

T/HNBX

海南省标准化协会团体标准

T/HNBX XXXX—XXXX

T/CIET XXXX—XXXX

基于液相色谱—质谱联用技术的代谢组学 检测方法和质量控制要求

Metabolomics assays and quality control requirements based on liquid
chromatography-mass spectrometry

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

海南省标准化协会 发布
中国国际经济技术合作促进会

目 次

前言	错误! 未定义书签。
1 范围	错误! 未定义书签。
2 规范性引用文件	错误! 未定义书签。
3 术语和定义	错误! 未定义书签。
4 仪器设备	2
4.1 液相色谱系统	2
4.2 质谱系统	2
4.3 其他设备	2
5 样本采集与制备	3
5.1 样本采集	3
5.2 样本运输	4
5.3 样本接收与验收	4
5.4 储存	4
5.5 样本前处理	4
6 仪器分析	5
7 数据处理	5
7.1 数据预处理	5
7.2 数据质量检查分析	6

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。

本文件由上海鹿明生物科技有限公司提出。

本文件由海南省标准化协会、中国国际经济技术合作促进会共同归口。

本文件起草单位：上海鹿明生物科技有限公司、中国科学院大连化学物理研究所、复旦大学人类表型组研究院、谱络（武汉）医学生物科技有限公司、上海交通大学、途邦认证有限公司。

本文件主要起草人：晏志鹏、林雪琴、刘永录、刘超、周松、陈伟、黎文、姚玉明。

基于液相色谱—质谱联用技术的代谢组学检测方法和质量控制要求

1 范围

本文件规定了基于液相色谱—质谱（以下简称“液质”）联用技术的代谢组学检测方法和质量控制的仪器设备、样本采集与制备、仪器分析和数据处理。

本文件适用于液质联用技术的代谢组学检测方法和质量控制。

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 22373 标准文献元数据
- GB/T 26497 电子天平
- GB/T 30099 实验室离心机
- GB/T 30433 液相色谱仪测试用标准色谱柱
- GB/T 33864 质谱仪通用规范
- GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
- GB/T 38576 人类血液样本采集与处理
- GB/T 38735 人类尿液样本采集与处理
- GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求
- GB/T 42186—2022 医学检验生物样本冷链物流运作规范
- GB/T 44471 生物技术基本术语
- JJG 646 移液器检定规程
- JJF 1265 生物计量术语及定义
- JJF 1317 液相色谱—质谱联用仪校准规范
- WS/T 224 真空采血管的性能验证
- WS/T 225 临床化学检验血液标本的采集与处理

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

代谢组学 metabolomics

代谢组学是关于内源性代谢物的组成及变化规律的科学，英语中使用Metabonomics及Metabolomics两个词，前者是指关于生物系统代谢物整体的科学；后者是指部分代谢物组成及变化规律的科学，是前者的组成部分。鉴于目前尚无能够覆盖所有代谢物的技术，本要求只针对后者，涉及无偏向性的代谢组检测及目标代谢组的检测定量技术。

3.2

质谱仪 mass spectrometer, MS

通过测量物质离子的质量与电荷比值（质荷比，常用 m/z 表示）来分析物质组成、结构及含量的精密分析仪器。

3.3

色谱仪 chromatograph

利用混合物中各组分在色谱固定相与流动相之间结合强度的差异,对各组分进行分离并通过检测器对分离后组分进行定性、定量分析的仪器。

3.4

洗脱梯度 elution gradient

通过程序控制改变流动相的组成,使流动相的洗脱能力随时间逐渐增强,从而使各组分在适宜的时间内以合适的峰宽流出色谱柱,达到高效分离的目的。

3.5

质量控制 quality control

通过监控并修正样本准备、样本前处理、仪器状态、仪器运行、数据处理、批次效应等过程可能出现的变异,保障代谢组学研究所获得数据准确性和精密度的过程。

3.6

质控样本 quality control sample

质控样本是指有认证资质的标准物质或基质有代表性、可验证且可供长期使用的实验室内部标准物质,用于监测仪器与方法稳定重现性,校正批次内及批次间产生的偏移(或批次效应)。

3.7

溶剂空白 solvent blank

不含待测样本但用于配制实际样本的溶剂或溶剂混合物。

3.8

方法空白 method blank

使用不含待测样本但与待测样本相同前处理所得的空白样本。

3.9

保留时间 retention time, RT

液相色谱分析时从样本注入到分析物在检测器中信号达到峰值所经历的时间(常用分钟表示)。

3.10

质量精度 mass accuracy

分析物在质谱中的实测质量与理论质量的差值,常用该差与理论质量的比值(百万分之一,ppm)表示,用以仪器的监测和精准仪器的测量精度。

4 仪器设备

4.1 液相色谱系统

4.1.1 色谱柱的选择应符合:

- a) 根据实验室的情况选择合适粒径和填料的色谱柱;
- b) 色谱柱的活化、使用、储存参考色谱柱说明书并符合 GB/T 30433 要求。

4.1.2 色谱仪及其他参数:

- a) 色谱仪的选择可根据实验室现有超高效液相设备做调整;
- b) 流动相组成、流速、柱温、洗脱梯度、进样体积等,根据实验要求通过优化选择合适的流动相组成、色谱梯度、流速等。

4.2 质谱系统

质谱仪的选择应符合:

- a) 质谱仪的分辨率不应低于20000;
- b) 扫描范围:(70~1500) Da;
- c) 质量精度5 ppm以内,扫描速度(10~30) Hz;
- d) 不同厂家质谱仪选择相对应的质谱采集软件;
- e) 质谱仪器的安装环境应符合GB/T 33864要求。

4.3 其他设备

4.3.1 天平

天平的使用应符合GB/T 26497要求，对于天平的安装环境、温度、湿度，使用过程中的注意事项、校正、维护等均应按该要求实施。仪器由专人进行管理、定期进行维护，使用人员应经考核通过后按照相关标准使用仪器。

4.3.2 移液枪

移液枪的使用应符合厂商说明书或实验室内部SOP等要求，使用人员在上岗前应进行严格的培训，经考核通过后方可使用，在使用的过程中应注意移液枪的摆放、日常维护、操作规范等。移液枪的维护检修应符合JJG 646的要求，检修合格后并出具证书，建议每年至少检定一次。

4.3.3 超声波清洗仪

超声波清洗仪的使用应按照产品说明书，对于仪器的超声频率、温度、时长可根据实验室具体实验内容自行选择。

4.3.4 真空冷冻浓缩离心干燥器

真空冷冻浓缩离心干燥器的使用应按照产品说明书进行，对于仪器的安装环境、温度、湿度，使用过程中的真空度、注意事项、维护等均应按说明书实施。仪器由专人进行管理、定期进行维护，使用人员应经考核通过后按照相关标准使用仪器。

4.3.5 离心机

离心机的安装和使用应符合GB/T 30099要求，对于离心机的安装环境、温度、湿度，使用过程中的注意事项、维护等均应按该要求实施。仪器由专人进行管理、定期进行维护，使用人员应经考核通过后按照相关标准使用仪器。

4.3.6 冷冻研磨仪

冷冻研磨仪的安装和使用需要严格按照仪器说明书进行，根据实验内容设置合适的转速/振动频率和温度。

5 样本采集与制备

5.1 样本采集

5.1.1 动物体液类样本

样本采集过程中应符合以下要求：

- a) 以实验目的来考虑是否 12 小时内禁食禁水，受试者采样过程中详细记录样本采集时间、器械种类及编号等信息；
- b) 血液类样本采血管的选择应符合 WS/T 224 要求；
- c) 血液类样本的采集与制备应符合 WS/T 225 的要求；
- d) 血清与血浆样本应在离心后进行分装、液氮速冻，然后保存在-80 °C 冰箱或液氮罐中；
- e) 尿液样本采集应符合 GB/T 38735 的要求；
- f) 尿液样本采集分装后，应液氮速冻后再保存在-80 °C 冰箱或液氮罐中；
- g) 多中心队列样本采集过程中保证采集部位、处理过程、试剂耗材等的一致性和可溯源性；
- h) 体液类样本在采集过程中采集人员应注意防护，特别注意可能携带易传染疾病的样本。

5.1.2 动物组织样本

样本采集过程中应符合以下要求：

- a) 根据课题研究来选择合适的组织采集部位，尽量保持组织的原有形态，采集的动物样本具有代表性，采集过程保证准确性；
- b) 采集所得组织样本用液氮完全速冻后，再保存在-80 °C 冰箱或液氮罐中；
- c) 多中心队列样本采集过程中保证采集部位、处理过程、试剂耗材等的一致性和可溯源性；

d) 动物组织类样本在采集过程中采集人员应注意防护，特别注意可能携带易传染疾病的样本。

5.1.3 细胞样本

样本采集过程中应符合以下要求：

- a) 采样时间、预处理方法、试剂严格统一；
- b) 细胞的离心收集根据样本的特点使用合适的离心力离心；
- c) 所收集的细胞样本用等渗缓冲液（如 PBS）进行至少三次洗涤，除去残余培养液；
- d) 洗涤后离心所得细胞用液氮速冻后，在-80 °C 冰箱或液氮罐中予以保存；
- e) 细胞类样本在采集过程中采集人员注意防护，特别注意可能携带易传染疾病的样本。

5.1.4 植物叶片、茎、花组织样本

样本采集过程中应符合以下要求：

- a) 将叶片/茎/花，迅速用预冷的 PBS 缓冲液或者纯净水漂洗，并用无尘纸/滤纸片吸干水分；
- b) 放入预冷的冻存管或者厚壁离心管中迅速放入液氮中冷冻处理 15 min 以上；
- c) 若无法马上检测或寄送，样本存放在-80 °C 冰箱或液氮罐中，分装以避免反复冻融。

5.2 样本运输

样本运输过程应符合以下要求：

- a) 保证充足的干冰/液氮，冷链运输宜选择有资质的并符合 GB/T 42186—2022 要求的公司；
- b) 保存容器宜选用厚壁离心管或冻存管，防止管壁、管盖在低温条件下裂开。

5.3 样本接收与验收

运输箱中仍有干冰或液氮并且样本无解冻迹象。

5.4 储存

样本的存储过程应符合以下要求：

- a) 样本宜存放到-80 °C 冰箱或液氮罐中；
- b) 专人管理存储样本冰箱，对于冰箱温度过高（高于-70 °C）、突发断电等情况及时处理并记录，专人管理液氮罐，定时检查补充液氮。

5.5 样本前处理

5.5.1 基本要求

实验人员进行仪器操作时，应按照该仪器的国家标准或产品说明书操作，并定期进行仪器操作的考核，考核通过后方可进行操作。

5.5.2 血液/尿液类样本

样本的前处理过程应符合以下要求：

- a) 将-80 °C 冰箱或液氮罐中保存的样本取出，在冰水混合物中解冻或直接使用新鲜制备的血液/尿液样本；
- b) 加入蛋白沉淀剂，涡旋震荡，4 °C 离心（离心力>13000 g）10 min；
- c) 取上清液进行分析；
- d) 批内质控样本由所有样本上清液等体积混合制备而成。

5.5.3 动物组织类样本

样本的前处理过程应符合以下要求：

- a) 称取一定质量的组织样本到 EP 管中；
- b) 加入小钢珠、提取液，在组织研磨机中研磨（避免温度升高）；
- c) 冰浴超声提取，而后在 4 °C 离心（离心力>13000 g）10 min；
- d) 取上清液进行分析；
- e) 批内质控样本由所有样本上清液等体积混合制备而成。

5.5.4 动物细胞类样本

样本的前处理过程应符合以下要求：

- a) 用预冷的提取液将样本转移到玻璃小瓶中，冻融不少于三次；
- b) 冰浴超声提取，而后在 4 °C 离心（离心力 > 13000 g）10 min；
- c) 取上清液进行分析；
- d) 必要时可将上清进行挥干，用合适溶剂复溶后再分析；
- e) 批内质控样本由所有样本上清液等体积混合制备而成。

5.5.5 植物叶片、茎、花组织样本

样本的前处理过程应符合以下要求：

- a) 称取一定质量的植物样本；
- b) 加入小钢珠在组织破碎机中以温度 -20 °C，震荡频率 50 Hz，单次时长 90 s，静置 ≥ 90 s，循环 ≥ 5 次来研磨，或用液氮速冻后进行人工研磨；
- c) 用甲醇水溶液（V:V=1:1）提取，冰水浴超声；
- d) 4 °C 离心（离心力 > 13000 g），取上清液进行分析；
- e) 批内质控样本由所有样本上清液等体积混合制备而成。

6 仪器分析

6.1 上机前仪器状态的查看：

- a) 正式样本上机前检查质谱仪器的状态，校正后的仪器状态应符合 JJF 1317 要求，必要时可以用实验室内部表征明确的标准物质或仪器公司推荐的物质进一步验证；
- b) 质谱房的条件应符合 GB/T 33864 要求。

6.2 上机前样本的随机排序上机，可根据实验室内部队列的评价标准来自行选择：

- a) 样本无明确分组信息，样本进行随机排序上机；
- b) 有明确分组信息（如空白组、模型组、治疗组等），通过随机排序使每个上机 Batch 中均匀分布各分组样本。

6.3 上机过程中数据质量监控：

- a) 样品数据的采集应采用经过优化、验证且稳定的色谱—质谱条件及参数；
- b) 正式样本上样前先走 3 针溶剂空白、3 针方法空白、8~10 针样本 QC，实际进样序列中建议每采集 8~10 个样本后插入 1 个样本 QC，并在序列结束处加入若干 QC，实现对整个检测过程的连续检测，样本采样过程中不应插入空白等与样本基质不一致的样本；
- c) 上机过程中查看 QC 叠加图、样本中内标的 m/z 与 RT 及质谱响应等，确保检测方法的重现性；
- d) 在 UHPLC 模式下，同一分析物的保留时间精度应在 0.05 min，其保留时间差应小于 0.15 min。

6.4 上机过程中仪器异常状态处理：

- a) 上机过程中质谱仪质量轴偏出 5 ppm 时需要停止上样（具体应根据实际质谱仪精密度设置偏移量），对仪器进行校正，校正后的仪器状态应符合 JJF 1317 要求；
- b) 质谱信号逐渐/突然降低时可排查色谱柱和质谱仪的状态，对色谱柱和质谱仪进行清洗，必要时更换色谱柱、喷针、离子传输管等；
- c) 上机过程中色谱柱出现分离度下降、峰型变差、基线漂移、样品残留污染等情况时可考虑更换色谱柱，色谱柱系统压力明显升高，通过冲洗等方式可降低压力时则不需要更换色谱柱，若无法降低压力则需要更换色谱柱。

7 数据处理

7.1 数据预处理

7.1.1 文件格式转换与质谱数据初步检查

7.1.1.1 通过质谱数据处理软件(质谱仪自带软件或第三方软件,如ProteoWizard MSConvert 软件等)将质谱原始下机数据(.raw、.d等文件格式,因仪器厂商而异)转化为第三方数据处理软件所需格式(推荐mzXML或mzML格式文件)或者其他质谱仪自带软件的格式。

7.1.1.2 对检测QC样本中的20~40个已知典型代谢物的离子流图和质谱图进行提取,并与自建数据库进行保留时间、代谢物质荷比等比对。如果其 ΔtR 小于0.3 min,且质荷比偏差符合所用质谱仪的质量精度要求,才可进行继续数据分析。如果质荷比不符合所用质谱仪质量精度要求,且大于质谱仪质量精度要求的1.5倍,应对数据进行质量轴再校正使之达标(或进行质谱仪维修后再复测)。当部分上述典型代谢物的 ΔtR 大于0.3 min,则需使用内源性保留因子等工具对 ΔtR 进行校正,使之小于0.3 min。两个参数均符合要求时方可进行后续数据分析。

7.1.2 定性定量分析

利用代谢组学处理软件【除XCMS、CAMERA等开源软件外,亦可使用其他商业化数据预处理工具(如Compound Discoverer、MassHunter Profinder、Progenesis QI等)或实验室自研软件】对7.1.1中数据进行基线过滤、峰识别、峰对齐、峰分组、峰筛选、峰积分等操作后(具体参数基于各自软件系统进行设定),再基于保留时间(RT)、精确质量数、二级碎片以及同位素分布等多个维度信息,配以自建数据库进行物质峰的鉴定分析。

7.2 数据质量检查分析

7.2.1 样本数据质量检查分析

对样本物质峰强度进行PCA分析(采用Scaling标准化),评估组内样本的分散程度,同组样本PCA散点应集中。若同组样本出现偏离严重,超出95%置信圈,则应检查出现异常的原因,并依据原因对异常样本进行处理;若同组样本出现明显分簇,应对样本数据进行批次校正,使得校正后PCA散点集中。

7.2.2 QC样本数据质量检查分析

对QC样本数据进行BPC分析和PCA分析,具体如下:

- a) 在重复测量中,BPC图应显示出相似的峰型和强度,确保数据的一致性和操作的可重复性。若出现出峰的RT有明显偏移(大于0.3 min),应进行RT校正,使其达到要求;
- b) PCA分析(采用Scaling标准化):对QC样本进行PCA分析,QC样本应紧密聚集在坐标原点附近,表明此实验稳定性和重复性较好。若QC样本PCA散点偏离严重,超出95%置信圈,则应检查出现异常的原因,并依据具体原因对异常QC样本进行处理;若QC样本出现明显分簇,应对QC样本数据进行批次校正,使得校正后PCA散点集中。

7.2.3 QC样本内标分析

理论上在QC样本中内标的响应强度应保持相对稳定。内标强度归一化后,内标的强度分布应保持相对稳定,内标的强度应分布于-0.3及0.3之间。同时,QC样本中内标的质荷比与自建数据库相应物质的质荷比偏差应小于5 ppm,若偏差超过质量检查标准,则应查明原因,并依据实际原因进行处理; ΔRT 应小于等于0.3 min,若 ΔRT 大于0.3 min,则应查明原因,并依据实际原因进行处理。若出现偏差远大于标准(2倍偏差或以上),则应按实际情况,重新进行实验检测。