

· 指南与共识 ·

气相色谱-质谱联用技术尿液多种有机酸检测专家共识*

杨江涛 曾伟宏 田国力 赵明 江剑辉* 王治国*

中国妇幼保健协会遗传代谢病和维生素代谢专业委员会;

中国医院协会临床检验专业委员会出生缺陷防控实验技术与管理学组;

深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心;《罕少疾病杂志》编辑委员会

【摘要】随着气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)检测尿液有机酸越来越广泛地用于辅助遗传代谢病诊断和高危筛查,开展GC-MS检测尿有机酸的实验室越来越多。国家卫生健康委临床检验中心于2017年启动了临床实验室GC-MS检测室内质评活动,但各实验室检测技术水平参差不齐,实验室检测技术和临床应用缺乏统一标准。因此,国家卫生健康委临床检验中心新生儿疾病筛查室内质评专家委员会组织专家,就GC-MS检测尿液中有机酸的实验室检测技术、相关试剂及内标设置、基于专用软件的检测指标及其参数体系、标准操作流程及质控管理等进行讨论,形成共识,报道如下。

【关键词】气相色谱-质谱联用技术;有机酸;尿液;有机酸尿症;遗传代谢病

【中图分类号】R589

【文献标识码】A

【基金项目】国家重点研发计划(2016YFC1000307-15);深圳市科技创新委员会基础研究学科布局项目(JCYJ20180507183428877: 20180253);深圳市工程研究中心(工程实验室)组建项目(F-2020-Z99-502615)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.08.001

Consensus of Experts on Detection of Various Organic Acids in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

YANG Jiang-tao, ZENG Wei-hong, TIAN Guo-li, ZHAO Ming, JIANG Jian-hui*, WANG Zhi-guo*.

Committee of Genetic Metabolic Diseases and Vitamin Metabolism, Chinese Maternal and Child Health Association;

Experimental Technology and Management Group of Birth Defects Prevention and Control, Clinical Laboratory Committee, Chinese Hospital Association;

Shenzhen Rare Disease Engineering Research Center of Metabolomics in Precision Medicine; Editorial Committee of Journal of Rare and Uncommon Diseases

Abstract: With the increasingly widespread use of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the detection of urinary organic acids as an aid to the diagnosis of genetic metabolic diseases, more and more laboratories are carrying out GC-MS for the detection of urinary organic acids. The National Center for Clinical Laboratories launched an interstitial evaluation activity for GC-MS test rooms in China's clinical laboratories in 2017. However, the level of testing technology varies among laboratories, and there is a lack of uniform standards for laboratory testing technology and clinical application. In this regard, the inter-laboratory quality assessment committee of the National Center for Clinical Laboratories for Neonatal Disease Screening organized experts to discuss the laboratory testing techniques for GC-MS detection of organic acids in urine, the relevant reagents and internal standard settings, the detection index and its parameter system based on special software, the standard operating procedures and quality control management, and formed a consensus, which is reported below.

Keywords: Gas Chromatography-mass Spectrometry; Organic Acids; Urine; Organic Aciduria; Genetic Metabolic Disease

1 GC-MS技术应用概况

气相色谱技术(gas chromatography, GC)是一种经典的分析技术方法,该技术根据待测物质在被载气携带进入填充柱或毛细色谱柱中气相和固定相间分配系数的不同,各组分经过反复多次分配从而实现分离和依次出峰(定性)。质谱技术(mass spectrometry, MS)是一种通过检测目标样品带电离子的质荷比(m/z)来进行分析的方法。MS技术检测具有强特异性和高灵敏度的优势,质谱分析可提供丰富的结构及特征离子峰信息,可根据目标化合物质谱的特征离子峰来确定分子结构,也可通过谱库检索来定性。将GC与MS联合,则可对待测物质进行精准定性定量,称为气相色谱-质谱联用技术。GC-MS技术可用于分析尿液样本中数百种有机酸,自1966年Tanaka运用气相色谱-质谱联用技术报告首例异戊酸血症以来,已有250多种具有临床意义的有机酸指标被检出。尿液中有机酸的升高或异常出现与体内碳水化合物、脂肪酸、氨基酸、维生素、糖、电解质类的代谢紊乱或遗传代谢障碍导致底物贮积和旁路代谢物大量产生有关。基于尿液有机酸检测,很多遗传代谢病逐渐被发现。目前GC-MS较多用于有机酸尿症为主的遗传代谢病检测,逐步在多种遗传代谢病筛查诊断和出生缺陷防控中发挥作用^[1-4]。GC-MS检测技术具有高特异性、高灵敏度、高准确性、高通量、快速、自动化等优点,已成为遗传代谢性疾病辅助诊断和高危筛查的重要手段之一,国外于20世纪70年代就开始应用于有机酸尿症的筛查诊断,我国近20年来逐步引进GC-MS技术,尤其是近三年来步伐明显加快,全国各地开展GC-MS遗传代谢病检测的实验室越来越多,大家对遗传代谢病的关注也越来越多,帮助很多遗传代谢病患者获得了正确的诊断与治疗^[5-7]。

2 GC-MS实验室检测技术

GC-MS是对尿样多种有机酸进行检测的一种新技术。在尿液或尿滤纸片复溶液样本中加入稳定内标,经过一段时间的酶化反应后进行有机溶剂液萃取,转移提取物氮气流吹干,衍生化后用GC-MS仪进行分析,使用GSMS数据库检测系统进行数据分析。

2.1 检测原理 GC-MS由气相色谱仪和单级四级杆质谱仪两个部分组成,利用气相色谱仪的分离能力对尿中多种有机酸代谢物有效分离后,再通过质谱部分鉴

定分离的组分(定性),基于内标技术半定量计算出相应含量。由于尿液中代谢终产物浓度高于血液,且尿液样本可通过体外无创的方式进行收集,大部分尿液中的代谢产物具有容易挥发的特性,故而通过该分析技术检测尿液样本中的特异性代谢产物,可为遗传代谢病的筛查与诊断提供可靠依据。

气相色谱分析通常使用高纯氦气(He)为载气,在色谱柱中的固定相为吸附剂,利用吸附剂对待测样品中各组分的吸附力不同的特性以及亲和力、溶解度、阴滞等物理性质的不同,物质随载气移动经过一定时间后,不同组分在相对运动的两相中具有不同的分配系数即在色谱柱中的运行速度差异,基于以上原理对待测样本不同组分得以在色谱柱中实现分离。根据分离后各组分在色谱柱中保留时间不同进行待测样本的定性,其检测结果为不同色谱峰,不同时间段的色谱峰代表不同成分,色谱峰的丰度和响应值表示该成分含量的多少。

当通过色谱柱分离的各组分进入质谱后,分离后的这些中性化合物分子组分在质谱离子源中发生电离,产生不同质荷比的带电离子在四级杆电场的作用下形成离子束,由于每种化合物分子具有特殊的化学结构,故不同的化合物分子被电离后产生具有特征性的碎片离子,最后经质谱的质量检测器得到每个组分的碎片离子质量数分布图称为质谱图,检测得到的质谱图通过与美国国家标准与技术研究院(national institute of standards and technology, NIST)谱库的标准质谱图对比确定该组分是什么物质,即定性分析。再通过计算每个分析物和检测中同时加入的已知浓度内标物之间信号强度比率作半定量分析,最后将所有目标分析物与其特异性对应的疾病信息进行关联,基于正常人群化合物建立的参考区间,综合分析进一步推测罹患某种遗传性代谢病的可能^[8]。

质谱仪器建议由专人进行管理,周期性进行性能核查、使用记录登记和维护保养,并按照实验室要求制定相应的仪器操作、维护标准作业流程模板。仪器需贴有相关设备标识,内容应包括:仪器型号、用途、使用状态及检查周期等信息。

2.2 实验检测操作流程 依据《新生儿疾病筛查管理办法》(卫生部令第64号)及《新生儿疾病筛查技术规范》(2010版)的规范要求^[9-10],实验室检测工作流程符合规范,并制定从样本接收、报告解读以及随访复查全流程环节的操作标准,见图1^[11-13]。

【第一作者】杨江涛,男,化学分析中级工程师,主要研究方向:质谱及高通量测序贯穿组学前瞻性临床应用探索。E-mail: yangjiangtao@aonelab.com.cn

【通讯作者】江剑辉,男,主任医师,主要研究方向:儿童遗传代谢病。Email: jiangjianhui007@163.com

王治国,男,研究员,主要研究方向:临床检验室内质量评价。Email: zhiguo_w@sino.com

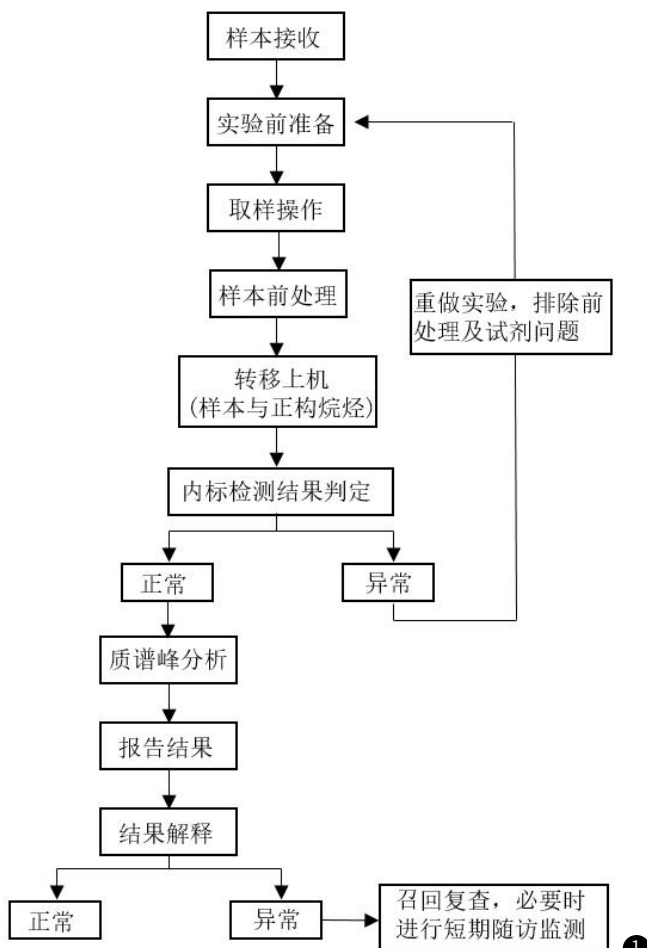


图1 GC-MS实验检测操作流程

3 试剂

3.1 试剂要求 (1)实验所需化学试剂均要求色谱级或以上; (2)配制各种试剂和标准溶液必须遵守操作规程, 试剂配制完成后及时贴标注明试剂名称、浓度、配制日期、批号、有效期和配置人; (3)试剂存管规范化: 专人负责, 分类存放, 并定期检查使用及余量情况。领用时需填写记录, 过期或失效试剂经审核后作报废处理; (4)建立危化品及易制毒试剂管理程序, 分类专柜存放, 由两人以上人员保管, 要填写相关实验记录, 保护人员安全^[14]。

试剂组成: 由尿素分解试剂、脲化反应试剂、液液萃取试剂、衍生化试剂组成。(1)尿素分解试剂: 尿素酶和超纯水按照一定比例混合组成; (2)脲化反应试剂: 盐酸羟胺、氢氧化钠及盐酸; (3)液液萃取试剂: 主要采用色谱纯乙酸乙酯; (4)衍生化试剂: N, O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺(含三甲基氯硅烷)(N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with Trimethylchlorosilane, BSTFA:TMC S=99:1), 如使用商品化检测试剂盒, 则按说明书进行相应操作。

3.2 内标 内标包含十七烷酸、托品酸, 二十四烷, 稀释液采用色谱纯乙酸乙酯, 使用稀释液将十七烷酸、托品酸和二十四烷配制为浓度分别为0.5mg/mL、0.5mg/mL和1mg/mL的混标溶液。选择这三种内标理由如下, 首先常规尿液中含量极低, 和代谢障碍没有关联, 样本前处理中硅烷化衍生后结构稳定, 不与目标有机酸发生反应, 且仪器分析中出峰时间分布整个分析过程的前、中、后段。以十七烷酸作为定量内标, 目标物有机酸的峰面积和十七烷酸峰面积进行比值, 得到半定量的结果; 托品酸及二十四烷作为内标质控, 可准确监测样本前处理和仪器分析是否符合质控要求。

3.3 样本 尿液样本: (1)干燥洁净容器采集新鲜随机中段尿液; (2)分装至容量为10mL的带盖EP管中; (3)样本量要求≥6mL(2mL 检测; 2mL 复检; 2mL 留样); (4)冰冻保存, 冷链运输至检测机构。

尿滤纸片^[15]: (1)专用滤纸片三片(新华3号滤纸, 规格4cm×4cm)完全浸透于尿液中; (2)样本量要求≥6mL(2mL 检测; 2mL 复检; 2mL 留样); (3)浸泡时间≥15min, 于干燥阴凉避光处晾干, 密封储存; (4)长期留样则冷藏密闭保存(温度≤-20℃), 建议优先使用原始尿液进行检测, 尿滤纸片便于样本长期保存和运输, 但尿滤纸片样本分析过程中, 由于增加了滤纸片制作及超纯水复溶等流程, 会造成不可预知的误差^[16]。

3.4 进样前处理

3.4.1 样本准备 样本前处理基于溶液进行, 如采用尿滤纸片, 则需要进行超纯水复溶, 流程如下: (1)取一片尿滤纸片, 剪至1cm×1cm合计16个碎片, 放置于10mL离心管中, 加入2.5mL超纯水, 浸泡10min; (2)离心4000rpm, 5分钟后, 取上清液(注意须无纸片残渣)。

3.4.2 尿肌酐测定^[17] 尿肌酐为尿液中最稳定的代谢产物, 本实验需采用0.2mg当量尿肌酐的尿液进行分析, 参考《尿中肌酐分光光度测定方法》(WS/T97-1996)标准, 采用紫外可见分光光度计对尿液或尿滤纸片复溶液中的尿肌酐进行定量检测。

3.4.3 前处理 取0.2mg肌酐当量的尿样后, 进行前处理, 流程包括除尿素、添加内标、脲化、液液萃取、氮吹、衍生、转移上机等。(1)加入尿素酶试剂, 37℃恒温孵育30分钟, 分解尿素, 消除干扰; (2)加入内标, 纯水定容至2mL; (3)加入脲化反应试剂, 室温下脲化反应20分钟; (4)色谱纯乙酸乙酯萃取2次, 充分混匀后离心, 转移至上层有机相至干净离心管; (5)60℃氮气吹干, 注意应避免吹干过度造成降解; (6)加入衍生化试剂, 70℃孵育30min; (7)待样本温度降至室温后, 转移至进样瓶内插管, 上机分析^[18-20]。

3.5 仪器与软件选择

3.5.1 仪器选择 首选用于新生儿遗传代谢病尿液有机酸的检测仪器是气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)。首先, 该仪器配备的电子电离源(electron ionization, EI)是最常用的离子化模式, 电离效率高, 谱图特征性和重复性好, 通过碎片模式可得到大量的结构信息, 被90%的气相色谱-质谱联用仪所采用。其次, 四级杆质量分析器适用于中小有机酸化合物的定性和定量分析, 实验人员可灵活配置和调用全扫描(full-scan)模式和选择离子扫描(selected ion monitoring, SIM)模式, 更好地服务于临床实验。最后, 选择气相色谱-质谱联用仪时, 需考虑: (1)精确度、检出限、离子化效率、离子源峰型、数据采集时间、分辨率、检测效率、背景噪声、灵敏度等; (2)仪器检测通量, 即每天可检测的标本量; (3)其他因素: 实验室使用习惯、仪器成本等。

3.5.2 软件选择 气相色谱-质谱联用仪需配备软件系统, 用于对检测样本进行分析。GC-MS尿液有机酸检测专用软件应最大程度简化数据分析流程, 具备以下特征: (1)可操控检测仪器(即自动进样器、气相色谱和质谱); (2)分析样本中各种有机酸目标物与内标的峰面积, 同时计算出多种分析物的半定量结果; (3)将分析物浓度与设定的正常参考区间进行自动比较, 显示标注超出正常参考区间的结果; (4)检测结果与患者信息自动匹配导出结果数据; (5)可快速批处理分析样本检测结果及单个样本快速分析; (6)允许设置定量积分参数进行检测结果校正^[21]。

3.5.3 数据采集模式选择 (1)全扫描采集模式(full scan): 在一定扫描质量范围(m/z)内, 对所有质量离子按照从小到大的顺序连续扫描, 可以得到最大的信息量, 并利用谱图进行检索。质谱仪采集尿液中所有有机酸衍生物质量数范围建议为50~500m/z, 扫描450个质量离子, 一次扫描循环时间为0.05s, 每个质量离子采集时间约0.11ms。采集时间需涵盖所有目标物有机酸出峰时间, 且需避开溶剂峰出峰后开始采集, 这样可以保护灯丝及检测器, 例如7.5~60min。(2)选择离子扫描模式(selected ion monitoring, SIM): 在选择离子扫描模式下, 对选定的某个或数个特征质量峰进行单离子或多离子检测, 获得这些离子流强度随时间的变化曲线的扫描。在一般情况下可用于已知检测物质的特征离子, 质谱图不能用于谱库检索。选择离子扫描方式只选择2~3个特征离子, 一次扫描循环时间同样为0.05s, 则每个质量离子的采集时间为16.7ms, 时间增加150倍, 相较于全扫描模式单个离子检测时间长、离子响应高、灵敏度高, 但检测的离子数有限。

实现一次进样完成尿液多种有机酸同时检测, 质谱仪必须具备快速扫描、连续循环扫描和跳跃循环扫描的能力, 以适应GC-MS的全扫描采集(full scan)和选择离子扫描模式(SIM), 并确保足够灵敏度, 质谱峰能进行谱库检索结合出峰时间双重定性化合物。

3.5.4 仪器校验 仪器调谐: 仪器只有在密封性、质量数、响应度良好的条件下才能保证分析结果可靠, 因此在首次装机或进行维护后对气质联用仪进行漏气检查及仪器调谐。打开灯丝, 通过对水峰、氮气峰、氧气峰的比例, 判定仪器是否存在漏气, 若漏气需检查进样口端、载气净化单元、色谱柱接口部分等部位排除漏气问题。不同品牌、型号的仪器调谐指标略有差异, 以日本岛津GC-MS-QP2020为例, 调谐指标有7点: (1)检查m/z 69、m/z 219、m/z 502的FWHM(半峰宽)值是否在0.5~0.7之间; (2)检查检测器电压是否有超过2kV; (3)检查基峰值是否为质荷比(m/z)18或69; (4)检查质荷比(m/z) 502的相对强度比率是否至少为2%; (5)检查质荷比(m/z) 69的峰强度是否至少是质荷比(m/z) 28峰强度的两倍; (6)检查峰形是否有明显的分叉, 峰型是否对称; (7)检查质荷比(m/z)理论值与实际测定值相差是否在0.1之内。性能验证: 仪器只有在灵敏度、重现性等状态良好的条件下才能保证分析结果的可靠。因此, 在首次装机或做全面性维护后需要对气质联用仪进行性能验证。不同品牌、不同配置的仪器所使用的性能验证标准不同, 以日本岛津GC-MS-QP 2020为例, 重复性性能验证时, 采用八氟萘(octafluoronaphthalene, OFN)100pg/μL, 连续5个数据峰面积重

现性CV%≤5.00%，保留时间重现性CV%≤1.00%；仪器检测限(instrumental detection limit, IDL)测试采用使用OFN 100fg/μL，连续8个数据IDL≤10 fg；灵敏度(EI源)测试采用OFN 1pg/μL(1ppb)，高灵敏度模式下要求信噪比(signal-noise ratio, S/N)≥1500。若使用其他品牌与型号的仪器，校准需按照相应的条件与标准来完成。仪器校准：每次检测样本前应当对仪器进行校准。校准通常采用正构烷烃混准液，根据正构烷烃的保留指数及保留时间计算目标物有机酸实际保留时间，从而排除因保留时间漂移对目标物有机酸定性的影响，使检测结果更准确。正构烷烃混标原液使用正己烷按照一定比例稀释至目标物浓度左右以获得日常校准液，日常校准液一般作为每天第一个样品进行检测分析，无需经过前处理，可直接上机分析。在检测完成时，对其总离子流图(TIC)峰形、离子强度和保留时间进行分析，用以评估仪器当前的性能状态。记录正构烷烃保留时间，用于计算目标物有机酸的保留时间。目标物有机酸的保留时间计算包含几个变量，需要将这些变量录入到数据处理软件的方法文件中，方能实现目标物有机酸保留时间的自动计算，计算公式如下： $RTT=RT_{cn}+(RT_{cn+1}-RT_{cn})*(RIT-R_{lcn})/(R_{lcn+1}-R_{lcn})$ 。注：RTT=目标组分保留时间；RIT=目标组分保留指数；RT_{cn}=第n个组分保留时间；R_{lcn}=第n个组分保留指数；RT_{cn+1}=第n+1个组分保留时间；R_{lcn+1}=第n+1个组分保留指数。

3.5.5 结果计算 目标物有机酸定性：(1)通过正构烷烃校准液校正保留时间，根据目标物有机酸保留时间初步定性；(2)使用NIST谱库或实验室自建谱库或商品化有机酸谱库中的标准质谱图对目标物有机酸进行相似度检索定性。目标物有机酸定量：通过测定有机酸目标物的峰面积与内标物十七烷酸峰面积求得比值×100，得到半定量结果^[15]。

3.6 检验程序确认和验证 遗传代谢病尿液检测的方法评估十分重要，用于确保目标样本中有有机酸的准确性与定量。方法评估包含检测方法调研、试剂采购、方法研发、检验程序确认及方法学验证。新建立的检测方法需具有先进性、科学性、准确性，应进行严格的灵敏度、精密度、准确度、特异性及检测范围方法评价，以评估检验效能。用于验证的实验样本为尿液或尿滤纸片复溶溶液，也可以是跨越可报告范围的质控品、标准品或者已完成检测的已知样本。如果该方法展示出如声明一样的检测性能，则认为其通过“验证”，可以用于临床服务。如果实验室修改了商业化体外诊断(in vitro diagnostic, IVD)试剂盒的操作方法，那么该方法应被归类为实验室自建方法(laboratory developed tests, LDT)，在临床应用前需执行完整的确认方案以建立性能指标。检测指标及其分析参数 基于仪器方法，分析有机酸指标(见表1)，如果新增有机酸标记物，则可在如下表格中酌情增加并进行验证。

4 切 值

切值建立与评估：每个实验室应建立本实验室尿液多种有机酸检测的切值，在指定的一段时间内，执行建立好的实验流程，大量检测样本，获得数据，结合串联质谱检测结果及基因确诊实验结果进行定期评估，以验证切值确立的正确性与合理性^[22]。

4.1 切值建立 切值建立应符合以下步骤：(1)方法确认：对已建立好的气质尿液有机酸检测方法进行确认，通过确认的方法才能用于检测切值建立。(2)样本分析：收集2000例以上健康婴儿样本及一定数量的阳性婴儿样本进行数据分析，样本根据年龄段分为新生儿期及非新生儿期。一些检测指标在新生儿中的检测切值与非新生儿有差异，故需要分别建立不同浓度切值。(3)切值验证：实验室初次建立的切值需与其它实验室及已发表的文献切值对比，若实验室新建立的切值与国内其它实验室切值结果相差较大时，需要分析原因，给予合理解释。(4)切值计算：推荐采用百分位数法计算切值，以排除检测指标浓度值非正态分布的影响。百分位数范围从98.0%~99.9%，具体取决于检测指标在疾病组和正常组分布的重叠情况。

4.2 切值评估 设定实验检测切值需持续评估验证。人体代谢检测指标可受多种因素影响：例如药物、特殊食物的摄入、疾病发展阶段差异等情况。故需综合分析待检测人员情况制定合适切值，尽可能降低假阳性及假阴性率的发生。当仪器型号、品牌、方法学、试剂发生更换或检测人群发生改变时，应当重新评估检测指标。

5 实验室质量控制

5.1 室内质量控制 (1)通过内标质控化合物二十四烷和托品酸实际保留时间、与十七烷酸峰面积比值，监测整个样本检测流程。(2)质控品的基质需为正常尿液，至少设定两个浓度值，浓度区间需包含目标化合物的切值。(3)质控品稳定性要求：通过商品化途径购买的质控品，其产品说明书中需标明靶值及适用范围、生产批号、有效期。实验室自配质控品需标注生产批号、生产日期、有效日期，-20℃以下冷冻保存。进行稳定性实验连续监测，确保质控品中化合物无降解情况，并建立每批次靶值及质控限。(4)质控品评价：购买的商品化质控品及实验室自制质控品在日常检测前需进行质控品合格评估：外观评估：质控品是否完全溶解，有无沉淀物。性能评估：进行多次质控测试(≥20次)，计算平

均值和标准偏差，按照质控可接受标准进行评价，评价不符合项需弃用重配。(5)质控规则：实验室应建立适用的质控规则用来监控随机误差和失控原因。选择Westgard多规则质控技术有6个质控规则，其中有些规则对随机误差敏感，有些对系统误差敏感，由此可提高系统误差的检出概率。绘制质控图每次质控结果做好质控记录。(6)质控规则与偏移：依据每次质控实验记录绘制Westgard多规则质控表，判断误差偏移类型和失控原因的关系，采取从易到难的纠正措施，必要时重新制作检测质控样本。(7)质控月度回顾：每月进行至少一次室内质控结果统计，计算平均值、方差和标准变异系数，对出现明显的偏差趋势或位移变化需要分析原因并采取相应措施。(8)TIC图谱：数据分析时观察TIC图谱，重点观察样本信号强度，内标峰是否正确出峰，基线是否有漂移，是否出现异常杂峰，判断质谱运行无异常。(9)健康人群统计：实验室对健康人群分析物结果数据进行监测，每个化合分析物的平均值在每次实验条件不变的情况下计算，得到数据累计平均值及标准方差，将单次结果与累计数据展开对比，若本次结果超出累计数据结果，则表明本次实验过程可能出现偏差，问题点可能发生在检测试剂成分或使用环节错误、尿滤纸片的收集或复溶错误、尿肌酐浓度测定误差，或样本运输保存环节错误。发现问题应立即遵从质量控制纠错方案执行改正优化工作。^[23-26]

5.2 室内质量评价 室内质量评价(EQA, external quality assessment)是我国卫生行政主管部门和医院管理者对实验室质量实施监督的重要方法。其中NCCL-E-25 新生儿遗传代谢病气质联用检测尿液有机酸室内质量评价项目是由国家卫生健康委临床检验中心发起的室内质量评价活动。评价项目为各有机酸的峰面积与内标物十七烷酸峰面积的比值×100 的结果，内标物采用十七烷酸，质控品采用正二十四烷和托品酸。检测目标物甄选八种与遗传代谢病高度相关的特征有机酸，分别为3-羟基丙酸、甲基丙二酸、戊二酸、琥珀酰丙酮、3-羟基-3-甲基戊二酸、4-羟基苯乳酸、2-羟基异戊酸、2-羟基异己酸。这8种有机酸目标物与遗传代谢病关联性表述如下：(1)3-羟基丙酸升高在遗传代谢病中需注意丙酸血症、甲基丙二酸血症、多种羧化酶缺乏症，结合其它有机酸综合分析确诊疾病。3种遗传代谢病在罕见病中综合发病率高。(2)甲基丙二酸升高在遗传代谢病中需注意甲基丙二酸血症、维生素B12不足或叶酸缺乏，临床医生应根据经验判断患儿是否患有甲基丙二酸血症采取正确治疗方案。(3)戊二酸升高在遗传代谢病中需注意戊二酸血症1型、戊二酸血症2型、2-酮己二酸血症、3-羟基-3-甲基戊二酸血症，结合其它有机酸综合分析确诊疾病。戊二酸是戊二酸血症的特异性指标可根据戊二酸升高倍数判断患儿戊二酸血症类型采取正确治疗方案。(4)琥珀酰丙酮升高在遗传代谢病中需注意酪氨酸血症 I 型，琥珀酰丙酮是酪氨酸血症 I 型特异性指标结合血氨基酸检测结果可确诊疾病，尽快采取正确治疗方案。(5)3-羟基-3-甲基戊二酸升高在遗传代谢病中需注意3-羟基-3-甲基戊二酸血症，3-羟基-3-甲基戊二酸是3-羟基-3-甲基戊二酸血症特异性指标，尿液多种有机酸结果升高可确诊疾病，尽快采取正确治疗方案。(6)4-羟基苯乳酸升高在遗传代谢病中需注意Zellweger综合征、高酪氨酸血症 I 型、新生儿短暂性高酪氨酸血症、严重肝损伤结合其它有机酸综合分析确诊疾病。在检测的样本中4-羟基苯乳酸较常升高，其中大部分为肝损伤患儿。(7)2-羟基异戊酸与2-羟基异己酸均为枫糖尿症特异性指标结合血氨基酸检测结果可确诊疾病，尽快采取正确治疗方案。

质量评价方案：新生儿遗传代谢病气质联用检测尿液有机酸室内质量评价方案，采用8种可为遗传代谢病筛查与诊断提供重要临床信息的有机酸。按5个浓度水平配比，每年2次活动检测定量结果。根据各实验室结果进行分组统计，计算出总均值。按照规范剔除离群值后再计算不同测定方法及仪器型号的均值作为该组方法的靶值。采用国际上通行的评价方式，即靶值±允许总误差。

参与调查实验室可根据本实验室自身情况进行评价：中华人民共和国卫生行业标准WS/T492-2016《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》，分别计算参与调查各实验室的批内方差、批间方差、总方差，以及实验室内变异系数。

6 检测指标的临床意义

6.1 结果解释 现阶段气相色谱-质谱联用分析法可同时检测尿液中130多种有机酸，可提示几十种遗传代谢性疾病。该方法首先通过一定样本量的检测结果建立特定疾病关键生物标志物的切值(见表2)，然后以切值为依据，对患者的检测值进行结果判断。

结果解释需结合患者其他检测项目结果综合考虑，例如干血斑滤纸片串联质谱检测、基因检测等。另外还需考虑婴儿的临床表征以及在采集时的年龄、药物治疗状况、饮食状况、体重及其他因素，综合分析，给出合理解释。

6.2 结果报告 结果报告无论是阴性或阳性，均需符合以下患者报告信息模板：(1)患者姓名或父母姓名；(2)患者出生日期；(3)患者性别；(4)送检单位名称；(5)住院编号或实验室编号；(6)样本采集日期和时间；(7)样本类型；(8)实验室信息；(9)样本接收与检测日期；(10)检测结果发布日期；(11)检测人员及报告审核人员；(12)定量检测结果；(13)解释与结论^[27]。

相较于传统单病种新生儿遗传代谢病筛查技术, 气质联用检测尿液有机酸技术可同时进行多种遗传代谢病筛查, 是一项更为繁琐复杂的系统性工程, 要求更先进的检测仪器、方法和更专业的技术人员^[28-30]。检测目标物的增多, 对检测质量控制、不同实验室间检测结果可比性等提出了更大的挑战^[28]。制定本共识旨在规范不同检测实验室的检测方案, 提高检测结果一致性, 并督促各检测实验室加强质量管理, 提供标准化、同质化的检测服务。

表1 GC-MS检测有机酸指标

序号	有机酸英文名称	有机酸中文名称	衍生化后分子量
1	Lactic acid	乳酸	234
2	2-hydroxy-isobutyric acid	2-羟基异丁酸	248
3	Hexanoic acid	己酸	188
4	Glycolic acid	乙醇酸	220
5	Oxalic acid	草酸	234
6	2-hydroxy-butyric acid	2-羟基丁酸	248
7	Glyoxylic acid	乙醛酸	233
8	3-hydroxy-propionic acid	3-羟基丙酸	234
9	Pyruvic acid	丙酮酸	247
10	Valproic acid(VPA)	丙戊酸	216
11	3-hydroxy-butyric acid	3-羟基丁酸	248
12	3-hydroxy-isobutyric acid	3-羟基异丁酸	248
13	2-hydroxy-isovaleric acid	2-羟基异戊酸	262
14	2-Methyl-3-hydroxy-butyric acid	2-甲基-3-羟基丁酸	262
15	Malonic acid	丙二酸	248
16	3-hydroxy-isovaleric acid	3-羟基异戊酸	262
17	2-Keto-isovaleric acid	2-酮异戊酸	275
18	Methylmalonic acid	甲基丙二酸	262
19	2-ethyl-3-OH-propionic	2-乙基-3-羟基丙酸	262
20	Urea	尿素	204
21	4-hydroxy-butyric acid	4-羟基丁酸	248
22	2-hydroxy-isocaproic acid	2-羟基异己酸	276
23	3-hydroxy-valeric acid	3-羟基戊酸	262
24	Acetoacetic acid	乙酰乙酸	246
25	2-hydroxy-3-methylvaleric acid	2-羟基-3-甲基戊酸	276
26	Benzoic acid	安息香酸	194
27	Acetoacetic acid	乙酰乙酸	261
28	Octanoic acid	辛酸	216
29	2-Keto-3-methylvaleric acid	2-酮-3-甲基戊酸	289
30	2-Methyl-3-hydroxy-valeric acid(1)	2-甲基-3-羟基戊酸(1)	276
31	Glycerol-3	甘油-3	308
32	Phosphoric acid-3	磷酸-3	314
33	2-Methyl-3-hydroxy-valeric acid(2)	2-甲基-3-羟基戊酸(2)	276
34	Ethylmalonic acid	乙基丙二酸	276
35	2-Keto-isocaproic acid	2-酮-异己酸	289
36	Acetylglucose	乙酰葡萄糖	189
37	Phenylacetic acid	苯乙酸	208
38	Maleic acid	马来酸	260
39	Succinic acid	琥珀酸	262
40	Methylsuccinic acid	甲基琥珀酸	276
41	Glyceric acid	甘油酸	322
42	Uracil	尿嘧啶	256
43	Fumaric acid	富马酸	260
44	Propionylglycine	丙酰甘氨酸	203
45	Acetylglucose	乙酰葡萄糖	261
46	mevalonolactone-origin fragment	甲羟戊酸内酯片段	274
47	Mevalonolactone	甲羟戊酸内酯	202
48	Isobutyrylglycine	异丁酰甘氨酸	217
49	2-Propyl-3-hydroxy-pentanoic acid	2-丙基-3-羟基戊酸	304
50	Mesaconic acid	甲基富马酸	274
51	Glutaric acid	戊二酸	276
52	3-methylglutaconic(1)	3-甲基戊烯二酸(1)	288
53	3-Methylglutaric acid	3-甲基戊二酸	290
54	2-Propyl-3-ketopentanoic acid	2-丙基-3-酮戊酸	302
55	Propionylglycine	丙酰甘氨酸	275
56	Isobutyrylglycine	异丁酰甘氨酸	289
57	3,4-Dihydroxybutanoic acid	3,4-二羟基丁酸	336
58	Butyrylglycine	丁酰甘氨酸	217
59	3-methylglutaconic(2)	3-甲基戊烯二酸(2)	288
60	Glutaconic acid	戊烯二酸	274
61	succinylacetone	琥珀酰丙酮	418
62	Decanoic acid	癸酸	244

63	2-Propyl-5-hydroxy-pentanoic acid	2-丙基-5-羟基戊酸	304
64	3-methylglutaconic	3-甲基戊烯二酸	288
65	Isovalerylglucose	异戊酰甘氨酸	231
66	Butyrylglycine	丁酰甘氨酸	289
67	Malic acid	苹果酸	350
68	Adipic acid	己二酸	290
69	Isovalerylglucose	异戊酰甘氨酸	303
70	2-Hexenedioic acid	2-己烯二酸	288
71	5-oxoproline	5-羟脯氨酸	273
72	3-methyladipic acid	3-甲基己二酸	304
73	Thiodiglycolic acid	亚硫酸基乙酸	294
74	2-propylglutaric	2-丙基戊二酸	318
75	7-hydroxyoctanoic acid	7-羟基辛酸	304
76	5-hydroxy-methyl-2-furoic acid	5-羟甲基-2-糠酸	286
77	Tiglylglycine acid	巴豆酰甘氨酸	301
78	3-Methylcrotonylglycine	3-甲基巴豆酰甘氨酸	229
79	Tiglylglycine acid	巴豆酰甘氨酸	229
80	3-Methylcrotonylglycine	3-甲基巴豆酰甘氨酸	301
81	2-hydroxyglutaric acid	2-羟基戊二酸	364
82	3-hydroxyglutaric acid	3-羟基戊二酸	364
83	Phenyllactic acid	苯乳酸	310
84	Pimelic acid	庚二酸	304
85	3-hydroxy-3-methylglutaric acid	3-羟基-3-甲基戊二酸	378
86	3-hydroxy-phenylacetic acid	3-羟基苯乙酸	296
87	2-ketoglutaric(1)	2-酮戊二酸(1)	377
88	4-hydroxy-benzoic acid	4-羟基安息香酸	282
89	4-hydroxy-phenylacetic acid	4-羟基苯乙酸	296
90	2-ketoglutaric(2)	2-酮戊二酸(2)	377
91	Hexanoylglycine	己酰甘氨酸	317
92	Phenylpyruvic acid	苯丙酮酸	323
93	N-Acetylaspargic acid	N-乙酰天冬氨酸	319
94	2-hydroxy-adipic acid	2-羟基己二酸	378
95	Octenedioic acid	辛烯二酸	316
96	3-hydroxy-adipic acid	3-羟基己二酸	378
97	Suberic acid	辛二酸	318
98	3-methylglutaconic(4)	3-甲基戊烯二酸(4)	360
99	2-Keto-adipic acid	2-酮己二酸	391
100	Aconitic acid	乌头酸	390
101	Orotic acid	乳清酸	372
102	Vanillic acid	香草酸	312
103	Homovanillic acid(HVA)	高香草酸	326
104	Azelaic acid	壬二酸	332
105	Hippuric acid	马尿酸	323
106	Isocitric acid	异构柠檬酸	480
107	Citric acid	枸橼酸	480
108	Homogentisic acid	尿黑酸	384
109	Hippuric acid-1	马尿酸	251
110	Methylcitric acid(1)	甲基枸橼酸(1)	494
111	3-(3-hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-propionic acid	3-(3-羟苯基)-3-羟基丙酸	398
112	Methylcitric acid(2)	甲基枸橼酸(2)	494
113	3-hydroxy-octenedioic acid	3-羟基辛烯二酸	404
114	3-hydroxy-suberic acid	3-羟基辛二酸	406
115	Vanillylmandelic acid(VMA)	香草扁桃酸	414
116	Sebacic acid	癸二酸	346
117	Decadienedioic acid	癸二烯酸	342
118	4-hydroxy-phenyllactic acid(PHPLA)	4-羟基苯乳酸	398
119	4-OH-phenylpyruvic	4-羟基苯丙酮酸	411
120	2-hydroxy-hippuric acid	2-羟基马尿酸	411
121	Indole-3-acetic acid	吲哚-3-乙酸	319
122	Suberylglucose	辛二酰甘氨酸	375
123	Palmitic acid	棕榈酸	328
124	2-hydroxy-sebacic acid	2-羟基癸二酸	434
125	3-hydroxy-sebacic acid	3-羟基癸二酸	434
126	2-hydroxy-hippuric acid	2-羟基马尿酸	339
127	Dodecanedioic acid	十二烷二酸	374
128	N-acetyl-tyrosine acid	N-乙酰酪氨酸	439
129	Uric acid	尿酸	456
130	3, 6-Epoxydodecanedioic acid	3, 6-环氧-十二烷二酸	388
131	3-hydroxy-dodecanedioic acid	3-羟基-十二烷二酸	462
132	3, 6-Epoxytetradecanedioic acid	3, 6-环氧-十四烷二酸	416

表2 尿液GC-MS检测目标疾病与生物标志物对应表

疾病名称	尿液标记物
甲基丙二酸尿症	甲基丙二酸，甲基枸橼酸
丙酸尿症	甲基枸橼酸，3-羟基丙酸
β-酮硫解酶缺乏症	2-甲基-3-羟基丁酸
异戊酸尿症	异戊酰甘氨酸
3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症	3-甲基巴豆酰甘氨酸，3-羟基异戊酸
多种羧化酶缺乏症	3-甲基巴豆酰甘氨酸，3-羟基丙酸，丙酮酸，甲基枸橼酸
3-羟基-3-甲基戊二酸尿症	3-羟基-3-甲基戊二酸
3-甲基戊二酸尿症	3-甲基戊烯二酸
戊二酸尿症I型	戊二酸，2-羟基戊二酸
戊二酸尿症II型	乙基丙二酸，戊二酸，己二酸，辛二酸
3-羟基-异丁酸尿症	3-羟基异丁酸
5-羟脯氨酸尿症	5-羟脯氨酸
2-羟基戊二酸尿症	2-羟基戊二酸
4-羟基丁酸尿症	4-羟基丁酸
甲羟戊酸尿症	甲羟戊酸内酯
丙二酸尿症	丙二酸
甘油酸尿症	甘油酸
2-酮己二酸尿症	2-酮己二酸
尿黑酸尿	尿黑酸
鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症	乳清酸，尿嘧啶
苯丙酮尿症	苯乙酸，苯乳酸，苯丙酮酸
枫糖尿症	2-羟基异戊酸，2-酮异戊酸，2-酮异己酸，2-羟-3-甲基戊酸
卡纳万氏综合征	N-乙酰天冬氨酸
酪氨酸尿症I型	琥珀酰丙酮，4-羟基苯乳酸，4-羟基苯丙酮酸
希特林蛋白缺乏症	4-羟基苯乳酸，4-羟基苯丙酮酸
瓜氨酸尿症I型	乳清酸，尿嘧啶
3-羟基二羧酸尿症	3-羟基戊二羧酸，3-羟基辛二酸，3-羟基十二烷酸
Zellweger综合症	4-羟基苯乳酸，2-羟基癸二酸，3，6-环氧-十四烷酸
丙戊酸治疗	丙戊酸，2-丙基-3-羟基戊酸，2-丙基-3-酮戊酸
乳清酸尿症	2-丙基-5-羟基戊酸，2-丙基-羟戊二酸
草酸尿症	乳清酸
乳酸尿症	草酸
酮症	乳酸
二羧酸尿症	丙酮酸，3-羟基丁酸，乙酰乙酸
	戊二酸，己二酸，辛二酸，庚二酸，癸二酸，十二烷二酸

执笔者：杨江涛 江剑辉 曾伟宏 田国力 赵明

专家组成员：北京医院国家老年医学中心/国家卫生健康委临床检验中心/北京市临床检验工程技术研究中心(王治国，何法霖，王薇)；广东省妇幼保健院广东省新生儿遗传代谢病筛查中心(江剑辉，曾伟宏)；深圳爱涛医学检验实验室(杨江涛，赵明，孙智勇，黄丽娟)；上海市儿童医院(田国力，邹琳)；上海交通大学医学院附属新华医院(韩连书)；贵州省疾病预防控制中心妇幼保健所(张宏红)；湖北省妇幼保健院(王维鹏)；三亚市妇幼保健院(王洁)；浙江大学医学院附属儿童医院(曲一平，尚世强，黄新文)；福建省新生儿筛查中心(朱文斌)；青岛市妇女儿童医院(李文杰)；山东省青岛大学附属医院(刘世国)；宁波市妇女儿童医院(陈意振)；四川省妇幼保健院新生儿筛查中心(欧明才)；山东省妇幼保健院(周玉侠)；广西医科大学第二附属医院(范歆)；郑州大学第三附属医院(河南省妇幼保健院)(赵德华)；湖南省妇幼保健院(唐华)；徐州市妇幼保健院(顾茂胜)；梅州市妇幼保健院(黄烁丹)；厦门市妇幼保健院(周裕林)；广州医科大学附属第三医院(黎青)；云南省妇幼保健院(顾莞茜)；陕西省妇幼保健院新生儿筛查中心(强荣)；北京大学第一医院(杨艳玲，宋金青，李梦秋，金颖)；中国科学院大学深圳医院(光明)(吴本清，谌玉佳)

参考文献

[1]江剑辉,马发琴.遗传性代谢疾病的筛查诊断新进展[J].广东医学,2002,23(5):451-452.
[2]宋金青,杨艳玲.气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J].中国刊,2006,41(2):38-40.
[3]曾伟宏,江剑辉,梁嘉颖,等.气相色谱质谱联用技术在遗传代谢病诊断和治疗监测中的应用[J].广东医学,2017,38(19):2997-3000.
[4]YANG Q,XU L,TANG L J,et al.Simultaneous detection of multiple inherited

metabolic diseases using GC-MS urinary metabolomics by chemometrics multi-class classification Strategies[J].Talanta,2018,15(186):489-496.
[5]顾学农.临床遗传代谢病.第一版[M].北京:人民卫生出版社,2015.
[6]NAOAKI S,YUKI H,KEN J,et al.Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries:Selective screening vs.expanded newborn screening[J].Mol Genet Metab Rep,2018,16:5-10.
[7]KRONN D,MOFIDI S,BRAVERMAN N,et al.DiagnosticGuidelinesfor confirmation of screen-positive newborn screening results[J].New York mid-atlantic consortium for genetic and newborn screening services,2014.
[8]杨艳玲.从病例开始学习遗传代谢病.第1版[M].北京:人民卫生出版社,2018.
[9]卫生部令64号:《新生儿疾病筛查管理办法》(2009).
[10]卫生部关于印发《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》的通知,卫妇社发,2010,96号,2010-11-10.
[11]王治国,李小鹏,武平原.2001年全国新生儿疾病筛查实验室质量评价[J].中国公共卫生,2002,18(11):1324-1327.
[12]王维鹏,邹琳,王治国.新生儿疾病筛查与产前诊断实验室管理[M].北京:人民卫生出版社,2018.
[13]Shahangian S,Snyder SR.Laboratory medicine quality indicators A review of the literature[J].Am J Clin Pathol,2009,131(3):418-431.
[14]国家卫生计生委.医学检验实验室基本标准和管理规范(试行)国卫医发(2016)37号,2016-07-20.
[15]杨江涛,林珊珊,戴子鹏,等.遗传代谢病筛查中干尿滤纸片制作及洗脱方法探讨[J],检验临床与医学,2016(13)7:942-944.
[16]杨江涛,钱俊,钟沛强,等.紫外分光光度计测定新生儿尿液中的肌酐含量[J],检验临床与医学,2015(12)增刊1期:49-52.
[17]杨江涛,林珊珊,钟沛强,等.气相色谱-质谱技术检测尿液与滤纸尿中有机酸含量的对比[J],检验临床与医学,2015(12)增刊2期:93-95
[18]耿国兴,陈少科.乙酸乙酯萃取-气相色谱-质谱联用技术对267例疑似遗传代谢病筛查的结果[J].中国妇幼保健,2014,29(20):3289-3291
[19]孙卫华,杨毅,曹迪,等.气-质联用技术测定尿有机酸方法的建立及在遗传代谢病诊断中的应用[J].中华检验医学杂志,2008(10):1161-1165.
[20]Kimura M,Yamamoto T,Yamaguchi S,et alAutomatic automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic academia screening:a personal computer-based system[J].Tohoku J Exp Med,1999,188:317-334.
[21]罗小平,王慕逖,魏虹,等.尿滤纸片技术气相色谱-质谱分析技术在遗传性代谢病高危筛查诊断中的应用[J].中华儿科杂志,2003,41(4):245-248.
[22]American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening:Toward a uniform screening panel and system[J].Gene Med,2006,8(Suppl1):1S-252S.
[23]国家卫生计生委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查实验室专家组.新生儿遗传代谢病筛查质量指标共识[J].中华检验医学杂志,2017,40(5):352-355.
[24]中国合格评定国家认可委员会.CNAS-CL02:2012.医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:2012,IDT).2013-11-22.
[25]王治国.临床检验质量控制技术.第3版[M].北京:人民卫生出版社,2014.
[26]王治国,费阳,康凤凤,等.国家卫生计生委发布临床检验专业15项医疗质量控制指标(2015年版)内容及解读[J].中华检验医学杂志,2015,38(11):777-781
[27]CLSI.Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry.2nded.CLSI guideline NBS04[J].Wayne,PA:CLSI,2017.
[28]Pass K A,Lane P A,Fernhoff P M,et al.US newborn screening system guidelines II:follow-up of children,diagnosis,management,and evaluation.Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services(CORN)[J].J Pediatr,2000,137(4 Suppl):S1-46.
[29]Lindner M,Hoffmann G F,Matern D.Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting[J].J Inherit Metab Dis,2010,33(5):521-526.
[30]曾伟宏,吴爱武,谢讯杰,等.高苯丙氨酸血症分型和代谢谱分析[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(8):572-575.

(收稿日期：2022-04-05)