

团体标准

T/AHFS 001-2026

食源性污染物所致胎儿生长受限的母血清脂质生物标志物的筛查技术规程

Technical regulation for screening maternal
blood lipid biomarkers of fetal growth
restriction caused by foodborne contaminants

2026-01-05 发布

2026-01-16 实施

安徽省食品科学技术学会 发布



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。

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这些专利的责任。

本文件由安徽医科大学、合肥综合性国家科学中心大健康研究院提出。

本文件由安徽省食品科学技术学会归口管理。

本文件起草单位：安徽医科大学、合肥综合性国家科学中心大健康研究院。

本文件主要起草人：王华、常伟、韦田、袁智、陆淇、吴兰、熊永伟、朱华龙、黄以超、徐德祥
本文件为首次制定。



食源性污染物所致胎儿生长受限的母血清脂质生物标志物的筛查技术规程

1 范围

本文件描述了食源性污染物所致胎儿生长受限（FGR）的母血清脂质生物标志物筛查试验的原理、仪器设备、试剂与材料，规定了试验步骤、数据处理、质量控制、结果报告和生物安全措施。

本文件适用于医疗卫生机构和第三方检测实验室等检测机构使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求

DB4403/T 86 涉及人的生命科学和医学研究伦理审查规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胎儿生长受限 fetal growth restriction, FGR

受母体、胎儿、胎盘等病理因素影响，胎儿生长未达到其应有的遗传潜能。

注：多表现为胎儿超声估测体重或腹围低于相应胎龄第10百分位，是导致围产儿患病和死亡的重要原因，还可能带来远期的不良结局，包括儿童期的认知障碍及成人期疾病（如肥胖、2型糖尿病、心血管疾病、中风等）的发生风险增加。[来自胎儿生长受限专家共识（2019版）]

3.2

同位素标记内标 internal standard, IS

在样品处理前加入的、结构与待测物相似但同位素标记的化合物。

3.3

质控样本 quality control sample, QC

在分析批次中额外插入的、已知特性（如浓度）的样本。用于监控分析过程的重复性、精密度以及可能的批量效应，评估分析系统的稳定性。

3.4

受试者工作特征曲线与曲线下面积 receiver operating characteristic curve and area under the curve, *ROC/AUC*

用于评估二元分类模型性能的计量学指标。受试者工作特征曲线以模型灵敏度为纵坐标、1-特异度为横坐标绘制；曲线下面积（AUC）用于量化模型的整体判别能力，其值越接近1表示判别性能越好。

3.5

变量重要性投影 variable importance in projection, *VIP*

在偏最小二乘等多元统计模型中，用于衡量每个自变量对模型解释与预测能力贡献大小的指标。通常以VIP值大于1.0作为该变量具有显著重要性的常用阈值。

3.6

错误发现率 false discovery rate, *FDR*

在进行多重假设检验时，控制被错误地判定为显著的假阳性结果所占比例的统计校正方法。

4 原理

通过建立发现队列和验证队列，在孕晚期（如34-41周）采集母血清，鉴定出与FGR显著相关的脂质类别及特定分子。进一步，通过预测队列，在妊娠早期（孕14周前）、中期（孕14-28周）、晚期（孕28周后）纵向采集母血清，动态观察脂质变化轨迹，并确定用于早期预测FGR的最佳时间窗口。通过正丁醇-甲醇-甲酸铵混合液进行脂质提取和蛋白沉淀。利用高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）技术，对血清中特定的脂质分子（包括但不限于DG 14:0/18:2, DG 16:0/20:4, TG 14:0/16:0/18:1等）进行高灵敏度、高特异性的分离与检测。采用稳定同位素标记的内标进行定量校正。经统计分析筛选出在FGR组与健康对照组间存在显著差异的脂质生物标志物，并建立其与食源性污染物所致FGR风险的预测模型。

5 仪器设备

高效液相色谱-串联质谱仪（HPLC-MS/MS），配置电喷雾离子源（ESI），具备高分辨质谱能力或至少三重四极杆质量分析器；-86℃超低温冰箱；高速冷冻离心机（最高转速 $\geq 14,000$ g）；涡旋混合器；超声波清洗仪；分析天平（十万分之一）；微量移液器（覆盖0.5-1000 μ L范围）。

6 主要试剂与材料

6.1 基本要求

所用水和试剂均为色谱纯或LC-MS级。

6.2 脂质提取试剂

正丁醇、甲醇、甲酸铵。

6.3 内标混合物

6.3.1 储备液

推荐使用以下同位素标记脂质作为内标，配制于甲醇中，作为储备液：

Phosphatidylcholine (PC) 14:0 (公司：Sigma Aldrich, 货号：P2663, 储备液浓度：20 mM)

Phosphatidylethanolamine (PE 17:0) (公司：Avanti Polar Lipids, 货号：830756P, 储备液浓度：20 mM)

Cholesteryl-d7 ester (CE) 16:0 (d7) (公司：Sigma Aldrich, 货号：700149P, 储备液浓度：6 mM)

Cholesterol (COH) (d7) (公司：Sigma Aldrich, 货号：700041P, 储备液浓度：16 mM)

Bis (monomyristoylglycerol) phosphate (S,R Isomer) (BMP) 14:0 (公司：Avanti Polar Lipids, 货号：857131P, 储备液浓度：5 mM)

N-lauroyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine, powder (SM) 12:0 (公司：Avanti Polar Lipids, 货号：860583, 储备液浓度：5 mM)

Phosphatidylglycerol (PG) 14:0 (公司：Avanti Polar Lipids, 货号：840445P, 储备液浓度：20 mM)

1,3(d5)-dihexadecanoyl-2-octadecanoyl-glycerol (TG 16:0/18:0/16:0) (d5) (公司：Sigma Aldrich, 货号：860902P, 储备液浓度：100 μ M)

脂质生物标志物检测关键试剂配制与保存见附录A。

6.3.2 工作液

推荐使用流动性 B (水:乙腈:异丙醇 = 1:9:90 (v/v), 含 10 mM 甲酸铵) 将标准品储备液稀释成工作液：

除 TG 16:0/18:0/16:0 (d5) 稀释为 50 μ M 外，其余标准品储备液均稀释成 200 μ M 作为工作液。再根据每个样品加入 1 μ L 标准品工作液，配置内标混合液。

6.4 主要材料

微量内插管（尖底带支架）、2.0 mL 进样瓶、PP 实心盖（配 1.5 mm 厚胶垫）和 1.5 mL 无酶 EP 管。

7 试验步骤

7.1 样本采集与储存 孕周 人群规定

建立发现、验证队列，用于筛选并确认生物标志物，队列建立要符合 DB4403/T 86 的要求。宜在孕晚期（建议28周后，分娩前）采集孕妇外周静脉血，获取母血清。样本需来源于明确诊断为 FGR（出生体重<10th百分位）的孕妇及匹配的正常对照孕妇。

建立预测队列，用于评估早期预测价值。需进行前瞻性纵向采样，至少在妊娠早（14周前）、中（14-28周）、晚（28周后）三个时期各采集一次孕妇外周静脉血，获取母血清。最佳预测时间窗口为孕晚期，最早可从29周开始。

采集的新鲜外周血于促凝管中，室温静置30 min。

3000 g 离心10 min后吸取上层血清。

将血清分装至无菌冻存管中，每管不小于100 μ L，并于-80℃超低温冰箱中保存，避免反复冻融（如为冷藏或冷冻血清，4℃冷藏不宜超过7 d，-20℃冷冻样品不宜超过1月，-80℃冷冻样品不宜超过1年）。

7.2 样本前处理（脂质提取）

取50 μ L血清样本至离心管中，加入8 μ L内标混合物和125 μ L脂质提取液（正丁醇:甲醇 = 1:1 (v/v), 含1 mM甲酸铵）。涡旋振荡1 min，充分混匀。将离心管置于冰水浴中，40 KHZ超声处理1 h。在4℃条件下，以14 000 g离心10 min后，吸取上清液，转移至进样小瓶中，用于HPLC-MS/MS分析。

7.3 HPLC-MS/MS 分析

7.3.1 色谱条件

色谱柱：C18反相色谱柱（2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm）

流动相A：水:乙腈:异丙醇 = 5:3:2(v/v)，含10 mM甲酸铵

流动相B：水:乙腈:异丙醇 = 1:9:90 (v/v)，含10 mM甲酸铵

推荐梯度洗脱程序：允许在验证等效性的前提下调整，例如：0-0.5 min, 25% B; 0.5-8.2 min, 49% B; 8.2-12.0 min, 69% -100% B; 12.0-15.1 min, 100%-25% B; 15.1-19.5 min, 25% B。

流速：0.3 mL/min

柱温：45 °C

进样量：2 μL

7.3.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）

扫描模式：正离子模式

检测模式：多反应监测（MRM）

离子源温度：350 °C

毛细管电压：5.5 kV

锥孔气与脱溶剂气流速：根据仪器优化

各脂质分子及内标的MRM离子对、锥孔电压、碰撞能量需通过标准品溶液进行优化并确认，使初次建法的实验室可参考。

8 数据处理与分析

8.1 数据提取

使用质谱工作站软件，根据优化的MRM离子对提取各脂质及内标的色谱峰面积。

8.2 定量计算

采用内标法进行相对定量或绝对定量（如有标准曲线）。计算目标脂质与相应内标的峰面积比值。

8.3 统计分析

基于发现和验证队列数据，采用以下组合策略筛选FGR组与正常组间的差异脂质：1) 单变量统计：t检验或Mann-Whitney U检验，以错误发现率（FDR）< 0.05为显著性阈值；2) 多变量统计：进行正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），选取变量重要性投影（VIP）值 > 1.0 的脂质分子。同时满足以上两个条件的脂质分子可被视为显著差异脂质。

基于预测队列数据，确定与FGR显著相关的脂质分子。绘制受试者工作特征（ROC）曲线，计算曲线下面积（AUC）。选取单指标AUC > 0.75的脂质作为候选预测标志物。通过二元Logistic回归方法，将多个高性能脂质标志物组合，构建联合预测模型。评估联合模型的ROC-AUC、灵敏度、特异度等指标。

使用SPSS、R或Python等进行t检验、方差分析（ANOVA），筛选组间差异脂质（以 $P < 0.05$ 或 $FDR < 0.05$ 为标准）。采用SIMCA-P、MetaboAnalyst等软件进行多变量分析。

9 质量控制

9.1 样本质控

记录样本溶血、脂血情况，严重者应剔除。

避免样本反复冻融（建议冻融次数≤2次）。

9.2 过程质控

空白对照：以纯水代替血清，同步进行前处理和分析，监控背景污染。

质控样本（QC）：

基质效应：将所有待测血清样本等量混合制成混合基质，在每批次样本中穿插进样，用于监控仪器稳定性和数据重现性。基质QC样本的脂质响应RSD应 $\leq 15\%$ 。

标准品QC：配制低、中、高三个浓度的标准品质控样本，用于考察方法的准确度和精密度。准确度应在85%~115%之间，精密度RSD应 $\leq 15\%$ 。

线性范围：目标脂质的定量应在其线性范围内进行。线性范围应通过分析至少5个浓度梯度的标准溶液来确定，其线性相关系数（ r ）应不小于0.99。

回收率：通过加标回收实验进行评估。在空白基质或实际样本中添加低、中、高三个浓度的标准品，其平均回收率一般应在80%~120%之间，或满足特定项目的预期要求。

检出限（LOD）和定量限（LOQ）：LOD和LOQ可通过信噪比法（如 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ ）或基于空白标准偏差的方法进行测定与确认。

9.3 数据质控

内标响应值的RSD应 $\leq 20\%$ 。

批次内及批次间分析物的变异系数（CV）应小于15%。

10 试验报告

试验报告应至少包含以下信息：

- a) 标题和唯一性标识；
- b) 受试者基本信息（匿名化编号、孕周）；
- c) 检测的脂质生物标志物列表及其浓度或相对定量值；
- d) 关键脂质标志物的风险评估结果（例如，基于逻辑回归模型的风险概率，或基于ROC-AUC的预测分类）；
- e) 参考范围或临界值（如已建立）；
- f) 检测日期、检测单位及负责人。

阳性判断标准：当特定脂质标志物组合的预测风险值高于既定临界值，或其在血清中的浓度显著高于健康参考范围时，提示该孕妇存在胎儿生长受限的高风险。脂质标志物仅用于风险评估与预警，不可替代临床诊断。脂质生物标志物筛查系统模块说明见附录B。

11 生物安全措施

样本及结果需匿名化。

血液样本应按潜在传染性生物材料处理，操作和储存符合GB 19489和GB/T 38736的要求。

实验过程中产生的生物废弃物应进行高压灭菌等无害化处理。

实验人员应接受生物安全培训，并佩戴适当的个人防护装备。

附录 A

(规范性)

脂质生物标志物检测关键试剂配制与保存

A.1 脂质提取液的配制

准确量取等体积的正丁醇和甲醇，混合均匀。向混合液中加入固体甲酸铵，使其终浓度为8.0 mM ~ 10 mM。该提取液室温密封保存，有效期1个月。

A.2 内标混合物的配制

根据6.2中规定的浓度，精确称量或吸取各同位素标记内标储备液，用B相稀释并混合，配制成工作液浓度的混合内标。分装后于-80℃保存，避免反复冻融。

附录 B

(规范性)

脂质生物标志物筛查系统模块说明

本文件所涉及的筛选系统包含以下功能模块：

- 样本前处理模块：标准化脂质提取流程；
- 脂质组学检测模块：控制HPLC-MS/MS方法并采集数据；
- 数据质控模块：自动计算内标稳定性、QC样本RSD等；
- 定量数据前处理模块：实现数据过滤、缺失值填补、正态化与标准化；
- 差异脂质分子筛选和分析模块：整合t检验、OPLS-DA、FDR校正和ROC-AUC分析，自动化筛选标志物；
- 脂质生物标志物验证模块：通过多变量逻辑回归评估标志物与FGR风险的关联，验证其稳健性。

