

超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 含量

LCMSMS-270

摘要：本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的定量检测方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 测定的可报告范围为 5-500 ng/mL，日内和日间精密度 (%CV) 分别为 1.4-4.6%、3.3-6.9%，准确度范围为 86.7-111.8%。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，适用于血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的定量分析，能够为临床检验行业的从业人员提供参考。

关键词：LCMS-8045 25-羟基维生素 D₂/D₃ 血清临床检验

维生素 D 是一类脂溶性激素原，对人体的骨骼健康，钙、磷的体内平衡调节起到重要作用，此外维生素 D 还有着广泛的非骨骼效应，与心血管疾病、免疫疾病、糖尿病和肿瘤等疾病密切相关。维生素 D 的缺乏可导致骨骼发育受损，以及各类慢性疾病的发病风险增加，如类风湿性关节炎、软骨化、冠心病、糖尿病和肿瘤等。人体维生素 D 的来源主要有两个途径，一是通过膳食途径摄入的维生素 D₂(酵母或真菌)和维生素 D₃(鱼、鱼肝油或蛋黄)，二是机体经光照将皮肤中的 7-脱氢胆固醇转化为维生素 D₃。

维生素 D 在肝脏中可转化为 25-羟基维生素 D(25OHD)，从而被机体转运或储藏，因此体内 25-OHD 含量可有效反映人体维生素 D 的营养状态。此外，

25OHD 在体内稳定，半衰期长，其浓度水平与体内维生素 D 含量直接相关，因此 25OHD 可作为一类主要的生物标志物用于体现机体维生素 D 水平。

目前，25OHD 的检测方法有多种，包括免疫检测、HPLC 法和 LC-MS/MS 方法等。其中，LC-MS/MS 法具有特异性强、准确度高、分析时间短等特点，被认为是评价机体维生素 D 营养状况的“金标准”。对此，我们使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，并采用 D6-25OHD₂ 和 D6-25OHD₃ 为内标，建立了血清中 25OHD₂/D₃ 的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关从事人员参考。

实验部分

1.1 仪器和试剂

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-C8(2.0 mm I.D. × 50 mm L., 2.2 μm)

流动相：A 相 -2 mM 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)；
B 相 -2 mM 乙酸铵甲醇溶液(含 0.1% 甲酸)

流速：0.4 mL/min

柱温：25°C

进样量：5 μL

自动进样器温度：10°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 85%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	85
3.00	Pumps	Pump B Conc.	98
4.00	Pumps	Pump B Conc.	98
4.10	Pumps	Pump B Conc.	85
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 8.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 300°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 59 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
25OHD ₂	21343-40-8	413.40	395.35*	-27.0	-9.0	-18.0
			355.35	-27.0	-10.0	-23.0
25OHD ₃	63283-36-3	401.40	383.35*	-13.0	-9.0	-25.0
			365.35	-26.0	-10.0	-12.0
D6-25OHD ₂	-	419.45	401.40*	-28.0	-10.0	-13.0
			355.35	-28.0	-8.0	-16.0
D6-25OHD ₃	-	407.45	389.40*	-27.0	-10.0	-26.0
			371.35	-27.0	-11.0	-17.0

*表示定量离子对

1.3 样品制备

1.3.1 标准工作曲线配制

称取 4.0 g BSA 溶于 100 mL PBS, 配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液, 用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 100 µg/mL 的 25OHD₂ 和 25OHD₃ 混合标准储备液, 随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL 和 50 µg/mL 的标准工作液。取 10 µL 标准工作液加入 990 µL 替代基质溶液, 依次配制成标准曲线。用甲醇配制浓度为 25 µg/mL 的 D6-25OHD₂ 和 D6-25OHD₃ 的混合内标储备液, 再用甲醇稀释为浓度为 250 ng/mL 的内标工作液。

1.3.2 样品前处理方法

取 50 µL 样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 µL 的内标溶液, 再加入 140 µL 甲醇, 涡旋蛋白沉淀, 13000 g 高速离心 10 min, 取上清液进样分析。

日内精密度和准确度考察: 一天内制备 4 批不同浓度 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的样本, 每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个。样品进样分析后, 统计精密度变异系数 (CV) 和准确度。

日间精密度和准确度考察: 每天制备 2 批不同浓度 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的样本, 每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个, 连续考察 3 天。统计精密度变异系数 (CV) 和准确度。

结果讨论

2.1 MRM 色谱图

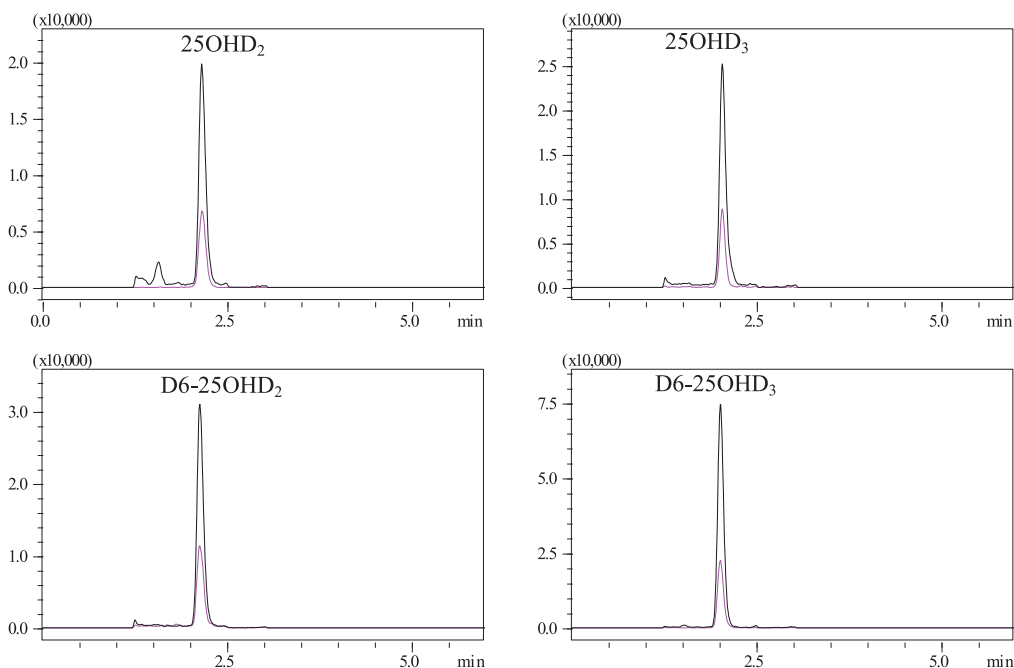


图1 25OHD₂和25OHD₃(20 ng/mL)及其内标物(50 ng/mL)的MRM色谱图

2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的 25OHD，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的 25OHD₃，但未检出 25OHD₂ (如图 2 所示)。因此不宜使用空白血清配制 25OHD 标准曲线，而考虑用 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

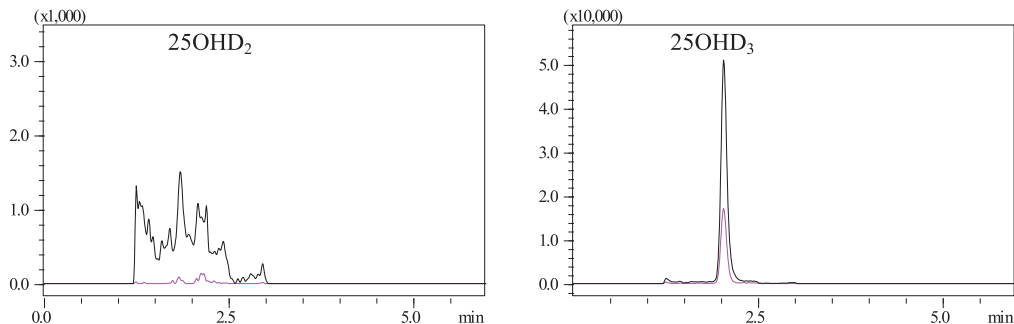


图2 空白血清样品分析结果

2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

分别用血清和4% BSA 溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品经过前处理后，进样分析，分别绘制出血清基质标曲和替代基质标曲 (如图 3 和 4 所示)。

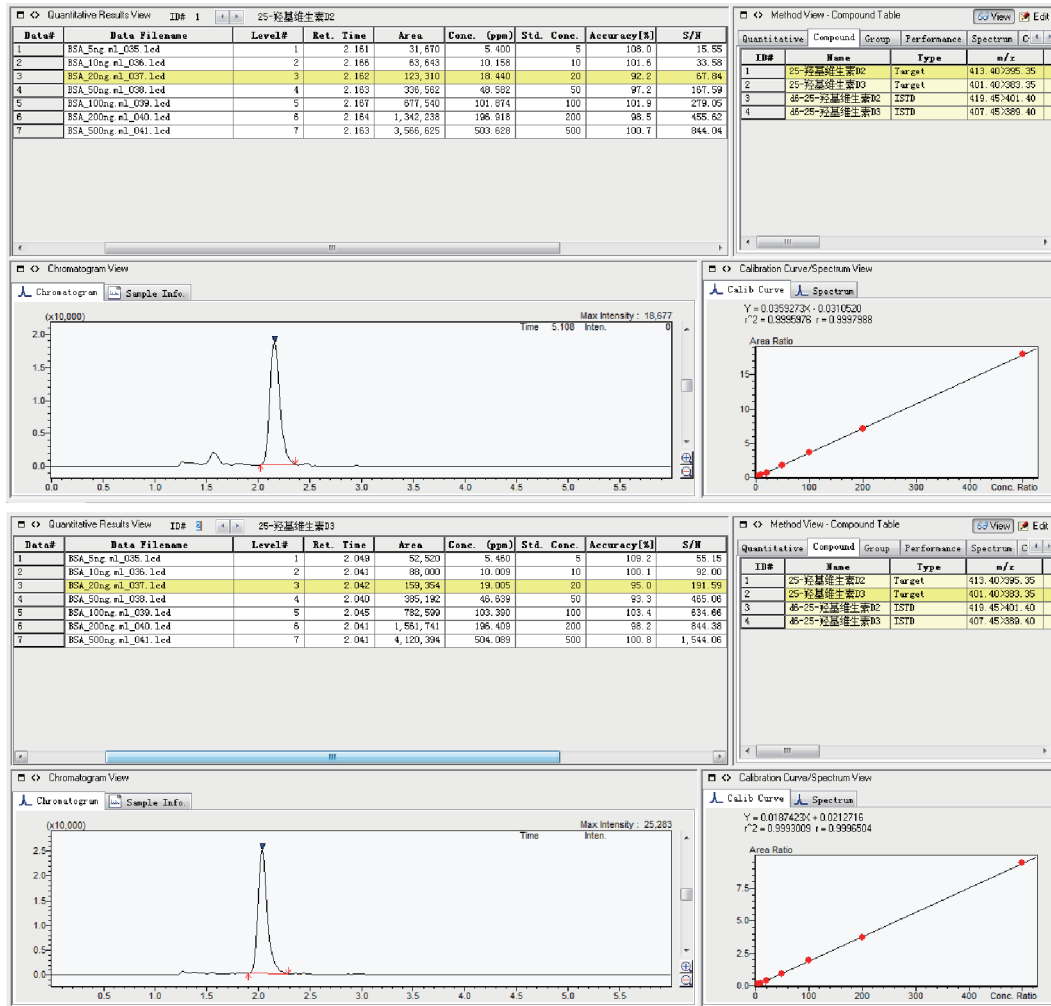


图3 25OHD4% BSA溶液标准曲线(上图为25OHD₃, 下图为25OHD₂)

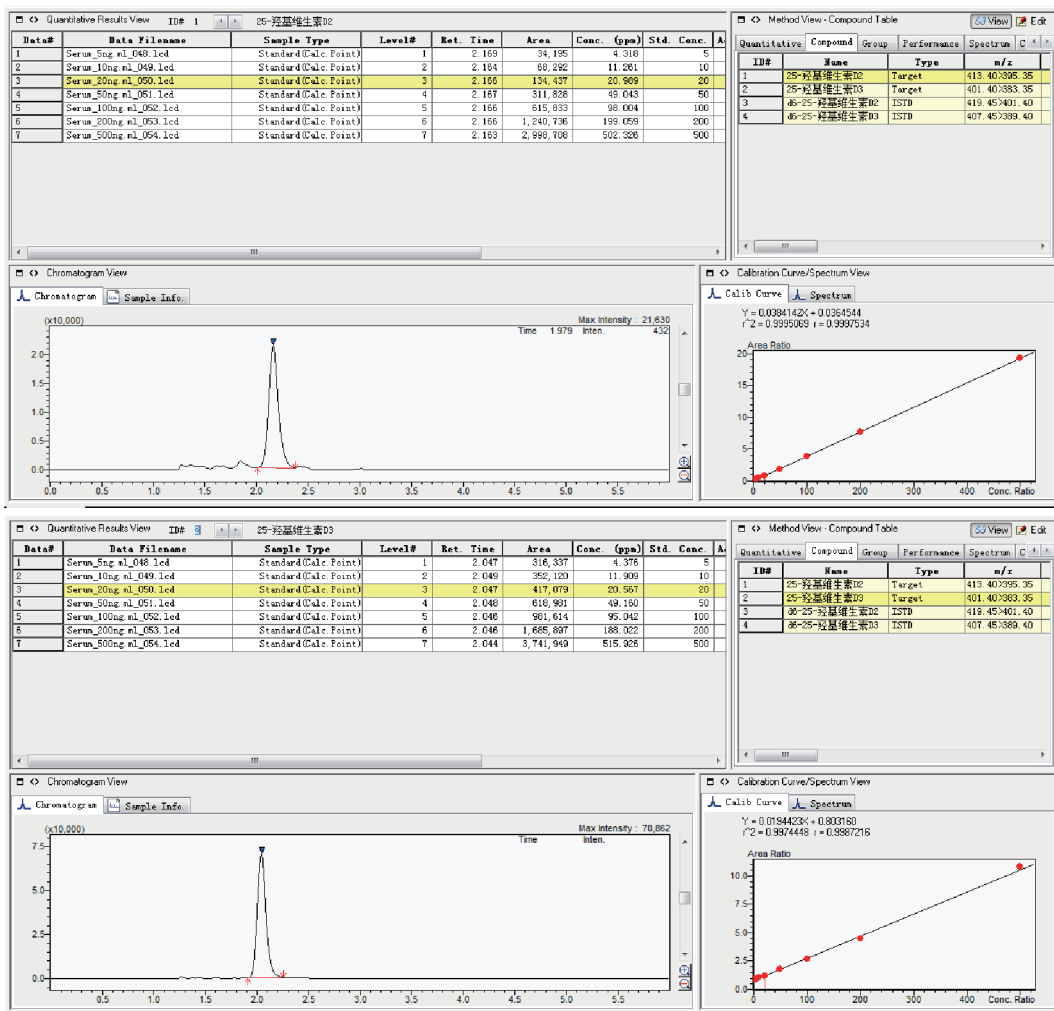


图4 25OHD血清标准曲线(上图为25OHD₂, 下图为25OHD₃)

从结果上看, 4% BSA 溶液配制的替代基质标曲和血清基质标曲相比, 曲线斜率基本相当 (如表 3 和图 5 所示)。此外, 依据标准加入法外推得到 X 轴负截距, 可以计算出血清中 25OHD₃ 的含量为 41.3 ng/mL。

表3 替代基质标曲和血清基质标准曲线比较

目标物	标准曲线	
	4% BSA	血清
25OHD ₂	Y=0.0359273X-0.0310520	Y=0.038412X+0.0364544
25OHD ₃	Y=0.0187423X+0.0212716	Y=0.0194423X+0.803160

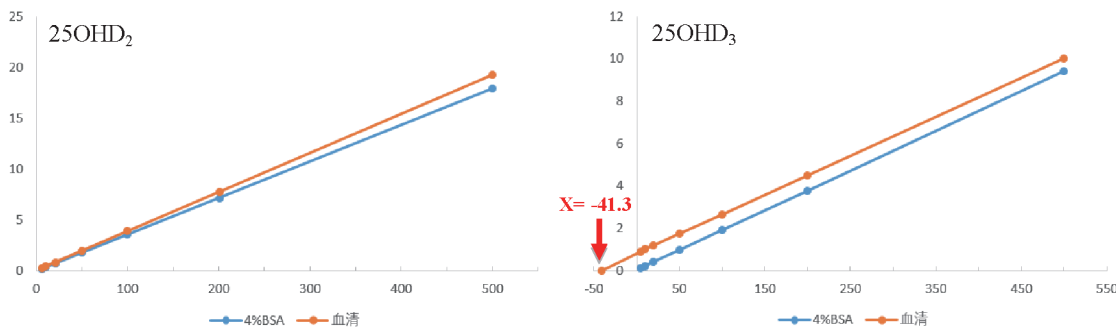


图5 替代基质标曲和血清标曲比较

2.2.2 替代基质标曲测定血清及血清加标样品中 25OHD 含量

分别制备血清及血清加标样品 (加入 25OHD 浓度为 15 ng/mL、50 ng/mL 和 450 ng/mL), 依照上述前处理方法, 各浓度样品平行处理 6 份, 进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度, 结果如表 4 所示。

表4 血清及血清加标样品中25OHD含量测定结果

项目	血清 (E)		血清加标 (E+15 ng/mL)		血清加标 (E+50ng/mL)		血清加标 (E+450ng/mL)	
	25OHD ₂	25OHD ₃	25OHD ₂	25OHD ₃	25OHD ₂	25OHD ₃	25OHD ₂	25OHD ₃
检测均值 (ng/mL)	-	40.3	13.0	55.7	56.4	93.2	465.7	482.3
理论值 (ng/mL)	-	41.3	15.0	56.3	50.0	91.3	450.0	491.3
样品数量 (n)	6	6	6	6	6	6	6	6
相对误差 (%RE)	-	2.3	13.5	1.0	12.9	2.1	3.5	1.8
变异系数 (%CV)	-	2.8	5.3	5.8	2.7	3.6	4.5	2.3

从结果上看, 使用替代基质标曲测定各组样品, 其检测均值和理论值相对误差均 <15%, 变异系数 <15%, 均在可接受范围之内。

2.2.3 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质, 分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性物质 25OHD 的浓度, 该浓度与理论值的偏差在接受范围内 (相对误差均 <15%, 变异系数 <15%), 结果如表 5 所示。

表5 不同稀释倍数下血清中25OHD含量测定结果

项目	1.25 倍稀释		2.5 倍稀释		4 倍稀释	
	25OHD ₂	25OHD ₃	25OHD ₂	25OHD ₃	25OHD ₂	25OHD ₃
检测均值 (ng/mL)	-	34.1	-	17.9	-	10.2
理论值 (ng/mL)	-	33.0	-	16.5	-	10.3
样品数量 (n)	6	6	6	6	6	6
相对误差 (%RE)	-	3.3	-	8.6	-	0.9
变异系数 (%CV)	-	5.7	-	59.2	-	4.6

2.2.4 小结

综上所述, 在血清中 25OHD 的检测实验中, 4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线, 二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清和血清加标样品, 检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外, 采用替代基质稀释血清, 对不同稀释倍数下的样品测定结果, 仍然表现出良好的准确度和精密度。因此, 4% BSA PBS 溶液作为血清替代基质, 用于配制 25OHD 标准曲线或质控样品。

2.3 线性范围及其验证

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线, 按上述前处理方法和分析条件, 采用内标法建立标准曲线。如图 6 所示, 25OHD₂ 和 25OHD₃ 在 5-500 ng/mL 的线性浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数 r 分别为 0.9998 和 0.9997, 准确度范围分别为 92.2-108.0% 和 95.0-109.2%。

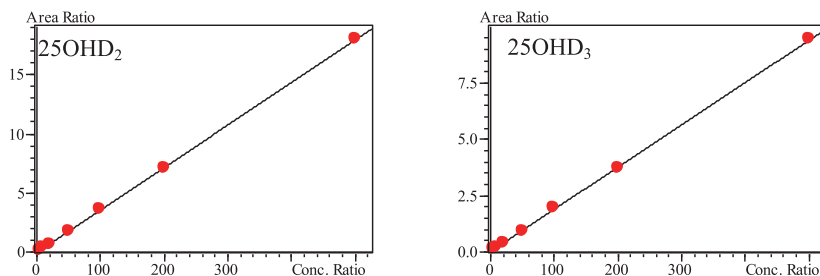


图6 25OHD₂和25OHD₃的标准曲线

确定线性范围后，还需要对线性范围进行进一步验证。配制上限浓度(H, 500 ng/mL)和下限浓度(L, 5 ng/mL)各1例，按照L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、H的体积比，混合成6个不同浓度的样品，每个样品测定2次。以理论浓度值为X，测定浓度均值为Y，计算回归方程 $Y=bX+a$ (如图7所示)。线性方程相关系数 $r>0.975$ ，b在0.97-1.03范围内，表明实验结果可接受。

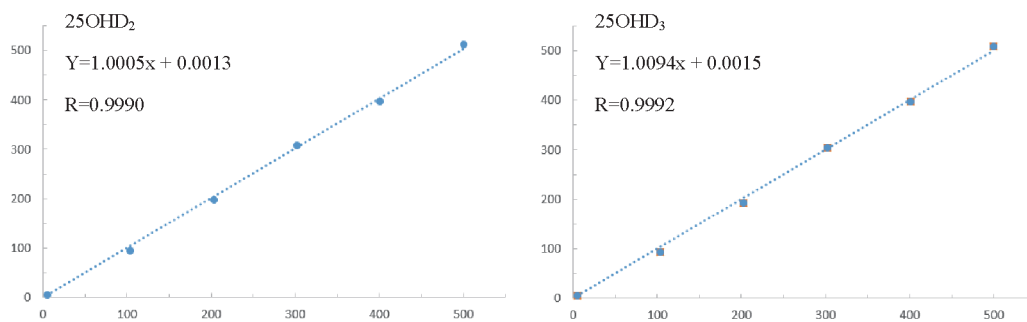


图7 25OHD₂和25OHD₃的线性范围验证

2.4 特异性验证

分别考察空白替代基质、空白替代基质加内标和5 ng/mL 替代基质加标样品，结果表明，替代基质对目标物25OHD₂/D₃及其内标的检测均无干扰，同时内标亦不干扰25OHD₂/D₃的检测 (见图8)。

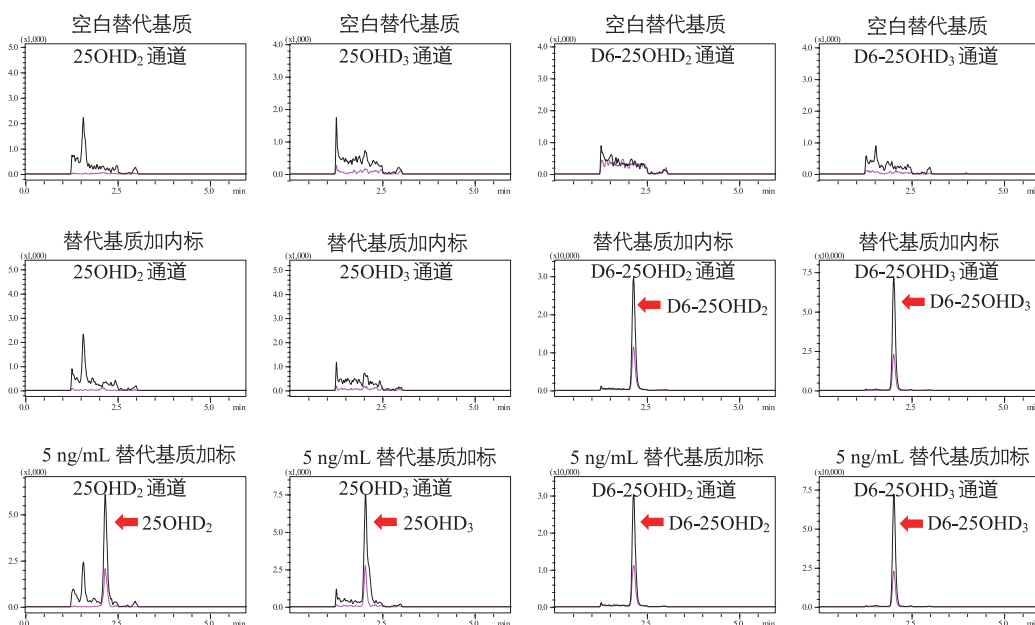


图8 特异性验证结果

2.5 检出限验证

用替代基质配制浓度为5 ng/mL的25OHD样品，共处理20份样品并进样分析，统计RR值，RR值 = 目标峰面积(A-25OHD)/内标峰面积(A-D6-25OHD)，数据结果(见表6)，CV%值小于20，表明5 ng/mL可作为方法检出限。

表6 检出限验证统计结果(n=20)

样品	25OHD ₂			25OHD ₃		
	A-25OHD ₂	A-D6-25OHD ₂	RR 值	A-25OHD ₃	A-D6-25OHD ₃	RR 值
1	30524	162909	0.187	41001	428336	0.096
2	27096	168014	0.161	48929	438004	0.112
3	31283	170608	0.183	48011	434552	0.110
4	28958	174152	0.166	44346	439456	0.101
5	27145	165930	0.164	43656	434848	0.100
6	25931	152855	0.170	44131	395863	0.111
7	28192	164807	0.171	44188	442351	0.100
8	28680	168208	0.171	46255	431137	0.107
9	28177	169696	0.166	45224	437627	0.103
10	25357	163940	0.155	44321	437362	0.101
11	26167	155843	0.168	43840	392601	0.112
12	26384	158522	0.166	45897	425985	0.108
13	29323	163174	0.180	42284	415843	0.102
14	28447	163700	0.174	43635	428778	0.102
15	27268	162107	0.168	43305	415396	0.104
16	26545	138219	0.192	40201	379425	0.106
17	26001	159800	0.163	45370	412973	0.110
18	29092	152625	0.191	40220	394639	0.102
19	26598	163945	0.162	44245	413205	0.107
20	27566	159563	0.173	39745	402631	0.099
%CV	5.7	4.9	5.9	5.5	4.4	4.6

2.6 精密度和准确度验证

2.6.1 日内精密度和准确度

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LOQ(10 ng/mL)、MOQ(100 ng/mL) 和 HOQ(400 ng/mL)。在同一天内，共处理 4 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 7 所示。

表7 日内精密度和准确度考察结果(n=20)

样品	25OHD ₂ (ng/mL)			25OHD ₃ (ng/mL)		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
1-1	9.0	96.6	383.0	9.3	106.6	430.9
1-2	9.0	87.9	385.9	9.7	96.9	431.3
1-3	9.4	92.1	368.5	10.4	108.9	430.5
1-4	9.0	90.9	375.6	10.2	103.4	416.1
1-5	9.1	93.3	398.4	10.1	105.9	431.7
2-1	8.9	95.4	385.5	10.2	106.1	433.9
2-2	9.5	93.6	386.6	10.3	107.8	429.0
2-3	9.2	97.5	384.6	10.4	108.6	432.5
2-4	8.8	87.0	367.5	9.9	97.8	419.3
2-5	10.0	92.8	389.9	9.5	105.5	437.9
3-1	9.2	100.4	385.4	10.2	106.5	433.5
3-2	9.1	86.8	372.8	9.5	100.5	422.4
3-3	9.0	94.4	377.2	9.6	108.5	420.9
3-4	8.8	98.8	377.3	10.3	106.4	426.5
3-5	8.9	92.9	388.3	10.2	104.0	435.3
4-1	9.3	98.7	387.5	9.2	105.1	434.5
4-2	10.0	87.4	387.4	10.4	98.8	426.6
4-3	9.2	92.9	379.2	9.9	106.3	433.3
4-4	9.1	86.7	375.7	9.9	96.1	425.6
4-5	9.3	91.1	380.4	10.0	102.4	430.9
均值	9.2	93.0	381.9	10.0	104.2	429.0
%CV	3.6	4.6	2.0	3.7	3.9	1.4
%accuracy (MIN)	87.7	86.7	91.9	81.7	92.2	96.1
%accuracy (MAX)	100.3	100.4	99.6	102.9	103.8	108.9

2.6.2 日间精密度和准确度

每天处理 2 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个，连续 3 天。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数(%CV)和准确度(%accuracy)，结果如表 8 所示。

表8 日间精密度和准确度考察结果(n=30)

样品	25OHD ₂ (ng/mL)			25OHD ₃ (ng/mL)		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
Day 1-1	9.0	96.6	383.0	9.3	106.6	430.9
Day 1-2	9.0	87.9	385.9	9.7	96.9	431.3
Day 1-3	9.4	92.1	368.5	10.4	108.9	430.5
Day 1-4	9.0	90.9	375.6	10.2	103.4	416.1
Day 1-5	9.1	93.3	398.4	10.1	105.9	431.7
Day 1-6	8.9	95.4	385.5	10.2	106.1	433.9
Day 1-7	9.5	93.6	386.6	10.3	107.8	429.0
Day 1-8	9.2	97.5	384.6	10.4	108.6	432.5
Day 1-9	8.8	87.0	367.5	9.9	97.8	419.3
Day 1-10	10.0	92.8	389.9	9.5	105.5	437.9
Day 2-1	9.4	98.0	372.4	10.2	102.0	421.5
Day 2-2	9.2	92.0	380.2	9.5	97.5	438.6
Day 2-3	10.1	99.5	384.5	9.6	106.3	434.4
Day 2-4	9.6	90.3	408.7	9.8	96.4	440.7
Day 2-5	9.2	90.0	372.5	9.9	106.2	421.2
Day 2-6	9.0	100.5	378.8	9.4	105.8	428.1
Day 2-7	9.0	91.5	391.9	10.5	107.5	426.5
Day 2-8	9.7	111.6	388.7	9.7	107.2	434.2
Day 2-9	9.2	108.7	403.3	9.3	104.1	430.2
Day 2-10	10.0	106.7	401.2	9.9	98.7	433.4
Day 3-1	9.7	106.3	433.8	10.0	106.3	412.1
Day 3-2	10.0	106.4	442.8	10.0	106.4	414.1
Day 3-3	10.3	95.8	434.8	9.8	95.8	409.9
Day 3-4	10.1	106.6	433.4	10.2	106.6	401.8
Day 3-5	9.7	107.5	441.0	10.1	107.5	407.8
Day 3-6	9.7	99.5	447.4	9.7	99.5	418.3
Day 3-7	10.2	98.1	428.3	10.0	98.1	416.6
Day 3-8	10.2	99.1	420.2	9.8	99.1	409.8
Day 3-9	10.5	103.6	434.1	10.1	103.6	408.1
Day 3-10	9.9	102.2	444.6	10.2	102.2	412.6
均值	9.6	98.0	402.3	9.9	103.5	423.8
%CV	5.2	6.9	6.6	3.3	4.0	2.6
%accuracy (MIN)	87.8	87.0	91.9	92.7	92.9	100.5
%accuracy (MAX)	105.5	111.6	111.8	105.3	108.9	110.2

2.6.3 小结

综上所述, LOQ、MOQ 和 HOQ 的日内精密度和准确度范围分别为 1.4-4.6% 和 86.7-109.5%, 日间精密度和准确度分别为 3.3-6.9% 和 87.8-111.8%, 均在可接受范围内。

2.7 携带污染率验证

制备高浓度样品 (H, 500 ng/mL) 和低浓度样品 (L, 5 ng/mL) 各 1 例。连续测定 H 样品 3 次, 得到的浓度值分别为 H1、H2、H3; 再测定 L 样品 3 次, 得到的浓度值分别为 L1、L2、L3。依据公式: 携带污染率 = $[(L1-L3)/(H3-L3)] \times 100\%$, 计算得到污染率。当携带污染率 < 2%, 表明没有携带污染。实验结果如表 9 所示, 25OHD₂ 和 25OHD₃ 的计算携带污染率分别为 0.06% 和 0.04%, 表明高浓度样品分析不会造成携带污染。

表9 携带污染率考察结果

	H1	H2	H3	L1	L2	L3	携带污染率
25OHD ₂	492.0	491.0	499.6	5.3	4.8	5.0	0.06%
25OHD ₃	536.6	536.5	520.9	4.6	4.9	4.8	0.04%

2.8 临床样品测定结果

共获取正常人血清临床样品 10 个，经前处理后分别进行测定，结果如表 10 所示。一般正常人体内 25-OHD 的含量为 10-60 ng/mL，各临床样品测定数值均在正常范围内，因此该方法适用于临床血清样品的检测。

表10 正常人血清临床样品检测结果

编号	25OHD ₂ (ng/mL)	25OHD ₃ (ng/mL)	总计 (ng/mL)
1	未检出	25.1	25.1
2	未检出	27.9	27.9
3	未检出	31.5	31.5
4	未检出	29.3	29.3
5	未检出	30.2	30.2
6	未检出	30.1	30.1
7	未检出	29.7	29.7
8	未检出	30.9	30.9
9	未检出	33.1	33.1
10	未检出	33.8	33.8

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，通过替代基质配制标曲，结合蛋白沉淀法及内标定量法，建立了在 6 min 内测定血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的分析方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对 25OHD₂/D₃ 测定的可报告范围为 5-500 ng/mL，日内和日间精密度 (%CV) 分别为 1.4-4.6%、3.3-6.9%，准确度范围为 86.7-111.8%，均能满足临床检测要求。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，适用于临床实验中测定人血液中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的含量，从而指导相关疾病治疗及临床合理用药。