

代谢组学研究技术进展

胡正青^a, 林夏珍^a, 郭明^{b*} (浙江林学院, a. 园林学院; b. 理学院化学系, 浙江 临安 311300)

摘要: 目的 介绍代谢组学研究技术的最新进展。方法 综合国内外文献报道, 介绍当前代谢组学研究中样品制备、仪器分析技术、数据处理方法和结果分析的最新研究概况。结果 代谢组学研究技术取得了一定进步, 拓宽了代谢组学的应用范围。结论 自动化、标准化、整合化和完整化将是代谢组学研究技术的发展方向。

关键词: 代谢组学; 研究进展; 系统生物学; 分析技术; 综述

中图分类号: Q591 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)06-0485-06

Advances in Research Techniques of Metabonomics

HU Zhengqing^a, LIN Xiaozhen^a, GUO Ming^{b*} (*Zhejiang Forestry University, a. School of Landscape Architecture, b. Department of Chemistry, Lin'an 311300, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the new advances in research techniques of metabonomics. **METHODS** Make a summary of both national and overseas papers about metabonomics, and introduce the latest development in sample preparation, instrument analytical techniques, data processing and results analysis. **RESULTS** Research techniques of metabonomics have made certain progress and extend applied fields of metabonomics. **CONCLUSION** Automation, standardization, integration of multi-disciplinary and completeness will be the orientation for the future development of metabonomic techniques.

KEY WORDS: metabonomics; research evolution; systems biology; analytical technique; review

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后迅速发展起来的一门新兴学科, 它以生物系统中的代谢产物(由于实际分析手段的局限性, 目前主要针对相对分子质量 1 000 以下的小分子)为分析对象, 以高通量、高灵敏度、高分辨率的现代仪器分析方法为手段, 结合模式识别等化学计量学方法, 分析生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化规律。英文文献中, 早期的代谢组学研究使用了两个不同的术语: *metabolomics* 和 *metabonomics*。前者侧重以单个细胞作为研究对象, Fiehn 等^[1]将其定义为定性和定量分析单个细胞或单一类型细胞的代谢调控和代谢流中所有低分子量的代谢产物。后者一般以动物的体液和组织为研究对象, Nicholson 等^[2]将其定义为生物体对病理生理或基因修饰等刺激产生代谢物质动态应答的定量测定。随着代谢组学的研究发展, 不管是在植物和微生物研究领域,

还是在病理生理研究领域, 这两个名词已经基本等同使用。目前国内的代谢组学研究小组达成共识, 以 *metabonomics* 来表示“代谢组学”。

在代谢组学的研究过程中, 代谢组学的一些相关概念也不断被提出来, 目前已获得广泛认同的研究层次有: ①代谢物靶标分析; ②代谢轮廓(谱)分析; ③代谢指纹分析; ④代谢组学。严格地说, 只有第 4 层次才是真正意义上的代谢组学研究, 但是目前还没有发展出一种可以涵盖所有代谢物而不管分子大小和性质的代谢组学技术。

代谢组学相对于其他组学更能反映生物体的整体信息, 这是因为代谢物处于生物系统生化活动调控的末端, 反映的是已经发生了的生物学事件, 基因表达和蛋白质的变化对系统产生的影响都可在代谢物水平上得到体现, 所以从理论上来说, 代谢组学分析所提供的信息更能够揭示生物体系生理和生化功能状态, 对进行功能基因组的研究提供了极大便利。代谢组学与转录组学和蛋

基金项目: 中国博士后科学基金项目(20080440212)

作者简介: 胡正青, 女, 硕士生 E-mail: qingcao360@163.com
E-mail: guoming@zjfc.edu.cn

*通信作者: 郭明, 男, 教授 Tel: (0571)63740852

白质组学等其他组学相比,具有以下优点^[3]:①代谢物可以反映基因和蛋白表达的微小变化;②代谢组学的研究不需进行全基因组测序或建立大量表达序列标签的数据库;③代谢物的种类远少于基因和蛋白质的数目;④研究中采用的技术更通用,因为代谢产物在各个生物体系中都是相似的。

目前代谢组学已在药物毒性和机制研究^[4]、微生物^[5]、植物研究^[6]、疾病诊断^[7]、营养学^[8]、中药成分的安全性评价^[9]等领域获得了广泛应用,并且取得了一定成效,为功能基因组学的研究奠定了一定基础,成为系统生物学不可分割的一部分。

1 代谢组学研究技术的近期动态

代谢组学分析的方法及技术程序,在不同的研究领域各有特点,但一般包括样品的制备和预处理、样品分析、数据采集和数据分析等流程。在实际情况中,根据研究对象、研究目的等不同,具体步骤会有所不同。下面对代谢组学分析流程中分析方法的近期动态进行表述。

1.1 样品制备和预处理进展

样品制备和预处理是代谢组学研究的初始步骤,也是最重要的步骤之一。随着代谢组学发展的需要,样品制备过程中考虑的因素越来越多,呈现出分类制样、分层制样、局部到全景式制样的趋势。在收集样品时考虑了收集的时间、部位、种类、样本群体等因素;在研究活体样本时,还考虑了饮食、性别、年龄和地域等诸多因素的影响。样品制备后的样品预处理对于代谢组学的分析具有至关重要的意义,不少研究工作聚焦在代谢组学的样品预处理上。例如:Alzweiri等^[10]比较了不同有机试剂处理血液和尿液样品的效果,结果显示乙腈和丙酮去除血样中蛋白效果要高于甲醇和乙醇,4种试剂去除尿中盐的效果差别不大。同时,随着代谢组学研究思路的拓展和技术的发展,生命科学的多个领域都相继参与到代谢组学的研究中,在代谢组学的样品预处理中就有学者引入其他学科的方法,例如:Webb-Robertson等^[11]在尿液预处理时,考虑了化学试剂叠氮化钠的杀菌作用,将其加入到待处理尿液中,有效防止了细菌污染;在气相色谱-质谱研究中,为了提高低挥发性代谢产物的衍生化效率,有学者将相转移催化技术(phase transfer catalysis, PTC)^[12]用于样品预处理,使分析物与离子对试剂形成离子对,溶解于有机相中,提高了衍生化效率,利于后续

的仪器检测。Kind等^[13]在尿液预处理上,考虑了生物酶的降解作用,采用尿素酶分解尿中含量很高的尿素,使一些被掩盖的信息表现出来等等。

1.2 代谢组学仪器分析技术的现状及进展

依据代谢物物理化学参数的差异,采用不同的仪器分析方法,力求满足高选择性、高灵敏度、高通量、多维、动态、多参量的特点。早期的方法多使用单一仪器对简化的生物体系代谢产物进行分析,但是由于代谢产物的复杂性和多样性,单一的分析技术很难对它们进行无偏向的全面分析。随着代谢组学分析技术的发展,出现了多种联用仪器方法,多种组合仪器方法,几乎能够使用的实验仪器方法均已出现在代谢组学研究中,例如:色谱、质谱、核磁共振、红外光谱、电化学检测、紫外吸收、荧光散射、放射性检测和光散射等分离分析手段及其组合技术。但是在代谢组学研究中,典型的分析手段仍然是核磁共振技术、色谱、质谱及其联用技术。

1.2.1 核磁共振(NMR)技术的现状及进展 NMR是当前代谢组学研究中的主要分析技术,特别是¹H-NMR,对含氢代谢产物均有响应,能完成代谢产物中大多数化合物的检测,满足了代谢组学对尽可能多化合物检测的目标,它所产生的波谱可检测血浆、尿液、胆汁等生物基质中具有特殊意义的微量物质的异常成分。但同时¹H-NMR技术也具有两个明显的缺陷:灵敏度仍然不够高、分辨率低。近期,¹³C-NMR技术的应用,提高了其分辨率^[14]。新发展的魔角旋转技术(magic angle spinning, MAS)使得人们可以研究以前难以用液体NMR研究的样品,如器官组织样品,得到完整的高分辨图^[15]。活体磁共振波谱和磁成像等技术,能够无创、整体、快速地获得机体某一指定活体部位的NMR谱,直接鉴别和解析其中的化学成分^[16]。液相色谱-核磁共振联用技术也出现在代谢组学的研究中,Daykin等^[17]利用LC-NMR技术,用于分析血中脂蛋白的代谢产物,为心血管疾病的研究提供了一定依据。此外,采用二维核磁共振(2D-NMR)^[18]可减弱复杂生物样品中大分子信号的干扰,提高小分子物质的检测能力。

1.2.2 质谱(MS)技术的现状及进展 相对于NMR灵敏度低、检测动态范围窄等弱点,MS具有较高的灵敏度和专属性,可以实现对多个化合物的同时快速分析与鉴定。相关MS技术的主要进展简述

如下:

傅立叶离子回旋共振-质谱(FTICR-MS):具有超高分辨率和准确度,可以配备大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、纳升级电喷雾(electrospray ionization, nano-ESI)和基质辅助激光解吸(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)等各种离子源,使核酸或蛋白质、多肽等不易挥发的生物大分子产生汽化的带单电荷或多电荷的分子离子,在未知物确定上发挥了很大的作用^[19]。

直接输注大气压电离质谱技术(DI-MS):在代谢指纹的快速扫描中,除了常规的NMR和分子振动光谱等方法外,近年来一些适合于直接进样的质谱(direct infusion MS)分析技术^[20]得到了发展,其采用的“软”电离技术能很好地提供分子离子的指纹图。

基于多孔硅表面的解吸离子化技术(DIOS):电喷雾解吸电离(desorption electrospray ionization, DESI)质谱技术(ambient MS)^[21-22]在常压下能将表面吸附的分析物进行解吸电离,无需样品前处理,也不受基体背景干扰,从而实现MS对复杂样品的原位、高通量、非破坏分析,获得更直接和全面的样品信息。

1.2.3 色谱-质谱联用技术及其进展 色谱-质谱联用技术兼备色谱的高分离度、高通量及质谱的普适性、高灵敏度和特异性,越来越多的研究工作将色谱-质谱联用技术用于代谢组学研究。以下综述了主要的色谱-质谱联用技术及其最新动态。

气相色谱-质谱(GC-MS):采用GC-MS可以同时测定几百个化学性质不同的化合物,包括有机酸、大多数氨基酸、糖、糖醇、芳胺和脂肪酸。GC-MS具有较高的分辨率和检测灵敏度,并且有可供参考、比较的标准谱图库,可用于代谢产物的定性。但是GC不能直接得到体系中大多数难挥发代谢组分的信息,不能分析热不稳定物质和一些大分子代谢产物,对于挥发性较低的代谢产物需要衍生化处理,预处理过程繁琐。相转移催化技术(PTC)的利用,提高了衍生化的效率^[12]。还有最近发展起来的二维GC(GC×GC)-MS技术,由于其具有分辨率高、峰容量大、灵敏度高及分析时间短等优势,而备受代谢组学研究者的青睐^[23]。

液相色谱-质谱(LC-MS):相对于GC-MS,LC-MS能分析更高极性和更高相对分子质量的化

合物,已被越来越多地用于代谢组学研究^[24-25],它非常适合于生物样本中复杂代谢产物的检测和潜在标记物的鉴定。LC-MS一个很大优势是它大多数情况下不需要对非挥发性代谢物进行化学衍生。过去几年,LC-MS技术中的软电离方式使得质谱仪更加完善和稳健,尤其是最近几年,超高效液相色谱(UPLC)/高分辨飞行时间质谱(TOFMS)技术^[26-27]及联机的MarkerLynx自动化数据处理软件的应用为复杂生物混合物提供了更好的分离分析能力;另一方面,现代离子阱多级质谱仪的发展使LC-MS可提供未知化合物的结构解析信息^[28];最近,Plumb等^[29]利用UPLC/MSE方法,在单次分析中提高了常规MS/MS模式的数据采集效率。

毛细管电泳-质谱(CE-MS):毛细管液相色谱-质谱联用技术^[30]也被用于代谢组学研究以提高代谢产物的检测灵敏度和通量。相对其他分离技术,CE-MS具有几个重要的优势:高效分离率、微量进样量(平均注射体积1~20 μL)以及快速分析。CE-MS的最大优点是它可在单次分析实验中分离阴离子、阳离子和中性分子,因此CE可以同时获得不同类代谢物的谱图^[31-33]。这使得它成为高通量非目标分析代谢组学研究中一个很有吸引力和发展前景的分析技术。Harada等^[34]研制了一种非常适用于代谢分析的以毛细管电泳与质谱联用为基础的方法,此方法利用压力辅助毛细管电泳和电喷雾电离质谱(PACE/ESIMS)手段,能同时分析磷酸糖、有机酸、核苷酸和辅酶A化合物等阴离子代谢产物。

电化学阵列检测(EC-Array)和质谱(MS)联用技术:已经广泛用于低分子量代谢产物的多组分分析,Gamache等^[35]在实验中发现,电化学质谱联用技术能够更广泛反映内源性代谢物的化学变化和浓度变化,有利于数据标准化,峰纯化和结构鉴定。

此外,傅立叶变换红外光谱(FT-IR)也被用于代谢组学研究以提高代谢产物的检测灵敏度和通量^[36]。每种技术都有其优缺点,多种技术联用提高了检测灵敏度。

1.3 代谢组学数据处理方法现状和进展

代谢组学得到的是大量、多维的信息,为了充分抽提所获得数据中的潜在信息,需将原始数据转变为适合于多变量分析的数据形式,代谢组

学研究中通常运用统计分析方法,对采集的多维海量信息进行压缩降维和分析,得到有用信息。常用的统计模式识别方法有监督法(supervised method)和非监督法(unsupervised method)。其中主成分分析法(principal components analysis, PCA)和偏最小二乘法(partial least squares, PLS)是最简单也是比较有效的模式识别方法。

数据处理中一些新的方法开发和应用,有力地推动了代谢组学的发展。Saude 等^[37]根据不同代谢物和内标物的不同纵向弛豫率,得到校正因子,对代谢物的定量结果进行校正,大大提高了定量准确率;在 Wiklund 等^[38]以 GC-MS 进行植物实验分类学研究中, OPLS(orthogonal PLS)分类模型能提高代谢组学数据有用信息的可视化和判别化程度, S-plot 作为一个能反映出代谢物与分类模型之间共方差和相关性的工具,被用于鉴别有统计学意义和生理学意义的代谢物;在线性最小二乘的基础上使用奇异值分解(singular value decomposition, SVD),能在一定程度上削弱峰重叠,有助于样品的定量分析和化学成分鉴定^[39]。同时,基于不同的分析技术,分别出现了一系列的相关软件^[40]。例如,针对 GC-MS 数据,产生的软件有 LECO 公司开发的 ChromaTOF 软件, Ion Signature Technology 公司开发的 IST 软件等;针对 LC-MS 数据,产生的软件有 Waters 公司开发的 MarkerLynx 软件, Agilent 公司开发的 Mass Hunter 软件等;针对 NMR 数据,产生的软件有 ProMetab, StePSM 等。

尽管目前国内外在代谢组学软件开发方面获得了不少进步,但是目前的研究成果尚无法满足代谢组学研究的需要,还需继续研究开发高效可靠的数据处理软件。

1.4 代谢组学结果分析的新动态

代谢组学的结果分析也是代谢组学分析的关键步骤,目前代谢组学的结果分析体现了整合趋势及由定性到定量的趋势。

1.4.1 整合分析 单独使用一种或者少数几种分析方法很难满足代谢组学研究的要求,所以整合策略已经成为一个很重要的趋势。同时对机体中不同来源的生物样品(尿样、血样、组织样等)进行代谢组学分析、数据比较和综合评价,可以使代谢组学的结果更完整、更准确;Nicholson 等^[41]将血样、尿样和肝脏组织样品分别进行代谢组学研

究,将研究结果整合来进行毒理研究,得到了更好的研究结果;Chen 等^[42]综合多种分析方法,对糖尿病进行了代谢组学分析;Coen 等^[43]在药物毒理学研究中,分析了被测试动物体内的肝脏组织、肝脏组织提取液和血液样本的代谢组分变化,综合这些信息揭示了给药动物体内的生理生化变化;Smilde 等^[44]在研究中整合了质谱分析的代谢组学数据,有利于整个生物体系的代谢物研究;Crockford 等^[45]在毒理学研究中将 NMR 和 UPLC-MS 数据整合,分析了代谢物的变化。

1.4.2 定量分析 定量分析一直是代谢组学研究者追求的一个目标,Fiehn 研究小组的一系列有关植物代谢网络的研究比较有代表性,他们用 GC-MS 方法对模板植物拟南芥的叶子提取物进行了研究,定量分析了 326 个化合物,并确定其中部分化合物的结构^[46]。目前很多研究者在代谢组学的定量分析方面取得了一定进展。Ferrario-Mery 等^[47]研究了烟草中关于碳氮的代谢途径,整合了该代谢路径中转录组、酶活性及代谢组学的相互关系,通过对 NH_4^+ 代谢过程中主要代谢物的定量分析,并整合先前关于氮在转录方面的知识,分析了谷氨酰胺合成酶在氮代谢过程中的作用。Wang 等^[48]在对神经管畸形研究中,根据先验知识锁定了一碳代谢循环通路,定量了 11 种关键代谢物,同时,也对同一样品进行代谢指纹谱分析,将定量结果加入到指纹谱结果中进行问题的说明。Bajad 等^[49]在用 LC-MS/MS 分析时,同时使用非同位素内标和同位素内标来实现定量,共定量了 141 种化合物,其中包含了氨基酸和核苷酸代谢的许多相关物质。

2 展望

随着研究的深入,代谢组学的检测技术、数据分析技术和统计学分析方法等研究技术都得到了很大发展。代谢组学研究技术的不断发展和成熟,拓宽了代谢组学的应用范围,目前代谢组学在疾病分析、新药开发、植物基因功能和表型分析、营养学、药物毒性评价、中药安全性评价等方面都取得了一定成功。但从总体看,其研究技术还处于发展阶段,有许多问题值得探讨和解决,例如:全部定量分析的难以实现,更完备的代谢组学数据库的建立,分析技术测试灵敏度的提高,以及代谢组学数据与基因组学、转录组学、蛋白质组学、酶学等其他学科的数据整合等。如何实

现代组学研究技术的多学科整合化、自动化、完整化和标准化，是未来代谢组学研究技术的发展方向。

REFERENCES

- [1] FIEHN O, KOPKA J, DORMANN P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 57-61.
- [2] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [3] TAYLOR J, KING R D, ALTMANN T, et al. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(Suppl 2): 241-248.
- [4] KEUN H C. Metabonomic modeling of drug toxicity [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(1-2): 92-106.
- [5] BUCHHOLZ A, HURLEBAUS J, WANDREY C, et al. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics [J]. *Biomol Eng*, 2002, 19(1): 5-15.
- [6] DIXON R A, GANG D R, CHARLTON A J, et al. Perspective-applications of metabolomics in agriculture [J]. *Agric Food Chem*, 2006, 54(24): 8984-8994.
- [7] ORESIC M, VIDAL-PUIG A, HANNINEN V. Metabolomic approaches to phenotype characterization and applications to complex diseases [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6(4): 575-585.
- [8] SCHNEIDER H, MA L, GLATT H. Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 789(2): 227-237.
- [9] LIU C X. Systems biology and modern research of traditional Chinese medicine [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报)*, 2006, 25 (4): 191-196.
- [10] ALZWEIRI M, WATSON D G, ROBERTSON C, et al. Comparison of different water-miscible solvents for the preparation of plasma and urine samples in metabolic profiling studies [J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 1060-1065.
- [11] WEBB-ROBERTSON B J M, LOWRYA D F, JARMAN K H, et al. A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabonomic analyses [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3-4): 830-836.
- [12] KAAL E, KONING S, BRUDIN S, et al. Fully automated system for the gas chromatographic characterization of polar biopolymers based on thermally assisted hydrolysis and methylation [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1201(2): 169-175.
- [13] KIND T, TOLSTIKOV V, FIEHN O, et al. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer [J]. *Anal Biochem*, 2007, 363(2): 185-195.
- [14] KEUN H C, EBBELS T M D, ANTTI H, et al. Analytical reproducibility in ¹H NMR-Based metabonomic urinalysis [J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15(11): 1380-1386.
- [15] GRIFFIN J L, CEMAL C K, POOK M A. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3 [J]. *Physiol Gen*, 2004, 16(3): 334-340.
- [16] BOLLARD M E, STANLEY E G, LINDON J C, et al. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition [J]. *NMR Biomed*, 2005, 18 (3): 143-162.
- [17] DAYKIN C A, CORCORAN O, HANSEN S H, et al. Application of directly coupled HPLC NMR to separation and characterization of lipoproteins from human serum [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(6): 1084-1090.
- [18] WIDARTO H T, MEIJDEN E V D, LEFEBER A W M, et al. Metabolomic differentiation of brassica rapa following herbivory by different insect instars using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *J Chem Ecol*, 2006, 32(11): 2417-2428.
- [19] BROWN S C, KRUPPA G, DASSEUX J L. Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24(2): 223-231.
- [20] DUNN W B, BAILEY N J C, JOHNSON H E. Measuring the metabolome: current analytical technologies [J]. *Analyst*, 2005, 130(5): 606-625.
- [21] TAKÁTS Z, WISEMAN J M, GOLOGAN B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306(5695): 471-473.
- [22] COOKS R G, OUYANG Z, TAKATS Z, et al. Ambient mass spectrometry [J]. *Science*, 2006, 311(5767): 1566-1570.
- [23] LENZ E M, WILSON I D. Analytical strategies in metabolomics [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 443-458.
- [24] WILSON I D, PLUMB R, GRANGER J, et al. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 817(1): 67-76.
- [25] WAGNER S, SCHOLZ K, SIEBER M, et al. Tools in metabolomics: an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(7): 2918-2926.
- [26] YIN P Y, ZHAO X J, LI Q R, et al. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS) [J]. *Proteome Res*, 2006, 5(9): 2135-2143.
- [27] WILSON I D, NICHOLSON J K, CASTRO-PEREZ J, et al. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies [J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(2): 591-598.
- [28] TOLSTIKOV V V, FIEHN O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2002, 301(2): 298-307.
- [29] PLUMB R S, JOHNSON K A, RAINVILLE P, et al. UPLC/MS(E): a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(13): 1989-1994.
- [30] GRANGER J, PLUMB R, CASTRO-PEREZ J, et al. Metabonomic studies comparing capillary and conventional HPLC-oa-TOF MS for the analysis of urine from Zucker obese rats [J]. *Chromatographia*, 2005, 61(7-8): 375-380.
- [31] BRITZ-MCKIBBIN P, TERABE S. High-sensitivity analyses of metabolites in biological samples by capillary electrophoresis using dynamic pH junction-sweeping [J]. *Chem Record*, 2002, 2(6): 397-404.
- [32] SOGA T, OHASHI Y, UENO Y, et al. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2003, 2(5): 488-494.
- [33] SOGA T, UENO Y, NARAOKA H, et al. Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(24): 6224-6229.
- [34] HARADA K, FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. Pressure-

- assisted capillary electrophoresis mass spectrometry using combination of polarity reversion and electroosmotic flow for metabolomics anion analysis [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(5): 403-409.
- [35] GAMACHEA P H, MEYERA D F, GRANGERA M C, et al. Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15(12): 1717-1726.
- [36] JOHNSON H E, BROADHURST D, KELL D B, et al. High-throughput metabolic fingerprinting of legume silage fermentations via fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1583-1592.
- [37] SAUDE E J, SLUPSKY C M, SYKES B D. Optimization of NMR analysis of biological fluids for quantitative accuracy [J]. *Metabolomics*, 2006, 2(3): 113-123.
- [38] WIKLUND S, JOHANSSON E, SJOSTROM L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-Based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(1): 115-122.
- [39] XU Q W, SACHS J R, WANG T C, et al. Quantification and identification of components in solution mixtures from ¹D proton NMR spectra using singular value decomposition [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(20): 7175-7185.
- [40] LU H M, LIANG Y Z. The development of analytical technologies and data mining in metabolomics [J]. *J Instrum Anal (分析测试学报)*, 2008, 27(3): 325-332.
- [41] WATERS N J, WATERFIELD C J, FARRANT R D, et al. Integrated metabolomic analysis of bromobenzene-induced hepatotoxicity: novel induction of 5-oxoprolinosis [J]. *Proteome Res*, 2006, 5(6): 1448-1459.
- [42] CHEN J, ZHAO X J, FRITSCHKE J, et al. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabolomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(4): 1280-1289.
- [43] COEN M, LENZ E M, NICHOLSON J K, et al. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy [J]. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16(3): 295-303.
- [44] SMILDE A K, WERF M J, BIJLSMA S, et al. Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(20): 6729-6736.
- [45] CROCKFORD D J, HOLMES E, LINDON J C, et al. Statistical heterospectroscopy, an approach to the integrated analysis of NMR and UPLC-MS data sets: application in metabolomic toxicology studies [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(2): 363-371.
- [46] HALL R, BEALE M, FIEHN O, et al. Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1437-1440.
- [47] HIRAI M Y, KLEIN M, FUJIKAWA Y, et al. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25590-25595.
- [48] WANG Y, ZHANG H Y, LIANG Q L, et al. Simultaneous quantification of 11 pivotal metabolites in neural tube defects by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 863(1): 94-100.
- [49] BAJAD S U, LU W Y, KIMBALL E H, et al. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1125(1): 76-88.