

ICS 07.080

CCS A 40



团 体 标 准

T/CRHA 060—2024

尿液有机酸检测—气相色谱-质谱联用法

Detecting organic acids in urine—Gas chromatography-mass spectrometry
method

2024-07-05 发布

2024-07-10 实施

中国研究型医院学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、缩略语	1
4 分析原理	2
4.1 GCMS 检测原理	3
4.2 校准	3
4.3 定量	3
4.4 半定量	3
5 检测技术指标	3
5.1 线性	3
5.2 线性范围	3
5.3 精密度	4
5.4 准确度	4
5.5 重复性	4
5.6 定量限	4
5.7 分析灵敏度	4
5.8 患者结果可报告范围	4
5.9 参考范围	4
6 样本分析要求	4
6.1 样本要求	4
6.2 检测试剂与材料	5
6.3 检测设备	5
6.4 样本检测体系的要求	6
7 样本检测流程	8
7.1 样本前处理：有机酸提取	8
7.2 样本检测结果与报告	9
7.3 检测质量控制与管理	9
7.3.1 实验室要求	9
7.3.2 检测过程的质量管理	10
附录 A（资料性）仪器参数和试剂	11
附录 B（资料性）尿液有机酸 GCMS 检测预处理程序	12
参考文献	14

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。

本文件由中国研究型医院学会临床数据与样本资源库专业委员会提出。

本文件由中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：中国人民解放军总医院、参编单位为北京大学第一医院、上海市儿童医院、徐州市妇幼保健院、广东省妇幼保健院、四川省妇幼保健院、西安市儿童医院、中国医科大学附属盛京医院、重庆医科大学附属儿童医院、江西省儿童医院、佛山市妇幼保健院、呼和浩特市妇幼保健院、西北妇女儿童医院、深圳市罗湖医院集团、河南省儿童医院、长沙市妇幼保健院、四川大学华西第二医院、深圳市妇幼保健院、邢台市妇幼保健院、运城市妇幼保健院、东莞市妇幼保健院、深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心、浙江博圣生物技术股份有限公司、深圳爱湾智造科技有限公司、徐州爱湾医学检验实验室有限公司。

本标准主要起草人：田亚平，张春燕，张玉，杨艳玲，田国力，张万巧，何玺玉，顾茂胜，刘玉兰，杨江涛，江咏梅，江剑辉，强荣，罗泽民，何晓燕，郭智彬，邵巧仪，王增国，纪翔，李东晓，何蓉，周世豪，吕会净，令狐丹丹，刘杨，孙志豪，吴莉萍，姜盼盼，赵明，孙智勇，王琼琼。

尿液有机酸 气相色谱-质谱联用检测方法

1 范围

本文件描述了使用气相色谱-质谱联用技术进行尿液中有机酸检测的方法。

本标准适用于使用气相色谱-质谱联用技术对尿液中内源性小分子代谢产物有机酸的检测。

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/T 32264—2015 气相色谱-单四极质谱仪性能测定方法

GB/T 32267—2015 分析仪器性能测定术语

YY/T 1244—2014 体外诊断试剂用纯化水

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 32267—2015 和 GB/T 32264—2015 界定的以及下列定义适用于本文件。

3.1.1

气相色谱-质谱联用仪 gas chromatography mass spectrometer; GCMS

一种结合气相色谱和质谱特性的分析仪器，鉴别与测定待检样本中不同物质，应用于医学、物理学、食品安全、环境监测等领域。

3.1.2

质荷比 mass-to-charge ratio

带电离子的质量与所带电荷之比值。

注：质荷比以 m/z 表示。

3.1.3

质量范围 mass range

仪器所能测量的离子质量范围。

注：单位为 amu (Atomic Mass Unit)。

3.1.4

质量分辨率 mass resolution

分辨两个相邻质谱峰的能力，相邻两个质谱峰，其峰谷不大于峰高的 10% 时，定义为可以区分。

3.1.5

质量准确性 mass accuracy

测定离子的质荷比与实际（理论）质荷比的偏离程度。

3.1.6

半峰宽 full width at half maximum; FWHM

质谱峰峰高一半处的峰宽度。

注：用 $W_{1/2}$ 表示，单位为 μ 。

3.1.7

线性 linearity

在检测样本时，可以直接按比例得出分析物含量（一定范围内）的能力。

3.1.8

线性范围 liner range

覆盖检测系统可接受线性关系的范围，非线性误差小于设定标准。

3.1.9

干扰 interference

在混合样品中分析一个组分时，影响分析结果准确性的因素。

3.1.10

信噪比 signal to noise ratio

被测物信号强度与该检测条件下基线噪声的比值。

3.1.11

检测限 limit of detection; LOD

由基质空白所产生的仪器背景信号的 3 倍值的相应量，或者以基质空白产生的背景信号平均值加上 3 倍的均数标准差。

注：又称为检出限，这一指标只能用于限度检查，而不能用于报告定量结果。

3.1.12

定量限 limit of quantitation; LOQ

样本中被测物质定量测定的最低量（也是成线性范围的最低浓度或量），其测定结果符合准确度和精密度要求，可衡量方法灵敏度与定量检测能力。

注：常用信噪比法确定定量限，一般以信噪比(S/N)为 10:1 时相应的浓度或注入仪器的量确定定量限。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

TIC: 总离子流图 (total ion chromatogram)

SIM: 选择离子扫描 (selected ion monitoring)

OA: 有机酸 (organic acid)

AA: 氨基酸 (amino acid)

GC: 气相色谱 (gas chromatography)

MS: 质谱仪 (mass spectrometer)

EI: 电子轰击 (electron ionization)

LOQ: 定量限 (limit of quantitation)

LOD: 检测限 (limit of detection)

LLMI: 测量区间下限 (Lower limit of measurement interval)

ULMI: 测量区间上限 (Upper limit of measurement interval)

RSD: 相对标准偏差 (relative standard deviation)

4 分析原理

4.1 GCMS 检测原理

采用样本萃取液对尿液或尿滤纸片中的有机酸进行萃取，添加内标，提取物经衍生化后复溶用 GCMS 进行分析。GCMS 由气相色谱仪和四极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)，使用 GCMS 数据库检索系统进行化合物确认分析，并进行基于内标的半定量分析或基于内标标准曲线的定量分析，获得各检测指标的相应含量，两种数据分析方法均需测定尿液或尿滤纸片的肌酐含量，以 $\text{mmol/L} \cdot \text{mmol Cr}$ 为单位。

注：检测仪器参数和试剂见附录 A。

4.2 校准

尿液有机酸分析需采用至少两种以上的标准物质作为内标，内标的选择因实验室而异，但内标必须是不存在于人体样本中，并且可以通过气相色谱法与其他化合物分离的可识别物质。内标一为定量内标，即将样本中的代谢物浓度与校准标准进行直接比值，一般采用十七烷酸；内标二主要用于评价提取效率，常用内标二包括托品酸、2-苯基丁酸、2-酮基己酸、对氯苯甲酸和二甲基丙二酸等；内标三主要用于评价仪器状态与衍生化程度，在衍生化之前或样本提取时加入，一般采用二十四烷。

4.3 定量

尿液有机酸浓度的定量应通过内标标准曲线法完成。为程序中定量的每个分析物准备可溯源标准品，并建立校准曲线，校准曲线线性范围必须涵盖人体正常范围和目标疾病阳性浓度范围。校准曲线系列溶液应包括定量有机酸的至少 5 个以上浓度梯度以及加入已知量的内标物。在待测物中加入与标准曲线相同量的内标物，可以使用化合物的单个定量离子进行定量，计算目标化合物与内标的峰面积比，然后使用校准曲线斜率（相对校正因子）获得定量结果。不建议在不使用特定参考标准的情况下进行定量。

4.4 半定量

半定量方法中通常以人尿液中排泄量较为稳定的尿肌酐作为基础内标（一般取 0.2mg 当量对应体积尿液或尿滤纸片复溶液），以十七烷酸为定量内标，用有机酸特征离子与十七烷酸定量内标特征离子的质谱色谱峰面积比值作为半定量结果，无需配置有机酸目标分析物的混标溶液，但需要基于实验室建立相应的正常人及患者的数据参考区间。

5 检测技术指标

5.1 线性

参照 WS/T 408—2012 临床化学设备线性评价指南建议实验室购买和使用商品化的标准品，如无法获得商品化标准品则可以自配，自配校正材料最好采用参考测量程序赋值。推荐使用有证标准物质（如：国际参考品、国家参考品、厂家参考品）配制校准品采用定值标准物质进行确认，校准物质应具有确定的纯度和稳定性信息，定值应溯源至参考方法(ISO 17511)。校准曲线应包括空白，零点等至少 5 个不同浓度水平样本，每个浓度水平重复测定 3 次，分析结果做回归分析，一元线性回归曲线， $R^2 \geq 0.9900$ 。

5.2 线性范围

线性范围，指的是在一定范围内，试验结果与试样中被测物浓度呈线性关系的能力。对于含量测定要求一般浓度上限为正常样品最高浓度的至少（5~10）倍，下限不高于样品最低浓度的 80% 但应高于最低定量下限。设置至少 6 个非零浓度点，每个浓度点重复测定 2 次，采用多项式回归方程。

5.3 精密度

依据 WS/T 492—2016 建议在规定条件下所获得独立检测结果的接近程度，用测定 6 次结果进行相对标准偏差（RSD）评价。

5.4 准确度

依据 WS/T 492—2016 建议采用标准物质进行对照试验，在无标准物质或标准方法时，常用加入被测组分的纯物质进行回收试验来估计和确定准确度。两个及以上浓度样本检测回收率在 80%~120% 以内。

5.5 重复性

检测结果的重复性，在相同检测条件下对同一待测物进行连续多次测量所得结果的一致性。在规定的范围内，至少用 9 个测定结果进行评价。

5.6 定量限

定量限应不大于报告范围的最低浓度，定量限确定一定要是连续进样，通常建议平行测定 6 次（因其要符合准确度和精密度要求），且 6 针信噪比（S/N）均要 $\geq 10:1$ 。

5.7 分析灵敏度

全扫描灵敏度（电子轰击源 EI）：1pg 八氟萘，信/噪比（S/N） $> 200:1$ ；

选择离子扫描灵敏度（电子轰击源 EI）：20fg 八氟萘，信/噪比（S/N） $\geq 10:1$ 。

5.8 患者结果可报告范围

测量仪器的误差在特定范围内的一系列分析物的测量结果，计算测定值与预期值比值 R，取 $80\% \leq R \leq 120\%$ 的浓度范围为可报告范围。

5.9 参考范围

每个实验室应根据其使用方法建立参考范围，并定期验证所有报告的定量化合物的参考范围，参考范围应利用内源肌酐浓度进行归一化。当使用基于文献报道的参考范围时，必须定期验证。

6 样本分析要求

6.1 样本要求

6.1.1 尿液

推荐使用原始尿液进行检测，建议采集量 2mL~6 mL。新鲜尿液应收集在不含防腐剂的干净容器中，尽快冷冻，并冷冻保存直至分析。未冷冻尿样，低温冷藏（2~8℃）保存不宜超过 4h。

如果尿液样本出现以下任一情况将视为不合格：

- (1) 无检测申请单或检测申请单内容与样本信息不符；
- (2) 容器有破损：管壁有裂缝或开盖、盖子未盖紧等；
- (3) 样本量不足：尿量小于 2mL；
- (4) 没有及时寄送的样本，未采取冷藏（2℃~8℃）或冷冻保存；
- (5) 样本递送未采取冷链运输，冻存样本融化。

6.1.2 干尿滤纸片

无冷藏、冷冻条件的可制作干尿滤纸片。制作过程参考如下：

- a) 使用 2 片新华 3 号滤纸（4cm×4cm）完全浸透于尿液中；
- b) 浸泡时间≥15min，于干燥阴凉避光处晾干，自封袋密封保存；
- c) 及时常温快递或冷链运送。

如果干尿滤纸片样本出现以下任一情况将视为不合格：

- a) 无检测申请单或检测申请单内容与样本信息不符；
- b) 放置时间过长：样本自采集至晾干超过 1 天。自制作完成至到达实验室超过 20 天；
- c) 样本潮湿、发霉，有笔迹黑点等污染（晾干过程尿滤纸片最好悬空不与物体接触，若必须接触应保证接触物干净无污染）；
- d) 样本非自然晾干（推荐晾干方式：室温下放置约（2~4）h 自然干燥）；严禁将尿滤纸片放置于如电吹风、暖气、电炉、阳光及强光灯等热源下烘烤；
- e) 样本量不足：尿滤纸片少于 2 张或者尿滤纸片载尿时未完全浸透仅负载少量尿样，实际复溶出的尿液不满足实验用量）。

6.1.3 采集时机及保存

采集随机尿液，无需晨尿。采集前避免短时间内大量饮水、服药。如果患者出现疑似疾病急性发作（或失代偿），推荐采集急性（失代偿）期尿样。因为在目标疾病急性期尿液中的诊断标志物浓度最高，更利于疾病的检出和鉴别。

尿液或滤纸片送至实验室后，应保存在-20℃或更低温度，尽快完成检测。完成检测后的样本推荐在-20℃冷冻保存 3 年，以备复测。

6.2 检测试剂与材料

6.2.1 试剂与材料如下：

- a) 检测用纯化水：检测用纯化水应符合 YY/T 1244—2014 的要求；
- b) 尿素酶：尿素分解试剂，用于样本前处理除去尿液中的尿素；
- c) 十七烷酸：定量内标，用于各检测物质半定量或定量分析；
- d) 托品酸：二级内标，用于评价仪器检测性能；
- e) 二十四烷：二级内标，用于评价衍生化效率；
- f) 乙酸乙酯：样本提取试剂，用于样本纯化；
- g) 盐酸羟胺：肟化反应试剂，用于样本前处理；
- h) 硅烷化试剂：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:TMCS=99:1)，用于有机酸衍生化；
- i) 正己烷：辅助试剂用于设备以及进样针清洗；
- j) 丙酮：辅助试剂用于设备以及进样针清洗；
- k) 甲醇：辅助试剂用于设备以及离子源清洗；
- l) 质控：通常采用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。

6.2.2 如使用商品化检测试剂盒，则按说明书进行相应操作。

6.3 检测设备

所有使用设备应定期校准并符合强制性国家标准要求。

- a) 有机酸提取设备：电热恒温箱，符合仪器出厂标准。
- b) 有机酸浓缩设备：氮气吹干仪，符合仪器出厂标准。
- c) 有机酸纯化设备：低速离心机，符合仪器出厂标准。

d) 有机酸检测设备：气相色谱-质谱联用仪，符合仪器出厂标准。

6.4 样本检测体系的要求

6.4.1 检测试剂

检测试剂来源分商品化试剂和实验室自配试剂，所有化学试剂均要求色谱级或以上。

- 如条件允许且检测性能满足需求，应优先选择商品化试剂；
- 自配试剂和标准溶液应遵守操作规程，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；
- 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；
- 建立危化品及易制毒试剂管理程序，分类并使用专柜存放，由两人以上保管，需填写相关实验记录，保护人员安全。

6.4.2 检测性能

参考 GB/T 32264—2015、WS/T 420—2013、WS/T 492—2016、WS/T 416-2013 以及 CLSI-C62-A 2014 对定量技术指标具体要求作出规定。用于尿液有机酸检测的检测体系，应至少经过以下性能指标的确认：仪器校验、标准曲线线性、线性范围、分析灵敏度（最低检测限/检出限）、准确度、精密度、稳定性、重复性、干扰物质的影响等，具体评价方法与要求见表 1。除特殊说明外，均采用电子轰击(EI)源进行测试。

表 1 性能要求与方法

性能指标	方法	要求	
仪器校验	密封性	检测水、氮气以及氧气峰的相对丰度	1.水/氮气相对丰度<200%； 2.氧气/氮气相对丰度<25%
	质量数	检测器电压是否有超过 2 kV 检查 m/z 69、m/z 219、m/z 502 的质量数、峰强度以及 FWHM (半峰宽)值	1.检查峰形是否有明显的分叉； 2.峰型是否对称； 3.理论值与实际测定值相差应在±0.1Da 之内； 4.FWHM 应在 (0.5~0.7) Da 之间； 5.基峰值为质荷比(m/z)18 或 69； 6.质荷比(m/z) 502 的相对强度比率≥2%； 7.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 2 倍
标准曲线	线性	测量 6~8 个浓度水平，做一元线性回归曲线	$R^2 \geq 0.9900$
	线性范围	采用选择离子(SIM)监测方式,从低到高依次注入不同浓度的标准物质溶液,计算测试浓度范围内,响应面积与浓度间的线性相关系数 R^2	1.标准曲线范围跨度超过 3 个数量级(例如 10~1000)，或范围内存在非线性区间，建议增加标准品数量或者缩小浓度检测范围； 2.各浓度样本的实测值与理论值之间的偏差应在可接受范围之内（LLMI 浓度点的偏差应在±20%以内，其余浓度点的偏差应在±15%以内）； 3. R^2 值应≥0.99.
分析灵敏度	1.八氟萘作为标准品进行验证； 2.有定值标准物质（如：国际参考品、国家参考品、	1.全扫描灵敏度（电子轰击源 EI）：1pg 八氟萘：信/噪比(S/N)>200:1； 2.选择离子扫描灵敏度（电子轰击源 EI）：20fg 八氟萘，信/噪比(S/N)≥10:1。	

	厂家参考品)时,采用定值标准物质进行确认	3.检出限应不大于报告范围的最低浓度,通常建议采用特定浓度标准物质连续进样平行测定6次(因其要符合准确度和精密度要求),且6针信噪比(S/N)均应 $\geq 10:1$ 。
准确度	应通过与参比方法进行比较,评估方法符合率。参比方法包括但不限于:金标准方法、行业公认方法、经性能验证符合要求满足预期用途的方法等	各检测指标定量结果较理论浓度偏差值 $\leq \pm 20\%$ 。
精密度	运用实验室的常规质控程序以及物质,推荐使用两个或两个以上可能接近实验室内“医学决定水平”浓度的样本	最少操作天数 20 天进行独立精密度评价 批内检测值 CV $<15\%$, 批间检测值 CV $<20\%$ 。
重复性	采用八氟萘(100 pg/ μL),或采用标准物质进行确认,重复性评估应在三个浓度水 110%LLMI、50%(LLMI+ULMI)与 90%ULMI	1.八氟萘连续测定 5 个数据:峰面积重现性 CV 应 $\leq 5\%$;保留时间重现性 CV $\leq 1\%$; 2.标准物质每种浓度的样本至少重复检测 20 次,计算 SD、CV 和回收率。要求: CV $\leq 15\%$;回收率偏差 $\leq \pm 20\%$ 。
稳定性	应对整个检测体系的保存稳定性进行测试,可采用加速实验确认;对成品试剂,也可采信厂家声明的保存期限	1.标准品和储备液、校正线、质控与样本的储存在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ 短期/长期稳定性; 2.样本反复冻融与处理后的稳定性 要求:偏差在 $\pm 20\%$ 以内
干扰物质的影响	建议对临床样本内常见的干扰因素进行评估,如药物及其代谢物质、补充剂、样本基质和性状、抗凝剂、促凝剂等,同时需关注同分异构体或同位素的干扰	1.样本采集管中的添加剂,检测浓度应比推荐浓度高出 5 倍。 2.药物或其他外源性物质,应检测高出患者治疗或暴露后最高浓度 10 倍的浓度。 3.如果潜在干扰的分子量接近目标分析物的分子量,需要检查潜在加合物的形成或潜在的丢失。同分异构或同位素化合物也应评估其引起干扰的可能性,如果它们确实引起干扰,应与目标分析物色谱分离。 4.未知干扰物监测通过离子丰度比(每天计算),其在批内和披间无显著变化。积累方法建立和验证阶段数据,设定患者样本离子比变化可接受标准。 5.一般建议对于病人样本中离子丰度比 $>50\%$ 的,跟标准溶液的平均比应 $\leq \pm 20\%$,如果大于 $\pm 20\%$ 则表明存在干扰。

6.4.3 参考区间建立与验证

对参考区间的建立与验证,若自建参考区间,则根据项目特点,选择至少 1000 份样本。若验证参考区间,根据项目特点,每个参考区间选择至少 20 份样本,对结果进行统计分析得出参考区间。若分析物的检测值呈正态分布,可采用 $\bar{x} \pm 2s/3s$ 确定参考区间的上下限;若分析物检测值呈非正态分布,则采用百分位数法确定参考区间的上下限,如将第 99%位数值或第 99.5%位数值作为上限,以第 1%位数值或第 0.5%位数值作为下限。

6.4.4 信息分析系统

检测体系应有对应的数据分析系统,包括气相色谱-质谱联用仪数据采集、定性定量分析及报告显示软件系统产生的数据文件与质控分析报告:

- 设备软件系统对检测样本进行各种有机酸目标物与内标的峰面积积分,可快速批处理样本检测结果及单个样本的快速分析;允许设置定量积分参数进行检测结果校正;计算出多种分析物的定量数据文件;
- 数据文件,包含样本编号、各检测物质浓度、匹配度、保留时间等数据信息;
- 质控分析,将各质控物质浓度导入分析系统,自动计算均值与相对标准偏差,生成质控监测图,并标注出超出质控范围的结果;
- 报告分析系统,将分析物浓度与患者信息自动匹配导出结果数据,并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。

7 样本检测流程

7.1 样本前处理:有机酸提取

7.1.1 样本预处理

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:

- 取一片尿滤纸片,剪至 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 合计 16 个碎片,放置于 10mL 离心管中,加入 2.5mL 超纯水,浸泡 10min;
- 离心 4000rpm, 5min,取上清液(注意无纸片残渣)。

注:预处理流程见附录 B。

7.1.2 尿肌酐测定

尿肌酐为尿液中最稳定的代谢产物,参考《尿中肌酐分光光度测定方法》(WS/T97-1996)标准,采用紫外分光光度计或生化仪对尿液或尿滤纸片复溶液中的尿肌酐进行定量检测。

7.1.3 (定量)样本前处理

用移液器加入 100 μL 待测尿液或尿滤纸片复溶液进行前处理,流程包括去除尿素、添加内标、蛋白沉淀、脲化反应、氮气吹干、衍生反应、转移上机等。

- 去除尿素:尿样中加入 20 μL 尿素酶 (40 units),混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 30min,分解尿素,消除干扰;
- 添加内标:孵育完的尿样和质控液中分别加入 40 μL 内标 (含十七烷酸、托品酸),纯水定容至 2mL,振荡 10s 充分混匀;
- 沉淀蛋白:1mL 移液器移取 900 μL 冰乙醇,涡旋 5s 后,在冷冻离心机中以 4 $^{\circ}\text{C}$, 14000rpm 冷冻离心 10min。注意提前开启离心机,以达到所需温度 4 $^{\circ}\text{C}$;
- 脲化反应:用 100 μL 移液器移取 0.2%羟胺乙醇溶液 50 μL 至每个离心管,振荡 5s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10min;
- 氮气吹干:将离心管置于可加热型氮吹仪中,在常温或 60 $^{\circ}\text{C}$ 下,将有机提取物氮吹至干,约耗时 30min;(注意应避免吹干过度造成降解以及不完全干燥造成的衍生化效率降低);

- f) 衍生反应：加入 100 μ L N, O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(含 1%三甲基氯硅烷)(BSTFA+TMCS,99:1)或成分类似的商业试剂,在 70 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,让尿液提取物中的有机酸形成稳定的甲基硅烷化衍生物;
- g) 离心、转移上机：硅烷化反应完成后,冷却至室温,转移至色谱进样瓶内插管并以 14000rpm 常温离心 4min 后,上机分析。

7.1.4 (半定量)样本前处理

取 0.2mg 尿肌酐当量的尿液或尿滤纸片复溶液进行前处理,流程包括去除尿素、添加内标、脲化反应、液液萃取、氮气吹干、衍生反应、转移上机等。

- a) 去除尿素：尿样中加入 20 μ l 尿素酶(40 units),混匀后 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 30min,分解尿素,消除干扰。
- b) 添加内标：孵育完的尿样和质控液中分别加入 40 μ L 内标(含十七烷酸、托品酸、二十四烷),纯水定容至 2 mL,振荡 10s 充分混匀。
- c) 脲化反应：加入 5N (mol/L) 的氢氧化钠调节 pH 值至 12~14,加入 5%盐酸羟胺,充分振荡混匀后室温下反应 60min,再加入盐酸(37%)调节 pH 值至 1.0。
- d) 液液萃取：加入 3ml 乙酸乙酯,充分混匀后 4000rpm 离心 5min,上层有机相转移至干燥洁净的离心管,重复上述萃取转移操作一次,合并有机相。
- e) 氮气吹干：将离心管置于可加热型氮吹仪中,在常温或 60 $^{\circ}$ C 下,将有机提取物氮吹至干,约耗时 30min;(注意避免吹干过度造成降解以及不完全干燥造成的衍生化效率降低)。
- f) 衍生反应：加入 N, O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(含 1%三甲基氯硅烷)(BSTFA+TMCS,99:1)或成分类似的商业试剂,在 70 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,让尿液提取物中的有机酸形成稳定的甲基硅烷化衍生物。
- g) 转移上机：待衍生物自然冷却至室温后,转移至色谱进样瓶内插管,上机分析。
- h) 数据处理：以十七烷酸为定量内标,分析

7.2 样本检测结果与报告

7.2.1 质谱检测结果

质谱检测结果应包含但不限于以下内容：检测样本标识信息、检测目标化合物名称和通用标识、目标化合物浓度值、参考范围等信息。

7.2.2 样本检测报告

样本检测报告包含但不限于以下内容：

- a) 样本信息：样本来源信息、样本唯一性标识、样本类型、样本状态、采样日期、送检日期、以及用于判断结果所应的其他信息等；
- b) 检测信息：检测方法、检测项目、检测范围、必要的检测性能指标、实验室名称、实验室联系方式、检测人员、审核人员、检测结果对应的解释或数据资料、样本接收日期、报告日期等；
- c) 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。首次启用质控品进行多次质控测试(≥ 20 次),计算平均值和标准偏差,选择 Westgard 质控规则,绘制质控图每次质控结果做好质控记录。

7.3 检测质量控制与管理

7.3.1 实验室要求

7.3.1.1 实验室区域的设置和环境应满足实验环节和仪器的要求，并根据应用领域，符合相关检测实验室的规范。

7.3.1.2 检测人员、分析报告人员等应具备相应的专业背景，经过专业培训并取得上岗资质。

7.3.1.3 实验室检测体系应优先选用商品化的检测试剂。

7.3.1.4 实验室自建方法应有严格的试剂制备标准操作规程，并经性能验证合格后方可使用。

7.3.2 检测过程的质量管理

7.3.2.1 实验室应建立质量管理体系，对检测全流程进行管理。对样本采集和保存运输、实验设备、检测实验操作、分析和报告等各个环节均需建立相应的标准操作规程（SOP）。

7.3.2.2 实验过程应设置相应的质控品与质控方案进行室内质量控制，通过商品化途径购买的或自行配制的质控品，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。实验室需对质控品检测结果进行记录和评价，并定期进行回顾分析。

7.3.2.3 实验室应定期参加相关检测项目的室间质量评价或能力验证，或者通过实验室间比对，判断检测结果的可接受性。

附录 A
(资料性)
仪器参数和试剂

A.1 仪器参数

色谱柱：DB-5 30m × 0.25mm × 1.00 μm
 柱温程序：100 °C(4min) - 4 °C /min - 280 °C (11min)
 进样口温度：280 °C
 进样方式：分流 (10: 1)
 流量控制方式：恒线速度(43.0cm/sec)
 离子源温度：200 °C
 接口温度：280 °C
 溶剂切割时间：4min
 采集方式：SCAN
 质量范围：50 amu ~ 500 amu

A.2 尿液有机酸 GCMS 检测配套通用试剂

尿液有机酸 GCMS 检测配套通用试剂宜应采用成熟的商业化预处理试剂或自配，包括但不限于有机酸萃取、脲化反应，硅烷化反应、标准曲线、酶解等试剂，在不同应用条件下可进行适应性调整，推荐配方见表 A.1，表 A.2，表 A.3 和表 A.4。

表 A.1 尿基质配方表

试剂名称	级别
尿素酶	/
浓盐酸	37%
氢氧化钠	色谱纯
乙酸乙酯	色谱纯
乙醇	色谱纯
盐酸羟胺	色谱纯

表 A.2 5N (mol/L) 的氢氧化钠溶液配制配方表

配制总量 (mL)	称取氢氧化钠质量 (g)	超纯水体积 (mL)
100	20	100

表 A.3 5%盐酸羟胺溶液配制配方表

配制总量 (mL)	称取盐酸羟胺质量 (g)	超纯水体积 (mL)
5	0.25	5

表 A.4 0.2% 羟胺乙醇溶液配制配方表

配制总量 (mL)	称取羟胺质量 (mg)	乙醇体积 (mL)
5	10	4.9

附录 B

(资料性)

尿液有机酸 GCMS 检测预处理程序

尿液有机酸 GCMS 检测预处理程序包括但不限于样本前处理、酶解（除尿素）、添加内标、脲化、液液萃取、硅烷化反应等。推荐程序的流程见图 B.1 和图 B.2。

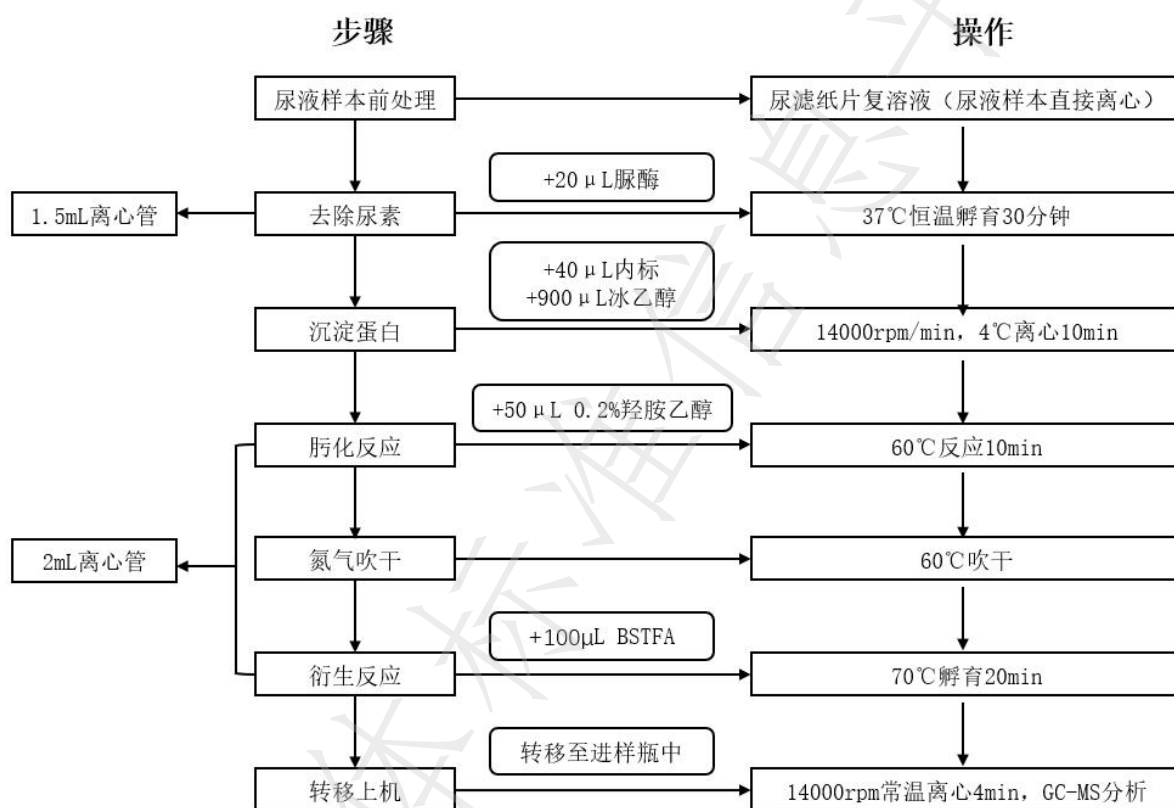


图 B.1 （定量）样本前处理流程

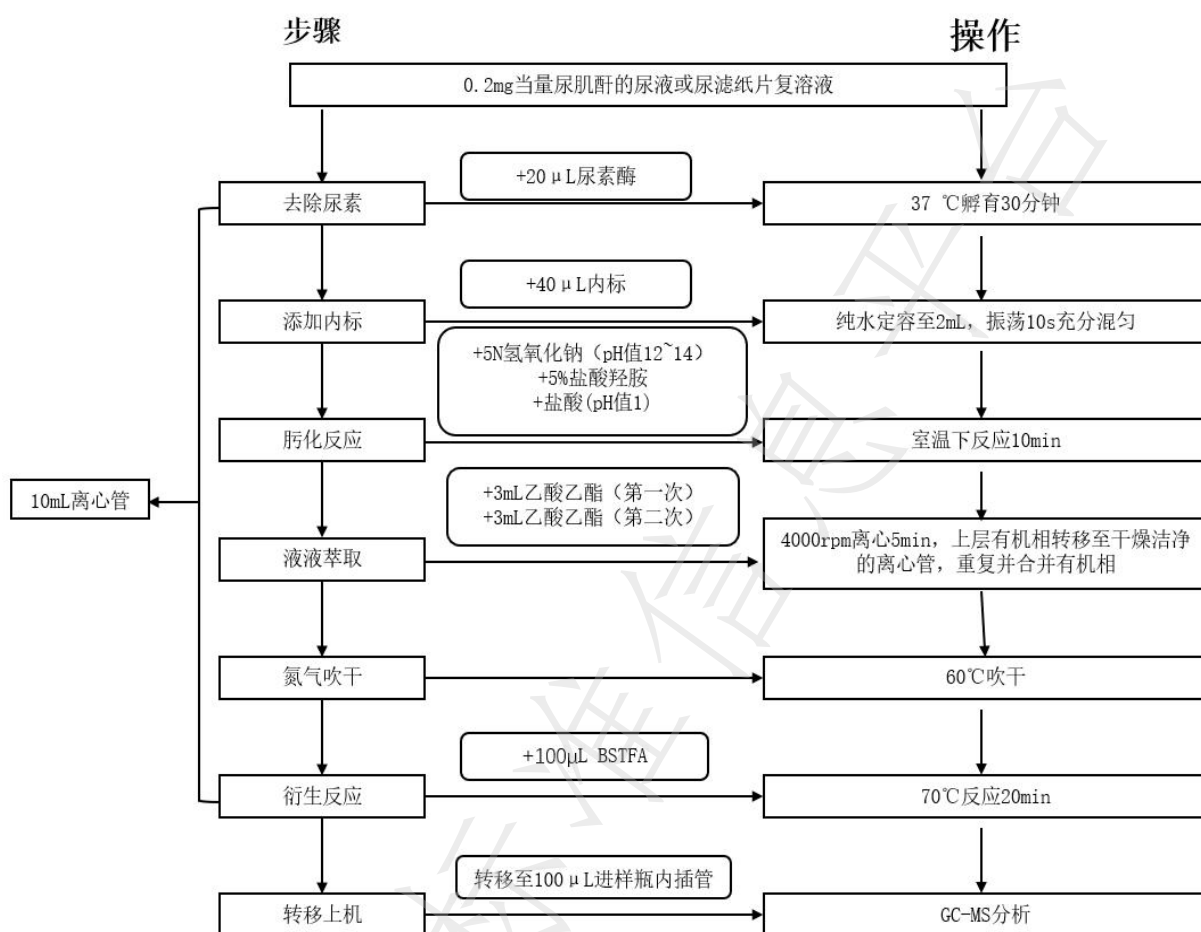


图 B.2 (半定量) 样本前处理流程

参 考 文 献

- [1] GB/T 6041—2020 质谱分析方法通则
 - [2] GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法
 - [3] GB/T 19702—2005 体外诊断医疗器械生物源性样品中量的测量参考测量程序的说明
 - [4] GB/T 26124—2011 临床化学体外诊断试剂（盒）
 - [5] GB/T 29791.3—2013 体外诊断医疗器械制造商提供的信息标示
 - [6] GB/T 33864—2017 质谱仪通用规范
 - [7] WS/T 408—2012 临床化学设备线性评价指南
 - [8] WS/T 416—2013 干扰实验指南
 - [9] WS/T 420—2013 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证
 - [10] WS/T 492—2016 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证
 - [11] CLSI-C62-A 2014 Clinical and Laboratory Standards Institute
 - [12] CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南
 - [13] 杨江涛,曾伟宏,田国力等.气相色谱-质谱联用技术尿液多种有机酸检测专家共识[J].罕少疾病杂志,2022,29(08):1-5.
-