀释试样后测定；若发现试样中含有内标元素，须更换内标或提高内标元素浓度。

B.12 说明

B.12.1 所用玻璃仪器用20%（体积分数）硝酸浸泡过夜，蒸馏水润洗3遍，超纯水润洗3遍，80℃烤箱烘干待用。

B.12.2 本实验整个过程应尽量在洁净区域进行，避免外界环境引入污染。

附录 C (资料性)

人体血液和尿液中污染物及其代谢物可疑/非目标筛查分析方法

C.1 适用范围

本标准为人體血液和尿液中多种有机污染物及其代谢产物可疑/非目标分析方法提供参考。本标准为人體血液和尿液样品制备、本地化合物数据库构建、非靶标鉴定方法提供必要信息。血液样本主要用于分析挥发性污染物(VOCs)和半挥发性污染物(SVOCs)及其代谢产物(mVOCs和mSVOCs);尿液样本主要用于分析mVOCs和mSVOCs。

C.2 实验原理

气相色谱-质谱仪(GC-MS)、气相色谱-三重四极杆质谱仪(GC-MS/MS)和气相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(GC-QTOF-MS)适用于分析挥发性或半挥发性,且热稳定性较好的物质,一般为沸点低、分子量相对小、极性小的有机物,故应用于分析样品中的VOCs和SVOCs。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(UPLC-QTOF-MS)或超高效液相色谱-四极杆-轨道离子阱质谱仪(UPLC-Q-Orbitrap-MS)扫描范围更广,且针对极性大、易分解、分子量较大的有机物具有更好的分辨效果,故应用于分析样品中的mVOCs和mSVOCs。在非靶标筛查分析中,根据准确的分子离子质量信息、可以初步比对识别的质谱数据库、化合物的色谱保留时间及其他可以辅助定性信息如同位素离子簇信息,可对样品中的未知污染物进行初步识别。

C.3 试剂与材料

C.3.1 正己烷(C_6H_{14}): 色谱纯。

C.3.2 丙酮(CH_3COCH_3): 色谱纯。

C.3.3 二氯甲烷(CH_2Cl_2): 色谱纯。

C.3.4 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。

C.3.5 异辛烷(C_8H_{18}): 色谱纯。

C.3.6 乙酸乙酯($C_4H_8O_2$): 色谱纯。

C.3.7 乙腈(C_2H_3N): 色谱纯。

C.3.8 乙酸乙酯-二氯甲烷-正己烷混合溶剂: 1+1+1。用乙酸乙酯(A.3.6)、二氯甲烷(A.3.3)和正己烷(A.3.1)按1:1:1体积比混合。

C.3.9 乙酸乙酯-乙腈混合溶剂: 1+9。用乙酸乙酯(A.3.6)和乙腈(A.3.7)按1:9体积比混合。

C.3.10 乙酸($C_2H_4O_2$): 色谱纯。

C.3.11 乙酸钠(CH_3COONa): 色谱纯。

C.3.12 乙酸铵(CH_3COONH_4): 色谱纯。

C.3.13 佛洛里硅土固相萃取柱(Florisil, 1 g/6 mL): 农残级。

C.3.14 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶: β -葡萄糖醛酸酶: ~100,000 units/mL; 芳基硫酸酯酶: ~47,500 units/mL。

C.3.15 VOCs标准品

VOCs标准贮备液: $\rho=1000\sim 5000$ mg/L。可直接购买市售有证标准溶液,或用标准物质配制。

VOCs标准使用液: $\rho=10.0\sim 100.0$ mg/L。参照制造商说明配制。

内标标准溶液： $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ 。宜选用氟苯、4-溴氟苯和 d_4 -1,2-二氯苯作为内标。可直接购买市售有证标准溶液，或用高质量浓度标准溶液配制。

替代物标准溶液： $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ 。宜选用二溴氟甲烷、 d_8 -甲苯和4-溴氟苯作为替代物。可直接购买市售有证标准溶液，或用高质量浓度标准溶液配制。

C. 3. 16 SVOCs标准品

SVOCs标准贮备液： $\rho = 1000\sim 5000 \text{ mg/L}$ ；市售有证标准溶液。

SVOCs标准中间液： $\rho = 200\sim 500 \mu\text{g/ml}$ ；用异辛烷稀释SVOCs标准贮备液。

内标贮备液： $\rho = 5000 \text{ mg/L}$ 。结合场地特征污染物选择特定的同位素标记内标物质，直接购买市售有证标准溶液；可使用 d_8 -萘、 d_{10} -蒎、 d_{10} -菲、 d_{12} -蒎和 d_{12} -菲作为多环芳烃（PAHs）筛查分析的内标；使用 d_9 -2-硝基芴和 d_9 -3-硝基芴作为含氧多环芳烃和硝基多环芳烃筛查分析内标。

内标中间液： $\rho = 200\sim 500 \mu\text{g/ml}$ 。用异辛烷释内标贮备液配置，并混匀。

C. 3. 16. 1 多环芳烃（PAHs）标准品

直接购买市售有证的16种PAHs标准品Naphthalene、Acenaphthylene、Acenaphthene、Fluorene、Phenanthrene、Anthracene、Fluoranthene、Pyrene、Benz[a]anthracene、Chrysene、Benzo[b]fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene、Benzo[a]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene、Benzo[ghi]perylene、Indeno[1,2,3-cd]pyrene，溶剂为异辛烷。参考标准溶液证书进行保存，开封后于 -20°C 以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中 d_8 -萘、 d_{10} -蒎、 d_{10} -菲、 d_{12} -蒎和 d_{12} -菲等用作PAHs回收率指示物，溶剂为异辛烷；六甲基苯（HBM）用作内标指示物，溶剂为异辛烷。

C. 3. 16. 2 甲基多环芳烃（MPAHs）标准品

直接购买市售有证的6种M-PAHs标准品1,4-Dimethylnaphthalene（1,4-DMNap）、1,3-Dimethylnaphthalene（1,3-DMNap）、2,7-Dimethylnaphthalene（2,7-DMNap）、1,6,7-Trimethylnaphthalene（1,6,7-TMNap）、1-Methyl-9H-fluorene（1-Mflu）、1,4,6,7-tetramethyl naphthalene（1,4,6,7-TetraMNap），溶剂为异辛烷。参考标准溶液证书进行保存，开封后于 -20°C 以下密闭、避光冷藏。

C. 3. 16. 3 含氧多环芳烃（OPAHs）标准品

直接购买市售有证的8种OPAHs标准品1,4-Naphthoquinone、9-Fluorenone、Anthraquinone、Benzanthrone、Benz(a)anthracene-7,12-dione、6H-Benzo[cd]pyren-6-one、1,2-Acenaphthenequinone、9,10-Phenanthrenequinone，溶剂为异辛烷。参考标准溶液证书进行保存，开封后于 -20°C 以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中 Anthraquinone- d_8 和9-Fluorenone- d_9 等用作OPAHs内标，溶剂为异辛烷，溶剂为异辛烷。

C. 3. 16. 4 杂环多环芳烃（HPAHs）标准品

直接购买市售有证的21种HPAHs标准品Dibenzothiophene、4-Methyldibenzothiophene、4,6-Dimethyldibenzothiophene、2,8-Dimethyldibenzothiophene、3-Methyldibenzothiophene、7-Methylbenzo[b]naphtho[2,3-d] thiophene、2-Nitrodibenzothiophene、2,8-Dinitrodibenzothiophene、Quinoline、Isoquinoline、5,6-Benzoquinoline、Benzidine、Indole、Carbazole、Acridine、3-Methylcarbazole、1,4-Dimethylcarbazole、1,8-Dimethylcarbazole、2,3-Benzofuran、Dibenzofuran、4-Methyldibenzofuran，溶剂为异辛烷。参考标准溶液证书进行保存，开封后于 -20°C 以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中 Isoquinoline- d_7 等用作HPAHs回收率指示物，溶剂为异辛烷； ^{13}C -Carbazole和 ^{13}C -Dibenzofuran等用作内标指示物，溶剂为异辛烷。

C. 3. 16. 5 硝基酚（NPs）与氯酚（CPs）标准品

直接购买市售有证的NPs与CPs标准品2-NP、3-NP、4-NP、3-Methyl-4-NP（3-M-4-NP）、4-Chlorocatechol（4-CCT）、Pentachlorophenol（PCP），溶剂为甲醇。参考标准溶液证书进行保存，开封后于-20℃以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中 $^{13}\text{C}_6$ -4-CCT和 $^{13}\text{C}_6$ -2,4,5,6-tetrachlorophenol用作NPs和CPs内标指示物，溶剂为甲醇。

C. 3. 17 代谢产物标准品

C. 3. 17. 1 羟基多环芳烃（OH-PAHs）标准品

直接购买市售有证的12种OH-PAHs标准品1-OH-Naphthalene（1-OH-Nap）、2-OH-Naphthalene（2-OH-Nap）、2-OH-Fluorene（2-OH-Flu）、3-OH-Fluorene（3-OH-Flu）、2-OH-Phenanthrene（2-OH-Phe）、3-OH-Phenanthrene（3-OH-Phe）、4-OH-Phenanthrene（4-OH-Phe）、1/9-OH-Phenanthrene（1/9-OH-Phe）、1-OH-Pyrene（1-OH-Pyr）、6-OH-Chrysene（6-OH-Chr）和3-OH-Benzo[a]pyrene（3-OH-BaP），溶剂为甲醇。参考标准溶液证书进行保存，开封后于-20℃以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中d₇-2-OH-Nap、d₉-3-OH-Flu和d₉-1-OH-Pyr和d₁₁-3-OH-BaP等用作OH-PAHs内标指示物，溶剂为甲醇； $^{13}\text{C}_{12}$ -3-OH-Phe用作回收率指示物，溶剂为甲醇。

C. 3. 17. 2 羧基多环芳烃（Carbo-PAHs）标准品

直接购买市售有证的羧基PAHs标准品2-Naphthoic acid（2-NapCA）、1-Pyrenecarboxylic acid（1-PyrCA），溶剂为甲醇。参考标准溶液证书进行保存，开封后于-20℃以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中d₇-2-OH-Nap和d₉-1-OH-Pyr用作羧基PAHs内标指示物，溶剂为甲醇。

C. 3. 17. 3 羟基 PAHs 衍生物标准品

直接购买市售有证的羟基PAHs衍生物标准品4-Nitro-1-naphthol（4-OH-NNap）、5-Hydroxyisoquinoline（5-OH-iQNL）、3-Hydroxycarbazole（3-OH-CBZ）、2-Hydroxydibenzofuran（2-OH-DBF），溶剂为甲醇。参考标准溶液证书进行保存，开封后于-20℃以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中d₇-2-OH-Nap和d₉-3-OH-Flu用作羟基PAHs衍生物内标指示物，溶剂为甲醇。

C. 3. 17. 4 mVOCs 标准品

直接购买市售有证的21种VOCs代谢物标准品，包括：3-Methylhippuric acid（3-MHA）、N-Acetyl-S-(2-hydroxypropyl)-L-cysteine（2-HPMA）、N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cysteine（3-HPMA）、2-Methylhippuric acid（2-MHA）、N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cysteine（AAMA）、N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)-L-cysteine（AMCC）、N-Acetyl-S-(benzyl)-L-cysteine（BMA）、N-Acetyl-S-propyl-L-cysteine（BPMA）、rac 2-Aminothiazoline-4-carboxylic acid（ATCA）、N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cysteine（CEMA）、Phenylglyoxylic acid（PGA）、N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cysteine（CYMA）、N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxybutyl)-L-cysteine（DHBMA）、N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine（GAMA）、N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-L-cysteine（HEMA）、N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl-1-methyl)-L-cysteine（HPMMA）、trans, trans-Muconic acid（MU）、N-Acetyl-S-(4-hydroxy-2-buten-1-yl)-L-cysteine（MHBMA3）、N-Acetyl-S-(phenyl)-L-cysteine（PMA）、2,2'-Thiodiacetic acid（TGA），溶剂为甲醇。参考标准溶液证书进行保存，开封后于-20℃以下密闭、避光冷藏。

直接购买市售有证的同位素标准品，其中d₃-2-HPMA、d₃-3-HPMA、d₇-2-MHA、d₇-3-MHA和d₃-AAMA等用作VOCs代谢物定量内标，溶剂为甲醇。

C. 4 仪器与设备

C. 4. 1 GC-MS：气相色谱配备顶空进样装置或吹扫捕集装置，具有分流/不分流进样口，柱温箱可程序升温。质谱具有电子轰击电离源（EI）。

- C. 4. 2 GC-MS/MS: 质谱具有EI源。
- C. 4. 3 HPLC-MS/MS: 质谱具有电喷雾电离源 (ESI)。
- C. 4. 4 GC-QTOF-MS: 具有分流/不分流进样口, 柱温箱可程序升温; 质谱具有EI源。
- C. 4. 5 UPLC-QTOF-MS或UPLC-Q-Orbitrap-MS: 质谱具有电喷雾电离源 (ESI)。
- C. 4. 6 气相色谱柱: Agilent 19091S-431UI: 1533315B HP-5MS UI色谱柱, 长15m, 内径0.25 mm, 膜厚0.25 μm , 或其它等效毛细管色谱柱。
- C. 4. 7 液相色谱柱: C18色谱柱, 长100 mm, 内径4.6 mm, 膜厚为2.7 μm , 或其它等效毛细管色谱柱。
- C. 4. 8 玻璃试管: 10 ml、15 ml和50 ml。
- C. 4. 9 特氟龙管: 50 ml。
- C. 4. 10 鸡心瓶: 30 ml。
- C. 4. 11 水浴锅。
- C. 4. 12 氮吹仪。
- C. 4. 13 超声仪。
- C. 4. 14 固相萃取装置。
- C. 4. 15 超纯水系统。
- C. 4. 16 一般实验室常用仪器和设备。

C. 5 样品

C. 5. 1 试样的制备

C. 5. 1. 1 VOCs 分析

血液样本制备: 血液 (或血清) 样品于4°C解冻后混匀, 取1 ml样品于40-ml棕色进样瓶中, 加入4 ml超纯水, 1 μg 内标溶液和10 μl 消泡剂; 采用配备顶空进样或吹扫捕集的GC-MS检测样品中的VOCs。

C. 5. 1. 2 SVOCs 及 mVOCs 和 mSVOCs 分析

尿液样本制备: 将尿液样品于4°C解冻, 取100 μl 于2-ml干净且编号的玻璃离心管中, 加入200 μl 含混合内标的甲醇溶液和20 μl 甲酸; 充分混匀后, 置于低温 (4°C) 振荡器中振摇10 min。将样品置于-20°C冷冻2 h, 沉淀蛋白; 随后, 将样品于低温 (4°C) 高速离心 (12000 rpm) 20 min; 取上清液, 经亲水PTFE针式滤器 (0.22 μm) 过滤后, 转移至棕色进样瓶中, 采用UPLC-QTOF-MS或UPLC-Q-Orbitrap-MS对样品中的mVOCs和mSVOCs等代谢产物进行筛查分析; HPLC-MS/MS对有标准品的污染物进行定量分析。

血液样本制备: 将血液 (血清) 样品于4 ° C解冻, 取100 μl 于2-ml干净且编号的玻璃离心管中, 加入200 μl 含混合内标的甲醇溶液和20 μl 甲酸; 充分混匀后, 低温 (4°C) 静置15 min。加入400 μl 正己烷, 1800 rpm 涡旋混匀2 min; 超声萃取10 min后, 于3500 rpm离心10 min; 取上清置于2-ml样品瓶中, 按上述步骤重复萃取2次; 合并上清, 在缓和氮气流中吹干, 200 μl 丙酮定溶, 采用GC-MS或GC-QTOF-MS全扫描筛查SVOCs类污染物。剩余下层样品在缓和氮气流中吹干正己烷后, 置于-20°C冷冻2 h, 沉淀蛋白; 随后, 将样品于低温 (4°C) 高速离心 (12000 rpm) 20 min; 取上清液, 经亲水PTFE针式滤器 (0.22 μm) 过滤后, 转移至棕色进样瓶中, 采用UPLC-QTOF-MS或UPLC-Q-Orbitrap-MS对样品中的mVOCs和mSVOCs等代谢产物进行筛查分析。采用GC-MS/MS和HPLC-MS/MS对部分有标样的污染物及其代谢产物进行定量分析。

C. 5. 2 空白试样的制备

用超纯水替代血液/尿液按照试样的制备D.5.1制备实验室空白试样。

C.6 仪器分析

C.6.1 仪器分析参数

C.6.1.1 VOCs 分析

吹扫捕集装置条件：吹扫温度30℃，吹扫时间11 min，干吹温度30℃，干吹时间 2 min，解吸温度180℃，解吸时间4 min，烘烤温度230℃，烘烤时间 10 min，载气流速 40 ± 5 mL/min。

GC-MS色谱参考条件：进样口温度150℃；升温程序为：35℃保持1 min，5℃/min升至70℃，10℃/min升至120℃，10℃/min升至200℃。载气为高纯氦气，色谱柱流速1.0 mL/min。

GC-MS质谱参考条件：采用电子轰击（EI）电离源全扫描模式采集信号；传输线温度280℃，离子源温度150℃，四极杆温度150℃，碰撞能70 eV，采集质量数范围m/z 45-550，谱图采集速率为5张/秒。

C.6.1.2 SVOCs 分析

GC-MS/MS色谱参考条件：进样口温度250℃，进样量为1 μL；升温程序为：60℃保持1 min，40℃/min升至120℃，再以5℃/min升至310℃。载气为高纯氦气，色谱柱流速2 mL/min；传输线温度260℃。

GC-MS/MS质谱参考条件：采用电子轰击（EI）电离源全扫描模式采集信号，离子源温度230℃，四极杆温度150℃，电子能量70 eV，采集质量数范围m/z 50~650，谱图采集速率为5张/秒。

C.6.1.3 mVOCs 和 mSVOCs 分析

HPLC-MS/MS色谱参考条件：C18色谱柱的柱温为40℃，水相为0.2 mM乙酸铵水溶液（A）和有机相为甲醇（B）。流动相流速为0.4 mL/min，洗脱程序如下：0–2 min，5–15% B；2–2.1 min，15–50% B；2.1–10 min，50% B；10–15 min，50–80% B；15–18 min，80–95% B；18–19 min，95% B；19–20 min，95–99% B；20–22 min，99% B；22.1–30 min，99–5% B。后运行4min。

HPLC-MS/MS质谱参考条件：使用喷射流电喷雾电离源(AJS ESI)、MRM模式下完成。干燥气温度为300℃，气体流速为5 L/min，雾化器压力为45 psi，鞘气温度为350℃，鞘气流速为12 L/min，喷嘴电压为500 V，毛细管电压为3500 V。

UPLC-QTOF-MS色谱参考条件：C18色谱柱的柱温为40℃，正离子模式下水相为0.05%甲酸水溶液（A），有机相为甲醇（B）；负离子模式下，水相为0.2 mM乙酸铵水溶液（A）和有机相为甲醇（B）。流动相流速为0.4 mL/min，洗脱程序如下：0–2 min，5–15% B；2–2.1 min，15–50% B；2.1–10 min，50% B；10–15 min，50–80% B；15–18 min，80–95% B；18–19 min，95% B；19–20 min，95–99% B；20–22 min，99% B；22.1–30 min，99–5% B。后运行4min。

HPLC-QTOF-MS质谱参考条件：电喷雾离子源正负离子全扫描模式，碰撞池气体N₂流速为8 L/min，气体温度为350℃，喷雾气压力为35 psi，鞘气温度为375℃，流速为12 L/min。毛细管电压为4000 V（正离子模式）和3500 V（负离子模式），喷雾电压为1500 V，裂解电压为150 V。采集质量数范围m/z 50~1100，谱图采集速率为2 spectra/s。

Q-Orbitrap -MS质谱参考条件：质谱选用ESI与APCI源，采用正负离子模式进行扫描（Full MS-ddMS₂）；扫描范围为70~1050 m/z；分辨率为Full MS：70,000 FWHM，MS/MS：17,500 FWHM；正、负离子喷雾电压分别为4.0 kV与-3.0 kV；离子传输管温度为320℃；鞘气流速为30 arb；辅助气流速为10 arb，辅助气温度为350℃；碰撞能量梯度为20、40、60 eV。

C.6.2 试样测定

按照仪器参考条件（C.6.1）进行血液和尿液试样的测定。

C.7 试验数据处理

C.7.1 本地化合物数据库

构建高分辨率精确质量的本地化合物数据库与谱库(PCDL)，包含16种PAHs、8种OPAHs、6种MPAHs以及21种HPAHs、12种OH-PAHs、6种硝基酚/氯酚、2种羧基PAHs、4种羟基PAHs衍生物、9种mVOCs。

建立已有标准样品的数据库：将SVOCs标准品分批次进行GC-MS/MS和GC-QTOF-MS检测，得到每种化合物在色谱图上的保留时间以及对应的EI源70 eV质谱图，在PCDL软件中对这些化合物的信息进行录入，建立SVOCs目标化合物数据库。将mVOCs和mSVOCs代谢产物标准品分批次进行HPLC-MS/MS和HPLC-QTOF-MS检测，得到每种化合物在色谱图上的保留时间、精确质量数以及对应的一级质谱图和二级质谱图，在PCDL软件中对这些化合物的信息进行录入，建立mVOCs和mSVOCs目标化合物数据库。

C.7.2 建立未知化合物的数据库

对无标准品的化合物，通过搜集其分子式、精确分子质量数、CAS号以及对应化合物结构式，同时基于VOCs和SVOCs化合物的沸点，预测其在气相色谱的保留时间，在PCDL软件中对这些化合物的信息进行录入，建立未知化合物数据库。

C.7.3 化合物鉴定

采集的全扫描数据，根据SANTE和FDA指南选择筛查方法参数，如谱库匹配得分、保留时间窗口、共流出得分和质量数误差等。参考筛查参数有：至少要有两个离子满足筛查的要求(离子质量偏差在5 ppm以内，共流出得分在70%以上，信噪比大于等于3)，保留时间偏差在0.15 min以内，数据库最小匹配得分为75%。

疑似物筛查的方法相对方便快捷，但是受到高分辨质谱数据库中化合物的种类和数量的限制，无法识别PCDL数据库之外的物质。为此，结合化合物数量庞大的NIST质谱数据库、Metlin、HMDB、KEGG、PubChem等数据库，开展未知污染物的非靶标筛查。数据经解卷积后，与数据库进行匹配，根据匹配度的高低，保留指数的比对，化合物碎片离子精确质量数理论值的比对等参数对化合物进行确证。参考筛查参数有：离子质量偏差 < 5 ppm、谱库匹配和共流出得分均 > 70 且 $S/N > 3$ 。

后期需要进一步通过其它方式确认，比如GC-QTOF-MS使用低能量EI源或CI源，UPLC-QTOF-MS使用Dual AJS ESI源或APCI源，获取化合物的分子离子峰。将初步鉴定的分子离子 m/z 作为母离子，在靶向MS/MS模式下生成未知物的精确质量产物离子谱图。将MS/MS数据导入分子结构关联(MSC)软件，通过二级质谱的碎片信息对完全未知的污染物进行识别。通过添加场地特征污染物对应的同位素标记内标，根据所鉴定产物与内标的质谱峰相对丰度对其进行半定量。

C.8 精密度和准确度

C.8.1 精密度

血清样本中VOCs：6家实验室分别对VOCs加标浓度为0.50 ng/ml、1.0 ng/ml和5.0 ng/ml的统一血清样本进行了测定，实验室内相对标准偏差分别为：6.2%~25%，6.8%~29%和3.9%~22%；实验室间相对标准偏差分别为：18%~31%，5.6%~28%和12%~35%；重复性限范围分别为：0.11 ng/ml~0.33 ng/ml、0.14 ng/ml~0.37 ng/ml和0.33 ng/ml~0.65 ng/ml；再现性限范围分别为：0.12 ng/ml~0.46 ng/ml、0.26 ng/ml~0.78 ng/ml和0.48 ng/ml~1.02 ng/ml。

血清样本中SVOCs：6家实验室分别对SVOCs加标浓度为0.25 ng/ml、0.5 ng/ml和1.0 ng/ml的统一血清样本进行了测定，实验室内相对标准偏差分别为：4.4%~40%，3.5%~31%和2.7%~28%；实验室间相对标准偏差分别为：13%~39%，6%~34%和7%~33%；重复性限范围分别为：0.05 ng/ml~0.13 ng/ml、0.07 ng/ml~0.25 ng/ml和0.14 ng/ml~0.44 ng/ml；再现性限范围分别为：0.06 ng/ml~0.33 ng/ml、0.11 ng/ml~0.46 ng/ml和0.25 ng/ml~0.81 ng/ml。

血清样本中mVOCs：6家实验室分别对mSVOCs加标浓度为0.25 ng/ml、0.5 ng/ml和1.0 ng/ml的统一血清样本进行了测定，实验室内相对标准偏差分别为：5.7%~31%，4.9%~28%和1.9%~26%；实验室间相对标准偏差分别为：22%~41%，7.9%~36%和8.2%~29%；重复性限范围分别为：0.08 ng/ml~0.21 ng/ml、0.11 ng/ml~0.36 ng/ml和0.24 ng/ml~0.56 ng/ml；再现性限范围分别为：0.13 ng/ml~0.27 ng/ml、0.15 ng/ml~0.55 ng/ml和0.31 ng/ml~0.78 ng/ml。

血清样本中mSVOCs: 6家实验室分别对SVOCs加标浓度为0.25 ng/ml、0.5 ng/ml 和1.0 ng/mL的统一血清样本进行了测定, 实验室内相对标准偏差分别为: 5.3%~36%, 4.1%~29%和 3.6%~32%; 实验室间相对标准偏差分别为: 14%~34%, 18%~42%和21%~43%;重复性限范围分别为: 0.12 ng/ml~0.33 ng/ml、0.22 ng/ml~0.55 ng/ml和0.32 ng/ml~0.56 ng/ml; 再现性限范围分别为: 0.09 ng/ml~0.41 ng/ml、0.16 ng/ml~0.65 ng/ml和0.21 ng/ml~0.67 ng/ml。

尿液样本中mSVOCs: 6家实验室分别对mSVOCs加标浓度为1.0 ng/ml~5.0 ng/ml、4.0 ng/ml~20 ng/ml的统一尿液样本进行了测定, 实验室内相对标准偏差分别为0.14%~36.2%和0.34%~27.5%; 实验室间相对标准偏差分别为8.29%~34.4%和7.55%~35.4%; 重复性限范围分别为0.16 ng/mL~2.93 ng/mL和0.82 ng/mL~7.22 ng/ml; 再现性限范围分别为0.28 ng/mL~2.99 ng/mL和1.20 ng/ml~7.13 ng/mL。

尿液样本中mVOCs: 6家实验室分别对mVOCs加标浓度为3.06 ng/ml~2760 ng/ml、12.3 ng/ml~11000 ng/ml的统一尿液样本进行了测定, 实验室内相对标准偏差分别为1.00%~34.2%和0.50%~37.2%; 实验室间相对标准偏差分别为2.00%~29.0%和2.00%~36.0%; 重复性限范围分别为1.11 ng/ml~1770 ng/ml和3.48 ng/ml~8240 ng/ml; 再现性限范围分别为1.77 ng/ml~1830 ng/mL和6.34 ng/ml~9720 ng/ml。

C.8.2 准确度

血清样本中VOCs: 6家实验室对1 mL实际血清加标样本(VOCs浓度为2.0 ng/ml)分析测定。血清加标样本中目标物的加标回收率平均值范围为75%~125%。

血清样本中SVOCs: 6家实验室对1 mL实际血清加标样本(SVOCs浓度为1.0 ng/ml)分析测定。血清加标样本中目标物的加标回收率平均值范围为68%~120%。

血清样本中mVOCs: 6家实验室对1 mL实际血清加标样本(mVOCs浓度为2.0 ng/ml)分析测定。血清加标样本中目标物的加标回收率平均值范围为78%~130%。

血清样本中mSVOCs: 6家实验室对1 mL实际血清加标样本(mSVOCs浓度为2.0 ng/ml)分析测定。血清加标样本中目标物的加标回收率平均值范围为80%~122%。

尿液样本中mSVOCs: 6家实验室对4 mL实际尿液加标样品(mSVOCs浓度分别为1.0 ng/ml~5.0 ng/ml和4.0 ng/ml~20 ng/ml)分析测定。尿液加标样品中目标物的加标回收率平均值范围为63.8%~124%和72.5%~100%。

尿液样本中mSVOCs: 6家实验室对2 mL实际尿液加标样品(mVOCs浓度分别为3.06 ng/ml~2760 ng/mL和12.3 ng/ml~11000 ng/ml)分析测定。尿液加标样品中目标物的加标回收率平均值范围为87.0%~134%和94.2%~137%。

C.9 质量保证和控制

可疑物/非目标筛查分析的质量保证和质量控制措施应贯穿样品采集、前处理和净化、仪器分析和数据处理等全过程。

C.9.1 样品采集

1) 当样品送达实验室时, 建立明确的样品的接收标准, 纳入分析的样品须保证其采样过程和保存措施具有可追溯性; 所有样本均应附有志愿者问卷信息, 包括采样日期、样品类型(如, 点尿样、晨尿或24 h混合尿样等)、样品体积、添加的稳定剂, 以及其他可能影响分析结果的细节信息。

2) 采集血液或尿液样品的同时, 应设置现场空白(Field blank)以识别并排除采样、运输和保存过程中的背景干扰。现场空白的采集和保存条件均与实际样品相同, 仅将血液或尿液样品替换为超纯水或人工配制的基质; 其数量应至少为总样本数量的10%。

C.9.2 样品制备

1) 样品净化方法优化。样品前处理通过添加甲酸和甲醇(或其他有机溶剂)以尽可能去除血液或尿液内源性分子, 如蛋白质和脂类, 减少其对污染物或代谢产物测定的影响。样品净化方法可通过分析添加有内标物质的样品加以优化。

2) 提取效率和重复性。使用血液或尿液混合样品, 量或半定量分析添加的标准品和同位素标记的内标物质的提取效率和重复性, 以优化血液和尿液样品提取方法。

3) 基质效应优化。通过计算经前处理后、仪器分析前样品中添加内标物质与相同量的内标溶液的仪器响应比值,以评估基质组分引起的仪器响应抑制或增强(SSE)。SSE>100%为内标仪器响应增强,SSE<100%则为内标仪器响应抑制。响应抑制效应可能会直接影响样品中污染物或代谢物的检测;响应增强则可能导致污染物仪器响应(峰面积)归一化的半定量分析的准确度降低。

4) 程序空白样品。在样品制备过程中,污染物可能通过溶剂、实验用品和/或耗材而无意地引入到样品提取液中;应设置程序空白以监测实验过程中的背景干扰,并在数据处理时扣除程序空白污染。

C.9.3 内标物质

选择合适的内标物质是QA/QC的重要组成部分。通常采用同位素标记的化合物作为筛查分析内标物质;且理想情况下,内标物质与待测化合物的结构应是相同的,以确保分析过程中两者具有相同分配行为和仪器响应。进行可疑物筛查或非靶标筛查分析时,内标物质应结合项目预期筛查的化合物加以合理选择;确保每一类预期的化合物至少有一个内标,并确保内标物质的保留时间均匀覆盖色谱图或全部保留时间窗口。

C.9.4 仪器性能检查

GC-MS、GC-MS/MS和GC-QTOF-MS: 配制含有菲、1,3-二甲基萘和吡啶浓度均为50 µg/mL的混合溶液。用此标准溶液来检查气相色谱仪注射入口的惰性。菲、1,3-二甲基萘和吡啶的降解率不应超过15%。如果衰减过多或出现较差的色谱峰,则需要清洗或更换进样口,同时还应截取毛细管柱前端约5 cm。

HPLC-MS/MS和HPLC-QTOF-MS: 配制含有mSVOCs(A.3.15.5~A.3.15.8)和mVOCs(A.3.15.9)浓度分别为20 ng/mL~100 ng/mL和20 ng/mL~1000 ng/mL的混合溶液。用此标准溶液来检查仪器响应信号,如果衰减过多或出现较差的色谱峰,则需要清洗或更换毛细管。

C.9.5 校准曲线检查

初始校准曲线中目标化合物相对响应因子的相对标准偏差应不大于30%,或相关系数大于等于0.990。

每24小时分析一次校准曲线中间点浓度,其测定值和初始测定值的相对偏差应小于30%。

C.9.6 平行样本设置

每20个样品至少应分析1个平行样,浓度水平在定量下限以上的平行样测定结果的相对偏差应小于40%。

C.9.7 基质加标实验

每批样品至少做1个基体加标样,加标浓度为原样品浓度的1~5倍或曲线中间浓度点。

C.9.8 替代物的回收率

实验室应建立替代物加标回收控制图,按同一批样品(20至30个样品)进行统计,剔除离群值,计算替代物的平均回收率 \bar{p} 及相对标准偏差 s ,替代物的平均应控制在 $\bar{p} \pm 3s$ 内。

附录 D

(资料性)

人体血液和尿液中内源性代谢物非靶向筛查分析方法

D.1 适用范围

本标准为人體血液和尿液中多种内源性代谢物非靶向筛查分析方法提供参考。本标准为人體血液和尿液样品制备、非靶向筛查鉴定方法、数据质量保证和控制提供必要信息。

D.2 实验原理

基于高分辨LC-MS/MS非靶向代谢组学平台，对血液和尿液生物样本中提取到的代谢小分子化合物进行大规模、无偏向性检测，将代谢物的全扫描碎片图谱与本地标准品二级谱图数据库进行匹配得到物质鉴定结果。

D.3 试剂与材料

D.3.1 乙腈 (C₂H₃N)：色谱纯。

D.3.2 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

D.3.3 乙酸铵 (CH₃COONH₄)：色谱纯。

D.4 仪器与设备

D.4.1 超高效液相色谱-串联飞行时间质谱联用仪：质谱具有电喷雾电离源 (ESI)。

D.4.2 色谱柱：酰胺基色谱柱，长100 mm，内径2.1 mm，膜厚为1.7 μm，或其它等效毛细管色谱柱。

D.4.3 低温高速离心机。

D.4.4 超纯水系统。

D.4.5 冷冻干燥仪。

D.4.6 超声仪。

D.5 样品

D.5.1 试样的制备

血液样本制备：血液在4℃下缓慢解冻后，取100 μl血液样品加入预冷甲醇/乙腈/水溶液 (2: 2: 1, v/v)，涡旋混合，低温超声30 min，-20℃静置10 min，14000 g 4℃离心20 min，取上清真空干燥，质谱分析时加入100 μl乙腈水溶液 (乙腈: 水=1:1, v/v) 复溶，涡旋，14000 g 4℃离心15 min，取上清液进样分析。

尿液样本制备：尿液在4℃下缓慢解冻后，取100 μl尿液样品加入300 μl预冷甲醇水溶液，涡旋混合，-20℃静置10 min，14000 g 4℃离心15 min，取200 μl上清真空干燥3h。质谱分析时加入100 μl甲醇水溶液 (甲醇: 水=1:4, v/v) 复溶，涡旋，14000 g 4℃离心15 min，取上清液进样分析。

D.5.2 空白试样的制备

用超纯水替代血液按照试样的制备 (E.5.1) 制备实验室空白试样。

D.5.3 质控样本的制备

质控样本 (QC) 从待测样本取等量体积混合而成。

D.6 试验步骤

色谱参考条件：样品采用超高效液相色谱系统和酰胺基色谱柱进行分离；柱温40℃；流速0.5 ml/min；进样量5 μl；流动相组成A：水+25 mM乙酸铵+25 mM氨水，B：乙腈；梯度洗脱程序如下：0~0.5 min，

95% B; 0.5~7 min, B从95%线性变化至65% ; 7~8 min, B从65%线性变化至40%; 8~9 min, B维持在40% ; 9-9.1 min, B从40%线性变化至95%; 9.1~12 min, B维持在95%; 整个分析过程中样品置于4℃自动进样器中。

质谱参考条件: 质谱选用电喷雾离子源 (ESI), 采用正负离子模式进行扫描, 离子源温度600℃, 离子源电压 (ISVF) ± 5500 V; 一级质谱扫描范围为 m/z 50~1100 Da, 产物离子扫描范围为 m/z 50~1000 Da, 一级质谱扫描谱图采集速率为每张谱图0.5 s, 产物离子扫描谱图采集速率为每张谱图0.25 s; 二级质谱采用数据非依赖型采集 (IDA) 获得, 选用高灵敏度模式; 喷嘴电压1000V, 干燥气温度320℃; 碰撞能量梯度为10、20和40 eV; 去簇电压 (DP) ± 60 V (正负两种模式)。

D.7 试验数据处理

D.7.1 数据预处理

全谱数据经过格式转换后, 采用XCMS软件进行预处理, 包括峰对齐、保留时间校正和提取峰面积, 最终生成包括质荷比 (m/z)、保留时间和代谢物峰面积的三维数据矩阵。对XCMS提取得到的数据首先进行代谢物结构鉴定及数据预处理, 然后进行实验数据质量评价, 最后再进行数据分析。

D.7.2 代谢物鉴定

通过与本地数据库中代谢物的保留时间、精确分子质量 (分子质量误差在 <25 ppm内)、同位素形式、二级碎裂谱图、碰撞能等信息进行匹配, 对生物样本中的代谢物进行结构鉴定, 并对鉴定结果进行严格的人工二次核对、确认, 并按照MSI的标准提供代谢物鉴定等级确定代谢物的鉴定等级。

D.7.3 统计分析

组间差异分析: 运用单变量统计分析方法, 如变异倍数分析 (Fold Change Analysis, FC Analysis)、T检验/非参检验, 找出显著差异代谢物。运用多元统计的方法, 如主成分分析PCA、偏最小二乘判别分析PLS-DA分析、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等分析方法, 从总体水平反映组间差异以及反映组内的变异度, 在最大程度保留原始信息的基础上对采集的多维数据进行降维分析。

筛选差异代谢物: OPLS-DA模型得到的变量权重值 (Variable Importance for the Projection, VIP) 能够用于衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力, 挖掘具有生物学意义的差异脂质分子。通常VIP >1 的代谢物被认为在模型解释中具有显著贡献。

差异代谢物生物信息学分析: 对筛选到的显著性差异代谢物进行后续的生物信息学分析, 包括聚类分析、相关性分析、通路分析等内容。

生物标志物筛选: OPLS回归分析通过模型质量, 反映数据组与目标参数相关程度; 通过建立实际值与预测值的散点图, 反映回归模型的预测能力; 通过VIP值, S-Plot等变量分析工具, 从众多变量中筛选出影响比较大的变量, 作为后期优化、考察的对象。

D.8 质量保证和控制

质控样本 (QC) 用于测定进样前仪器状态及平衡色谱-质谱系统, 也用于评价整个实验过程中的系统稳定性。为避免仪器检测信号波动而造成的影响, 采用随机顺序进行样本的连续分析。样本队列中插入QC样品, 用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。具体步骤如下:

D.8.1 总离子流图的比较

将QC样本总离子流图 (Total ion chromatogram, TIC) 进行谱图重叠比较, 若各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠, 说明在整个实验过程中仪器误差引起的变异较小。

D.8.2 物质残留情况

通过对空白样品的检测可以考察在检测过程中物质残留情况。若空白样品无显著峰检出, 说明物质残留控制的较好, 不存在样品间的交叉污染。

D.8.3 主成分分析

将所有实验样本QC样本提取得到的峰进行PCA分析。若正、负离子模式下QC样本紧密聚集在一起，说明实验的重复性好。

D.8.4 相关性分析

对QC样本进行Pearson相关性分析，一般相关性系数大于0.9表明相关性较好。

D.8.5 Hotelling's T² 检验

Hotelling's T² 检验通过多元变量建模对样本进行检验，定义了95%或99%置信区间，可用于离群样本的诊断。若QC样本均在99%置信区间内，说明实验的重复性好。

D.8.6 多变量控制图

多变量控制图（Multivariate Control Chart, MCC）是基于QC样本检测到的离子峰建立的多元变量统计学模型，是用于监控和判断仪器状态是否稳定的一种质量管理工具。多变量控制图中的每个点代表一个QC样本，X轴是所有QC样本的上机顺序。由于仪器状态的波动，图中的点呈现上下波动的情况。一般QC样本的波动在正负3个标准差范围内，反映仪器的波动在正常范围内，数据可用于后续分析。

D.8.7 相对标准偏差

QC样本离子峰丰度的相对标准偏差（RSD）越小，表明仪器的稳定性越好，是反映数据质量好坏的一个重要指标。若QC样本中RSD ≤ 30%的Peak数目占QC样本总Peak数目的比例在80%以上，表明仪器分析系统稳定性较好，数据可以用于后续分析。
