

应用 LCMS-8040CL 检测人血清中 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 含量检测

LCMSMS-311

摘要： 本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 及经 CE 认证的 ZIVAK 品牌人血清中 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，建立了血清中 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 的定量检测方法，并进行了部分方法学验证。实验结果表明，该方法线性关系良好、灵敏度高、检测稳定性及准确度好，可适用于血清中 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-8040CL 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 人血清 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，我们使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 及经 CE 认证的 ZIVAK 品牌人血清中 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，建立了血清中 25- 羟基维生素 D₂/D₃ 的定量检测方法，并进行了部分方法学验证。

实验部分

1.1 仪器

岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL。具体配置为：LC-20ADXR×2 输液泵，DGU-20A₃ 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS-HP C18
(2.1 mm I.D.× 100 mm L., 3 μm)
流动相：A 相 -0.1% 甲酸 -1 mM 乙酸铵水 B 相 -0.1%
甲酸 -1 mM 乙酸铵甲醇
流速：0.35 mL/min

柱温：25℃
进样量：10 μL
自动进样器温度：4℃
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，时间
程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	100
3.30	Pumps	Pump B Conc.	100
3.31	Pumps	Pump B Conc.	70
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

DL 温度: 150°C

驻留时间: 100 ms

加热模块温度: 500°C

干燥气流速: 17.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

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)
25-OHD ₂	21343-40-8	413.30	395.30	-14.0	-10.0	-27.0
25-OHD ₃	63283-36-3	401.30	383.30	-26.0	-10.0	-26.0
d6-25-OHD ₃	-	407.30	389.30	-26.0	-10.0	-26.0

1.3 样品前处理

取 750 μL 血清样品 (标准工作液或质控品) 于 10 mL 离心管中, 加入 150 μL 内标溶液, 充分混匀 10 s; 再加入饱和硫酸锌溶液 500 μL; 剧烈震荡 10 s, 室温静置 15 min; 加入 2 mL 正己烷, 剧烈震荡 10 s, 4000 rpm 离心 5 min; 取最上层 1700 μL, 室温下氮气吹干, 加入 75% 甲醇溶液 300 μL, 充分混匀 10 s, 14000 rpm 离心 2 min, 进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

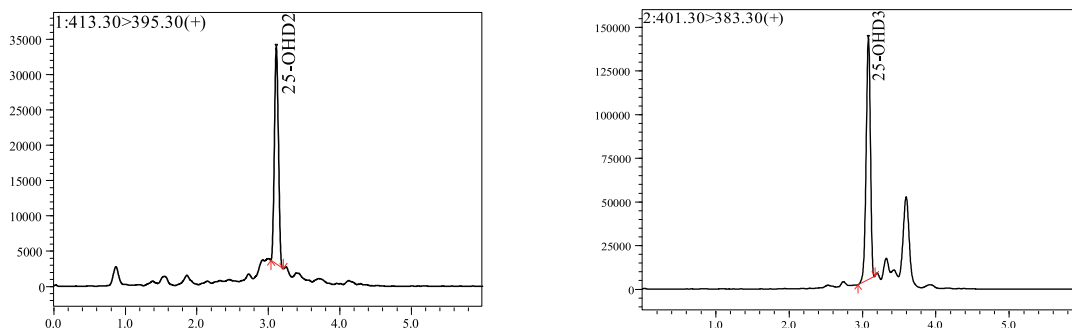


图1 校准液最低浓度点9.99 ng/mL 25-OHD₂和14.71 ng/mL 25-OHD₃色谱图

2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线，连续考察 3 天，结果如表 3 与表 4 所示，25-OHD₂ 在 9.99-53.74 ng/mL、25-OHD₃ 在 14.71-39.8 ng/mL 的线性浓度范围内线性相关性良好。

表3 连续3天标准曲线

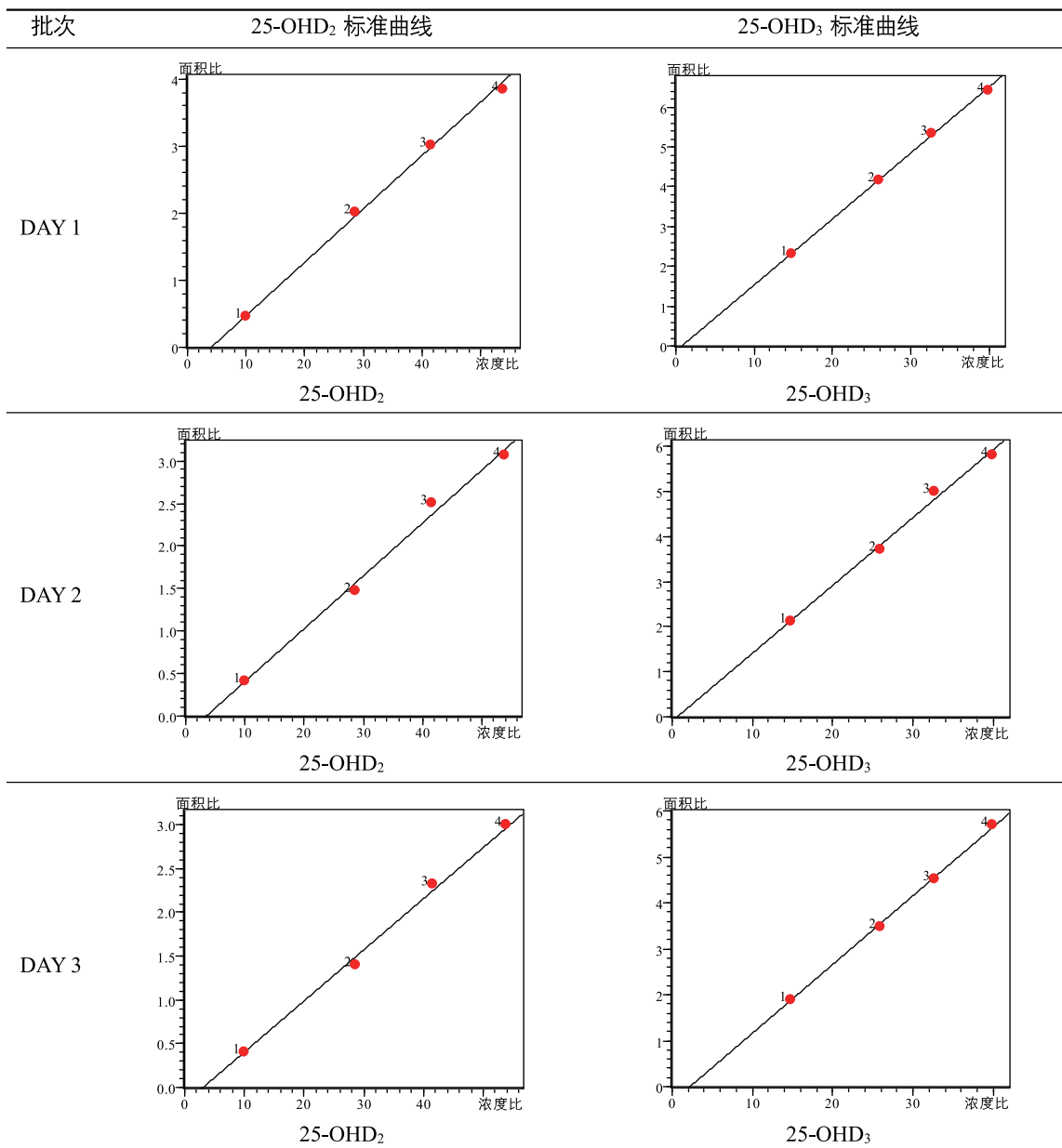


表4 标准曲线结果

批次	目标物	线性方程	相关系数	准确度
DAY 1	25-OHD ₂	$Y = (0.0795692)X + (-0.322606)$	0.9995	97.6-102.2%
	25-OHD ₃	$Y = (0.1659350)X + (-0.126083)$	0.9998	99.2-100.9%
DAY 2	25-OHD ₂	$Y = (0.0621809)X + (-0.215256)$	0.9974	94.7-105.5%
	25-OHD ₃	$Y = (0.150495)X + (-0.0938719)$	0.9978	97.7-103.5%
DAY 3	25-OHD ₂	$Y = (0.0583642)X + (-0.178867)$	0.9986	94.7-103.0%
	25-OHD ₃	$Y = (0.1495900)X + (-0.330483)$	0.9996	98.6-101.3%

2.3 检出限与定量限

表5 检出限与定量限结果

目标物	Level 1 (ng/mL)	信噪比	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
25-OHD ₂	9.99	422.10	0.06	0.18
25-OHD ₃	14.71	1625.60	0.03	0.08

2.4 日内及日间精密度

分别取处理后低、高两个浓度的质控样品，25-OHD₂ 靶值：LQC=13.66 ng/mL、HQC=30.40 ng/mL，25-OHD₃ 靶值：LQC=18.20 ng/mL、HQC=27.56 ng/mL。样品经连续 3 天分别重复 6 次进样分析后，数据统计分析得到变异系数 (CV%) 结果如表 6 所示。

表6 日内(n=6)及日间(n=18)精密度考察结果

批次	样品号	25-OHD ₂ (ng/mL)		25-OHD ₃ (ng/mL)	
		LQC	HQC	LQC	HQC
DAY 1	1	15.133	29.405	17.837	28.689
	2	14.326	31.362	17.568	27.110
	3	14.381	30.654	17.766	27.259
	4	15.436	31.645	18.194	30.875
	5	14.469	31.989	17.744	27.653
	6	14.812	30.960	18.299	27.531
	平均值	14.760	31.003	17.901	28.186
	CV%	3.05	2.95	1.58	5.07
DAY 2	1	14.956	30.519	18.696	29.003
	2	15.267	28.884	18.432	27.723
	3	14.778	30.083	18.403	28.526
	4	14.016	30.217	17.454	28.716
	5	14.949	29.175	18.048	28.003
	6	14.193	29.493	17.742	27.967
	平均值	14.693	29.729	18.129	28.323
	CV%	3.30	2.16	2.58	1.76
DAY 3	1	13.837	28.937	18.869	30.740
	2	13.728	29.730	19.490	29.824
	3	13.690	30.293	18.967	30.172
	4	14.486	30.561	19.391	31.102
	5	14.728	30.886	19.702	29.893
	6	14.943	31.515	19.239	30.307
	平均值	14.235	30.320	19.276	30.340
	CV%	3.87	2.97	1.64	1.63
日间精密度	CV%	3.61	3.12	3.84	4.60

2.5 准确度验证

2.5.1 质控回收率

取处理后低浓度的质控样品，即 25-OHD₂ 靶值：LQC=13.66 ng/mL，25-OHD₃ 靶值：LQC=18.20 ng/mL，经连续 3 天分别重复 6 次进样分析后，数据统计分析得到回收率 % 结果如表 7 所示。肽段的残留量均满足样品分析要求。

表7 低值质控回收率

批次	样品号	25-OHD ₂ (ng/mL)			25-OHD ₃ (ng/mL)		
		LQC	靶值	回收率	LQC	靶值	回收率
DAY 1	1	15.133		110.8%	17.837		98.0%
	2	14.326		104.9%	17.568		96.5%
	3	14.381		105.3%	17.766		97.6%
	4	15.436	13.66	113.0%	18.194	18.20	100.0%
	5	14.469		105.9%	17.744		97.5%
	6	14.812		108.4%	18.299		100.5%
	平均值	14.760		108.1%	17.901		98.4%
DAY 2	1	14.956		109.5%	18.696		102.7%
	2	15.267		111.8%	18.432		101.3%
	3	14.778		108.2%	18.403		101.1%
	4	14.016	13.66	102.6%	17.454	18.20	95.9%
	5	14.949		109.4%	18.048		99.2%
	6	14.193		103.9%	17.742		97.5%
	平均值	14.693		107.6%	18.129		99.6%
DAY 3	1	13.837	13.66	101.3%	18.869	18.20	103.7%
	2	13.728		100.5%	19.490		107.1%
	3	13.690		100.2%	18.967		104.2%
	4	14.486		106.0%	19.391		106.5%
	5	14.728		107.8%	19.702		108.3%
	6	14.943		109.4%	19.239		105.7%
	平均值	14.235		104.2%	19.276		105.9%

结论

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL，利用 ZIVAK 品牌人血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，建立了人血清中 25-羟基维生素 D₂/D₃ 的定量检测方法，并进行了部分方法学验证。实验结果表明，该方法灵敏度高、稳定性好、检测结果准确可靠，可适用于人血清中 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。