

应用 Nexera MX System 平行液相三重四极杆质谱联用系统检测人血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 含量

LCMSMS-348

摘要：本文使用岛津 Nexera MX System 平行液相系统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 测定的可报告范围分别为 0.3900-50.00 ng/mL、1.172-150.0 ng/mL；精密度 (CV%) 分别为 1.6-3.1%，准确度范围分别为 96.9-106.9%。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，且大大提高了分析效率，节省了仪器采购与检测成本，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，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(25-OHD)，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，25-

OHD 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 25-OHD 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，25-OHD 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 Nexera MX System 平行液相系统和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了血清中 25-OHD₂/D₃ 的定量分析方法，该方法是第一次将平行液相技术应用于 25-OHD₂/D₃ 的检测，较常规 LCMS 方法，极大地缩短了分析检测时间，降低了设备及分析成本，提高了检测效率及经济效益，凸显了该技术的优势。

实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera MX System 平行液相系统与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：LC-20AD_{XR}×4 输液泵，DGU-20A_{SR}×2 在线脱气机，SIL-30ACMP 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. 5.89 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 -0.1% 甲酸水 B 相 -0.1% 甲酸 -2 mM 乙酸铵 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：25℃

进样量：20 μL

自动进样器温度：4℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 85%，时间程序见表 1 - 3

阀切换时间：0.15 min

液相模式：Binary gradient × 2

平行液相分析模式：Automatic 1

表1 parallel LC 1梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	85
0.51	Pumps	Pump B Conc.	98
2.00	Controller	Stop	

表2 parallel LC 2梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0	Pumps	Pump B Conc.	85
2.00	Controller	Stop	

表3 单液相梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.5	Pumps	Pump B Conc.	85
0.51	Pumps	Pump B Conc.	98
1.60	Pumps	Pump B Conc.	98
1.61	Pumps	Pump B Conc.	85
4.00	Controller	Stop	

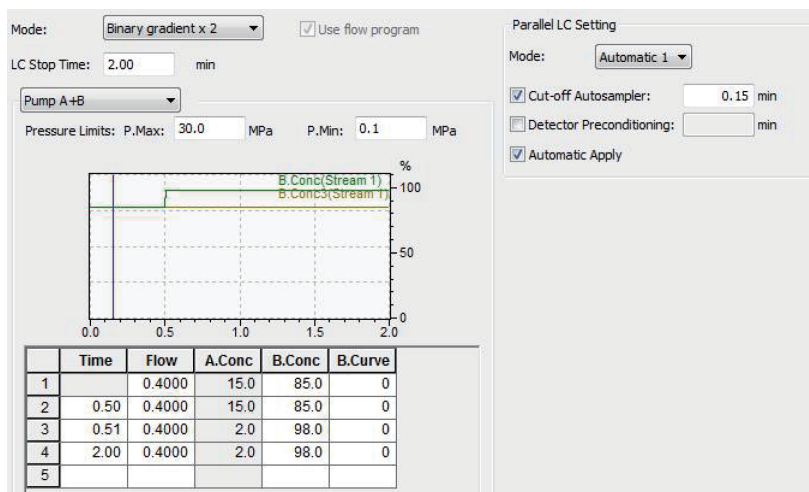


图1 液相分析条件

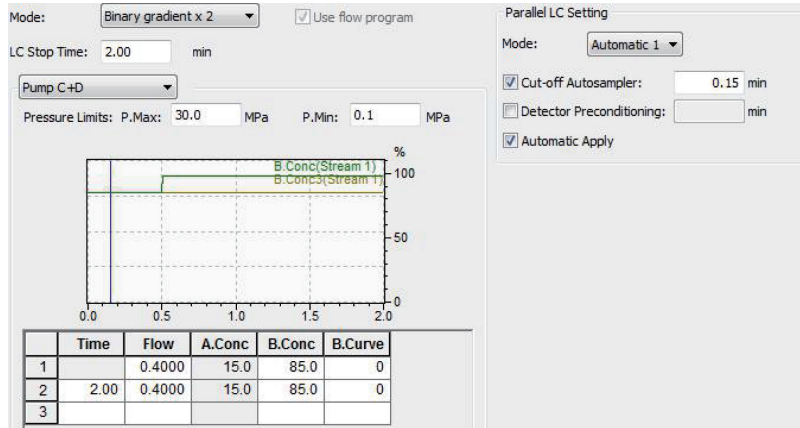
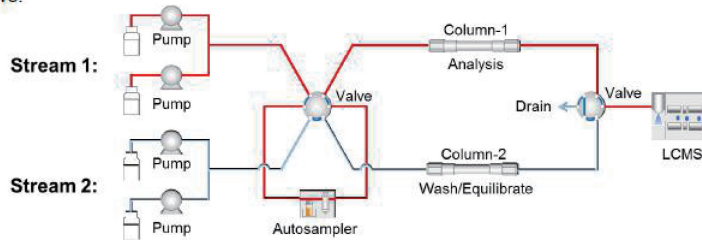


图2 液相冲洗平衡条件

1. Loading Sample

Hold as initial condition until the sample injected from Autosampler is loaded out of flow selection valve.



2. Cutting Off Autosampler Flow Path

Switch flow selection valve and cut off Autosampler flow path.

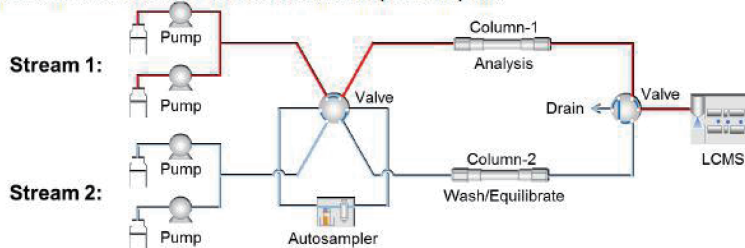


图3 parallel LC 简易设计图及工作原理示意图

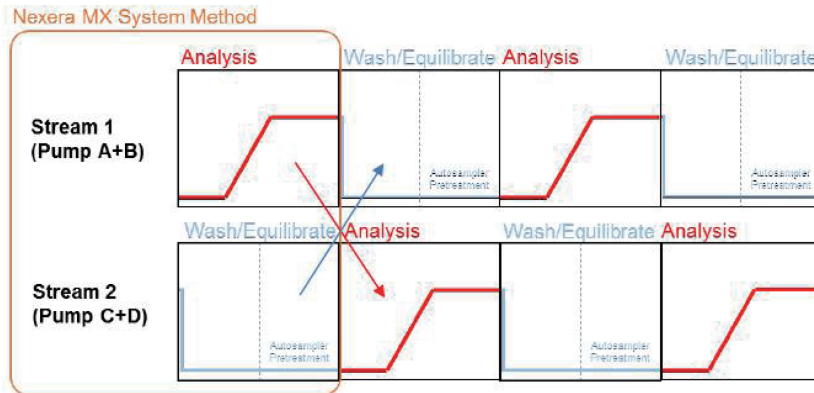


图4 Parallel LC 分析方法切换方式示意图

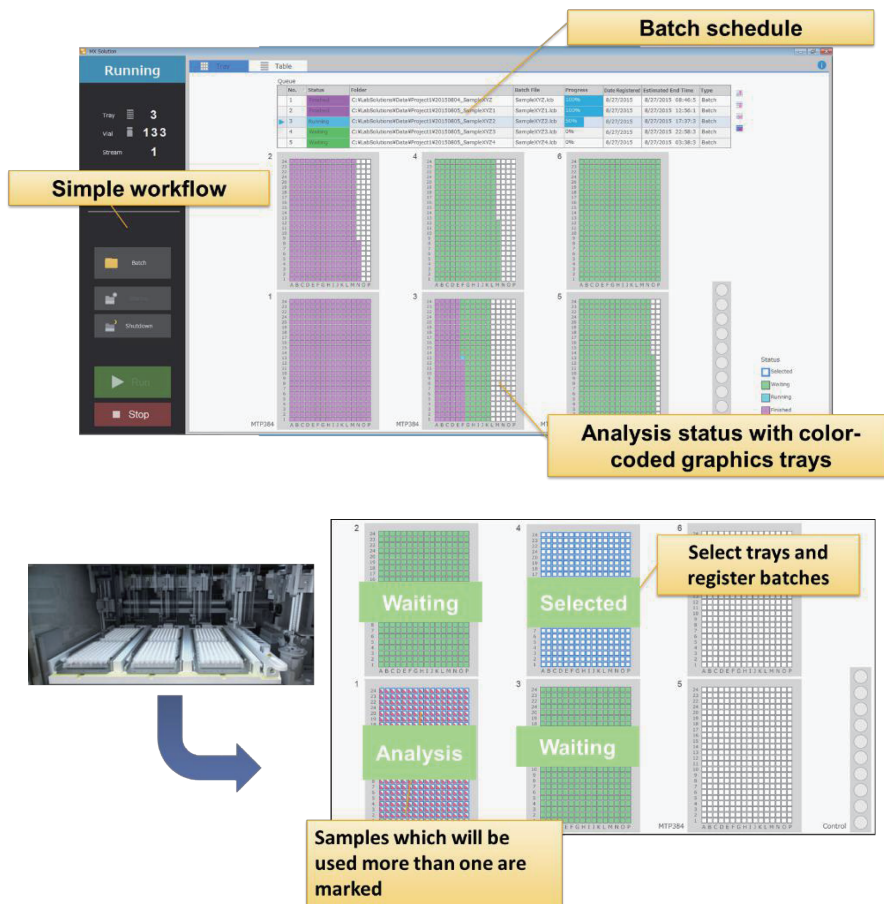


图5 MXSolution 软件布局及功能

质谱条件

离子源：ESI (+)

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：150°C

加热模块温度：500°C

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

MRM 参数：见表 4

表4 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)
25-OHD ₂	21343-40-8	413.3	337.3	-15.0	-11.0	-24.0
25-OHD ₃	63283-36-3	401.3	365.4	-20.0	-11.0	-17.0
d3-25-OHD ₂	-	416.3	340.4	-12.0	-12.0	-21.0
d6-25-OHD ₃	-	407.3	371.3	-29.0	-11.0	-25.0

1.3 样品制备

1.3.1 标准工作曲线配制

用乙醇配制 25-OHD₂ 和 25-OHD₃ 浓度分别为 100 μg/mL、300 μg/mL 的混合标准储备液，随后用 75% 甲醇 (0.1% 甲酸) 将混合标准储备溶液逐级稀释成浓度为 0.3900 ng/mL、0.7810 ng/mL、1.563 ng/mL、2.344 ng/mL、6.250 ng/mL、12.50 ng/mL、25.00 ng/mL 和 50.00 ng/mL 的 25-OHD₂ 标准工作液；1.172 ng/mL、2.344 ng/mL、4.688 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、37.50 ng/mL、75.00 ng/mL、150.0 ng/mL 的 25-OHD₃ 标准工作液；用乙醇配制 d3-25-OHD₂ 和 d6-25-OHD₃ 浓度分别为 100.0 μg/mL、300.0 μg/mL 的混合内标储备液，再用 75% 甲醇 (0.1% 甲酸) 稀释为浓度为 50.00 ng/mL、150.0 ng/mL 的内标工作液。

1.3.2 样品前处理方法

取 100 μL 血清样品或标准工作液于 1.5 mL 离心管中，加入 10 μL 内标溶液，充分混匀；加入 200 μL 乙醇；剧烈震荡 30 s，室温静置 15min；加入 1 mL 正己烷，剧烈震荡 30 s，14000 g 以上离心 5 min；取最上层有机层 850 μL，室温下氮气吹干，加入 75% 甲醇 (0.1% 甲酸) 溶液 100 μL，充分混匀 30 s。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

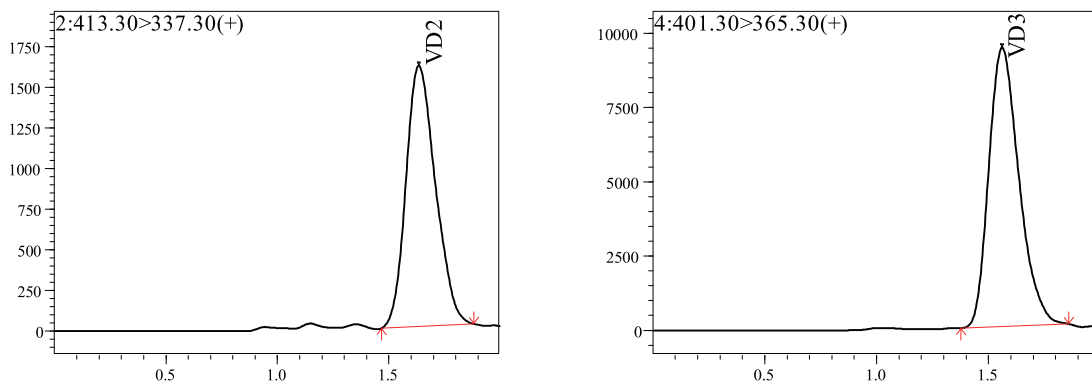


图6 定量下限0.3900 ng/mL 25-OHD₂和1.172 ng/mL 25-OHD₃色谱图

2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线。如图 7 所示，25-OHD₂ 在 0.3900-50.00 ng/mL 的线性浓度范围内，25-OHD₃ 在 1.172 – 150.0 ng/mL 线性相关性良好，相关系数 r 分别为 0.9998 和 0.9998，准确度范围分别为 97.6-105.2% 和 99.5-103.8%。

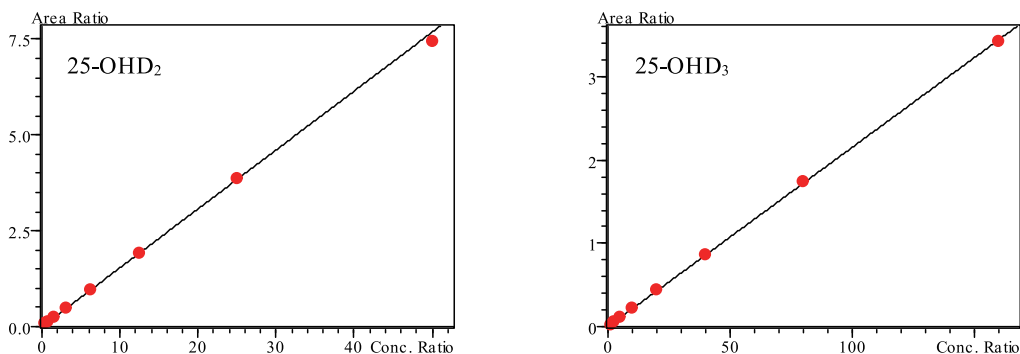


图7 25-OHD₂和25-OHD₃的标准曲线

表5 标准曲线结果

目标物	线性方程	相关系数	准确度
25-OHD ₂	$Y = (0.153748)X + (-7.87094e-005)$	0.9998	97.6-105.2%
25-OHD ₃	$Y = (0.0215177)X + (-0.000397393)$	0.9998	99.5-103.8%

2.3 检出限与定量限

将 25-OHD₂ 与 25-OHD₃ 的标准曲线最低点用稀释液逐级稀释得到信噪比约为 3 时，得到检出限，浓度分别为 0.0390 ng/mL 与 0.1172 ng/mL，色谱图见图 8-9。

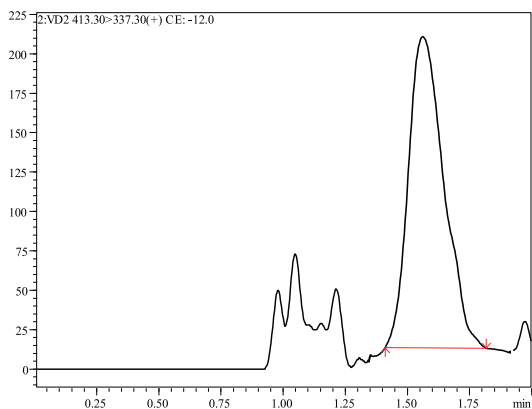


图8 25-OHD₂检出限色谱图

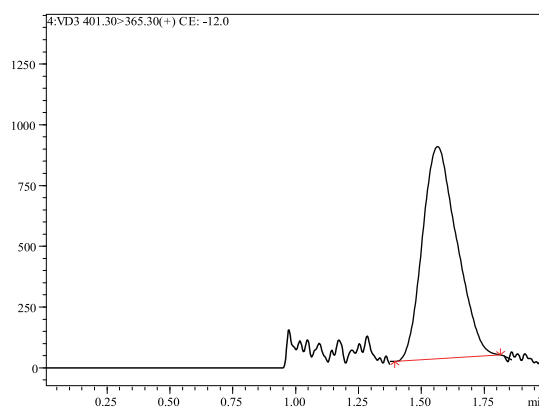


图9 25-OHD₃检出限色谱图

关于定量下限的确定，综合考虑定量下限的准确度与精密度以及人体中 25-OHD 的实际含量范围，经验证，25-OHD₂ 与 25-OHD₃ 的定量下限分别为 0.3900 ng/mL 与 1.172 ng/mL 时，更加能够保证检测的准确有效性。色谱图见图 6。

2.4 精密度验证

分别取处理后且已知浓度的低、高两个浓度的质控样品，25-OHD₂ 即 LQC(2.439 ng/mL)、HQC(9.367 ng/mL)，25-OHD₃ 即 LQC=5.297 ng/mL、HQC=26.28 ng/mL。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数(CV%)结果如表 6 所示。

表6 精密度考察结果(n=6)

样品号	25-OHD ₂ (ng/mL)		25-OHD ₃ (ng/mL)	
	LQC	HQC	LQC	HQC
1	2.364	9.159	5.249	28.09
2	2.415	9.541	5.384	28.00
3	2.435	9.111	5.133	26.18
4	2.397	9.253	5.257	27.07
5	2.417	9.365	5.219	26.36
6	2.485	9.516	5.290	27.77
平均值	2.419	9.324	5.255	27.24
CV%	1.7	1.9	1.6	3.1

2.5 准确度验证

分别取处理后且已知浓度的低、高两个浓度的质控样品，25-OHD₂ 即 LQC(2.439 ng/mL)、HQC(9.367 ng/mL)，25-OHD₃ 即 LQC=5.297 ng/mL、HQC=26.28 ng/mL。样品经分析后，数据统计分析得到准确度(%) 结果如表 7-8 所示。

表7 25-OHD₂(ng/mL)准确度验证结果

	LQC	靶值	准确度	HQC	靶值	准确度
QC-1	2.364	2.439	96.9%	9.159	9.367	97.8%
QC-2	2.415	2.439	99.0%	9.541	9.367	101.9%
QC-3	2.435	2.439	99.8%	9.111	9.367	97.3%
QC-4	2.397	2.439	98.3%	9.253	9.367	98.8%
QC-5	2.417	2.439	99.1%	9.365	9.367	100.0%
QC-6	2.485	2.439	101.9%	9.516	9.367	101.6%
平均值	2.419	2.439	99.2%	9.324	9.367	99.5%

表8 25-OHD₃(ng/mL)准确度验证结果

	LQC	靶值	准确度	HQC	靶值	准确度
QC-1	5.249	5.297	99.1%	28.09	26.28	106.9%
QC-2	5.384	5.297	101.6%	28.00	26.28	106.5%
QC-3	5.133	5.297	96.9%	26.18	26.28	99.6%
QC-4	5.257	5.297	99.2%	27.07	26.28	103.0%
QC-5	5.219	5.297	98.5%	26.36	26.28	100.3%
QC-6	5.290	5.297	99.9%	27.77	26.28	105.7%
平均值	5.255	5.297	99.2%	27.24	26.28	103.7%

2.6 临床样品测定结果

共获取已证明为 25-羟基维生素 D 含量正常的人血清样品 8 个，经前处理后分别进行测定，结果如表 13 所示。一般正常人体内 25-羟基维生素 D 的总含量范围为 10-60 ng/mL，各临床样品测定数值均在正常范围内，故该方法适用于临床血清样品中 25-羟基维生素 D 含量准确定量。

表9 人血清临床样品检测结果

编号	25-OHD ₂ (ng/mL)	25-OHD ₃ (ng/mL)	总计 (ng/mL)
Sample-1	1.459	52.64	54.10
Sample-2	4.290	5.466	9.756
Sample-3	1.596	16.48	18.07
Sample-4	0.9190	32.23	33.14
Sample-5	0.2120	25.69	25.90
Sample-6	1.336	23.73	25.06
Sample-7	0.3580	21.02	21.38
Sample-8	0.9820	15.05	16.03

结论

本文使用岛津 Nexera MX System 平行液相系统和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用技术，建立了 2 分钟内超快速定量检测人血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的方法，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 测定的可报告范围分别为 0.3900-50.00 ng/mL、1.172-150.0 ng/mL；精密度 (CV%) 分别为 1.6-3.1%，准确度范围分别为 96.9 - 106.9%。该技术通过巧妙且合理的设计，使得该检测方法不仅分析速度快、稳定性和准确度高，而且提高了约 3 倍分析效率，大大节省了临床实验室仪器采购与检测成本，十分适用于相关医学检验实验室大批量人血清样品中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的定量分析，该技术有望成为一种在医学检验领域备受青睐且广泛应用的液相色谱质谱联用技术，创造更多的社会价值。