

# 超高效液相色谱三重四级杆四极杆质谱法检测血清中维生素 D

LCMSMS-193

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱联用仪，建立了 6 分钟快速分析血清中 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 的检测方法。在最优条件下 2 种 VD 在 5.00~200 pg/μL 线性范围内，相关系数为 0.9994 和 0.9987。对低中高不同浓度的血清加标样品进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别 0.18~0.34% 和 0.99~6.57% 之间。25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 方法检出限分别为 0.70 pg/μL 和 1.41 pg/μL，定量限分别为 2.33 pg/μL 和 4.69 pg/μL；不同浓度加标回收率在 102.01~111.71% 之间。实验结果表明该方法分析速度快、线性良好、灵敏度高、稳定性好、准确度优异，可用于血清中 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 的快速准确定量分析。

**关键词：** 维生素 D 血清 三重四极杆质谱仪

维生素 D 缺乏症在世界范围内的成人和儿童中普遍存在。除了佝偻病、骨质疏松症和骨软化症等常见疾病，缺乏维生素 D 还会增加某种癌症的患病风险。维生素 D 有两种存在形式 VD<sub>3</sub> 和 VD<sub>2</sub>；其中 VD<sub>3</sub> 是由皮肤暴露于日光下后合成，在饮食中也可以部分吸收转化；VD<sub>2</sub> 则为植物衍生物。VD 在肝脏中代谢形成 25-羟基维生素 D，即 [25(OH)D]，后者在肾脏中进一步代谢形成活性代谢物 1α,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 1α,25-羟基维生素 D<sub>2</sub>，即 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub>，这两个代谢物的水

平被认为是评价体内 VD 水平的最佳临床指标。VD 水平的评估对于 VD 缺乏症的诊断和补充治疗的监测非常重要。VD 常用的检测方法有竞争性结合检测、免疫检测 and HPLC 法等，而 LC-MS/MS 法具有具有特异性强、准确性高等优势有望成为未来的主要检测方法。

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-8040 联用，以 D6-25(OH)D<sub>3</sub> 为内标，建立了血清中 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 的快速检测方法，供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器配置

本系统由岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 组成。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，20 μL 混合器，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，FCV-20AH<sub>2</sub> 柱后切换阀，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-C8, 2.0 mm×50 mm L,

2.2 μm 粒径

流动相：A=2 mM 乙酸铵，0.1% 甲酸水；

B=2 mM 乙酸铵，0.1% 甲酸甲醇

流速：0.4 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：25°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 |
|-----------|-------------|--------------|-------|
| 1.50      | Column Oven | CTO.RVL      | 1     |
| 2.50      | Pumps       | Pump B Conc. | 85    |
| 3.00      | Column Oven | CTO.RVL      | 0     |
| 3.00      | Pumps       | Pump B Conc. | 98    |
| 4.00      | Pumps       | Pump B Conc. | 98    |
| 4.01      | Pumps       | Pump B Conc. | 85    |
| 6.00      | Controller  | Stop         |       |

|                   |                  |
|-------------------|------------------|
| 质谱条件              | 加热模块温度：250℃      |
| 分析仪器：LCMS-8040    | 干燥气流速：15.0 L/min |
| 离子源：ESI 正离子模式同时分析 | 扫描模式：多反应监测 (MRM) |
| 雾化气流速：3.0 L/min   | 驻留时间：80 ms       |
| DL 温度：150℃        | MRM 参数：见表 2      |

表2 MRM参数

| 化合物名称                   | CAS 号      | 前体离子   | 产物离子    | Q <sub>1</sub> Pre Bias (V) | CE (V) | Q <sub>3</sub> Pre Bias (V) |
|-------------------------|------------|--------|---------|-----------------------------|--------|-----------------------------|
| D6-25(OH)D <sub>3</sub> | -          | 407.30 | 389.30* | -20.0                       | -10.0  | -27.0                       |
|                         |            |        | 371.30  | -20.0                       | -11.0  | -26.0                       |
| 25(OH)D <sub>3</sub>    | 63283-36-3 | 401.30 | 383.30* | -20.0                       | -10.0  | -28.0                       |
|                         |            |        | 365.30  | -20.0                       | -11.0  | -25.0                       |
| 25(OH)D <sub>2</sub>    | 21343-40-8 | 413.30 | 395.30* | -29.0                       | -8.0   | -28.0                       |
|                         |            |        | 55.10   | -29.0                       | -47.0  | -20.0                       |

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 标准工作曲线配制

用甲醇配制浓度为 500 mg/L 的三种标样母液，用甲醇稀释制备得到 250 pg/μL 的内标标样以及 1 mg/L 外标混合标样；再依次用甲醇配制外标浓度分别为 5.00、20.0、50.0、100、200 pg/μL，内标浓度统一为 50 pg/μL 的标准工作液用于建立标准曲线。

#### 1.3.2 样品前处理方法

准确量取 50 μL 血清于 1mL 离心管中，加入 10 μL 浓度为 250 pg/μL 的内标，140 μL 甲醇（配制加标样品时减去已加入外标溶液体积），13000 rpm 高速离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜后待测。

## 结果讨论

### 2.1 方法优化

由于三种目标物极性较低，在反相色谱中保留较强，需要高比例强溶剂如甲醇进行冲洗，最终选用 C8 柱作为分离色谱柱。

前处理使用一步沉淀法，沉淀比为 1:3，考虑到上清液中可能存留少量蛋白，若所有色谱柱流出液全部进入质谱，长期重复将存在污染离子源及堵塞质谱入口的危险，故在色谱柱后使用切换阀，除了目标化合物出峰的 1.5 min，其余时间均将柱后流出液导入废液，从而极大减轻离子源和质谱入口的污染可能。

高温对 VD 的质谱信号有较大的削弱，经过优化，降低了 DL 温度、加热模块温度和柱温箱的温度。

为了减少基质效应，降低进样量至 5 μL，同时调整喷针位置至 +2 mm，得到最高响应。

### 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

三种目标物的 MRM 色谱图如图 1 所示。

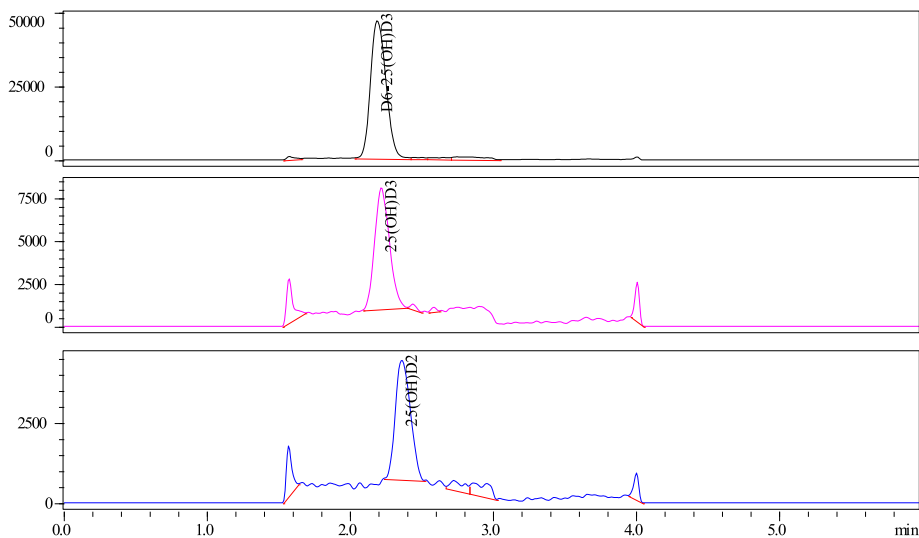


图1 25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>浓度为5 μg/L,内标浓度为50 pg/μL的MRM色谱图

### 2.3 线性关系

由于人体血液中存在较大浓度的 25(OH)D<sub>3</sub> 和少量的 25(OH)D<sub>2</sub> (后者约为前者的 1/10), 所以不适于用基质加标法建立标准曲线。按 1.2 中的分析条件进行测定, 采用内标法建立校准曲线。如图 2 所示, 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 在 5.00~200 μg/L 的线性浓度范围内, 相关系数分别为 0.9994 和 0.9987, 线性相关性良好, 方法检出限和定量限见表 3, 各级标样准确度见图 3。

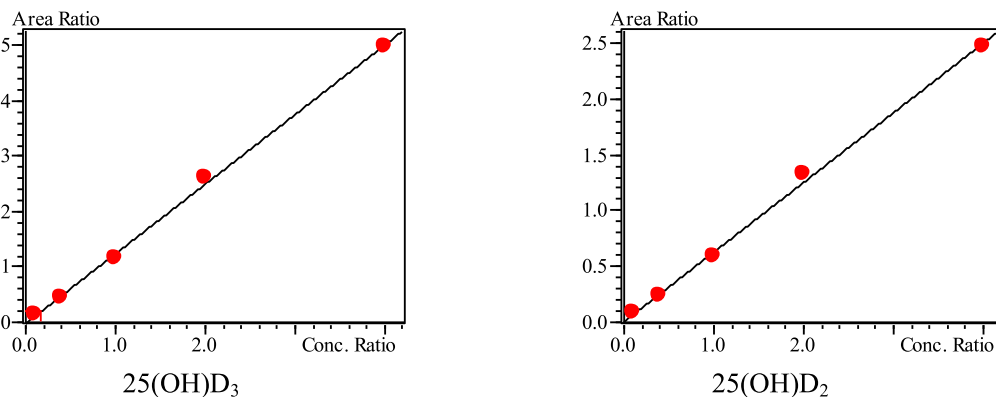


图2 25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>的标准曲线

表3 25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>的标准曲线参数、检出限及定量限

| 名称                   | 校准曲线                             | 线性范围<br>(pg/μL) | 相关系数<br>(R) | 检出限<br>(pg/μL) | 定量限<br>(pg/μL) |
|----------------------|----------------------------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|
| 25(OH)D <sub>3</sub> | $Y = (1.25831)X + (-0.0201594)$  | 5.00~200        | 0.9994      | 0.70           | 2.33           |
| 25(OH)D <sub>2</sub> | $Y = (0.623226)X + (0.00585964)$ | 5.00~200        | 0.9987      | 1.41           | 4.69           |

| Quantitative Results View ID# 1 25 (OH)D <sub>3</sub> |   |           |           |              |            |             |            |   |
|---|---|-----------|-----------|--------------|------------|-------------|------------|---|
| Data#   | Data Filename                           | Ret. Time | Area      | Conc. (ug/L) | Std. Conc. | Accuracy[%] | Cal. Point |   |
| 1   | !VD 切阀, 喷嘴=+2_5ppbE+50ppbI_inj 5uL_005. | 2.222     | 38,541    | 5.850        | 5          | 117.0       | 5          | ✓ |
| 2   | VD 切阀, 喷嘴=+2_20ppbE+50ppbI_inj 5uL_010. | 2.226     | 117,516   | 19.007       | 20         | 95.0        | 20         | ✓ |
| 3   | VD 切阀, 喷嘴=+2_50ppbE+50ppbI_inj 5uL_015. | 2.229     | 308,183   | 47.459       | 50         | 94.9        | 50         | ✓ |
| 4   | VD 切阀, 喷嘴=+2_100ppbE+50ppbI_inj 5uL_005 | 2.226     | 647,238   | 103.940      | 100        | 103.9       | 100        | ✓ |
| 5   | VD 切阀, 喷嘴=+2_200ppbE+50ppbI_inj 5uL_008 | 2.226     | 1,321,511 | 198.743      | 200        | 99.4        | 200        | ✓ |

| Quantitative Results View ID# 2 25 (OH)D <sub>2</sub> |   |           |         |              |            |             |            |   |
|---|---|-----------|---------|--------------|------------|-------------|------------|---|
| Data#   | Data Filename                           | Ret. Time | Area    | Conc. (ug/L) | Std. Conc. | Accuracy[%] | Cal. Point |   |
| 1   | !VD 切阀, 喷嘴=+2_5ppbE+50ppbI_inj 5uL_005. | 2.367     | 27,490  | 5.936        | 5          | 118.7       | 5          | ✓ |
| 2   | VD 切阀, 喷嘴=+2_20ppbE+50ppbI_inj 5uL_010. | 2.359     | 60,161  | 17.786       | 20         | 86.9        | 20         | ✓ |
| 3   | VD 切阀, 喷嘴=+2_50ppbE+50ppbI_inj 5uL_015. | 2.366     | 157,241 | 47.160       | 50         | 94.3        | 50         | ✓ |
| 4   | VD 切阀, 喷嘴=+2_100ppbE+50ppbI_inj 5uL_005 | 2.368     | 332,811 | 106.420      | 100        | 106.4       | 100        | ✓ |
| 5   | VD 切阀, 喷嘴=+2_200ppbE+50ppbI_inj 5uL_008 | 2.373     | 654,526 | 197.698      | 200        | 98.8        | 200        | ✓ |

图3 各级标样准确度

#### 2.4 血液加标样品的精密度实验

以混合血清 (来自两个未服用 VD 药物的成年人) 为基质, 配制低中高不同浓度的血清样品 (浓度见表 4), 平行测定 6 次 (最低浓度色谱图见图 4), 25(OH)D<sub>3</sub> 和 25(OH)D<sub>2</sub> 的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18%~0.34% 和 0.99%~6.57% 之间, 结果表明仪器系统及本方法具有良好的精密度。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

| 样品名称                 | RSD% (5.00 pg/μL) |      | RSD% (50.0 pg/μL) |      | RSD% (200 pg/μL) |      |
|----------------------|-------------------|------|-------------------|------|------------------|------|
|                      | R.T.              | Area | R.T.              | Area | R.T.             | Area |
| 25(OH)D <sub>3</sub> | 0.29              | 3.89 | 0.34              | 0.99 | 0.21             | 1.77 |
| 25(OH)D <sub>2</sub> | 0.24              | 6.57 | 0.22              | 2.67 | 0.18             | 1.58 |

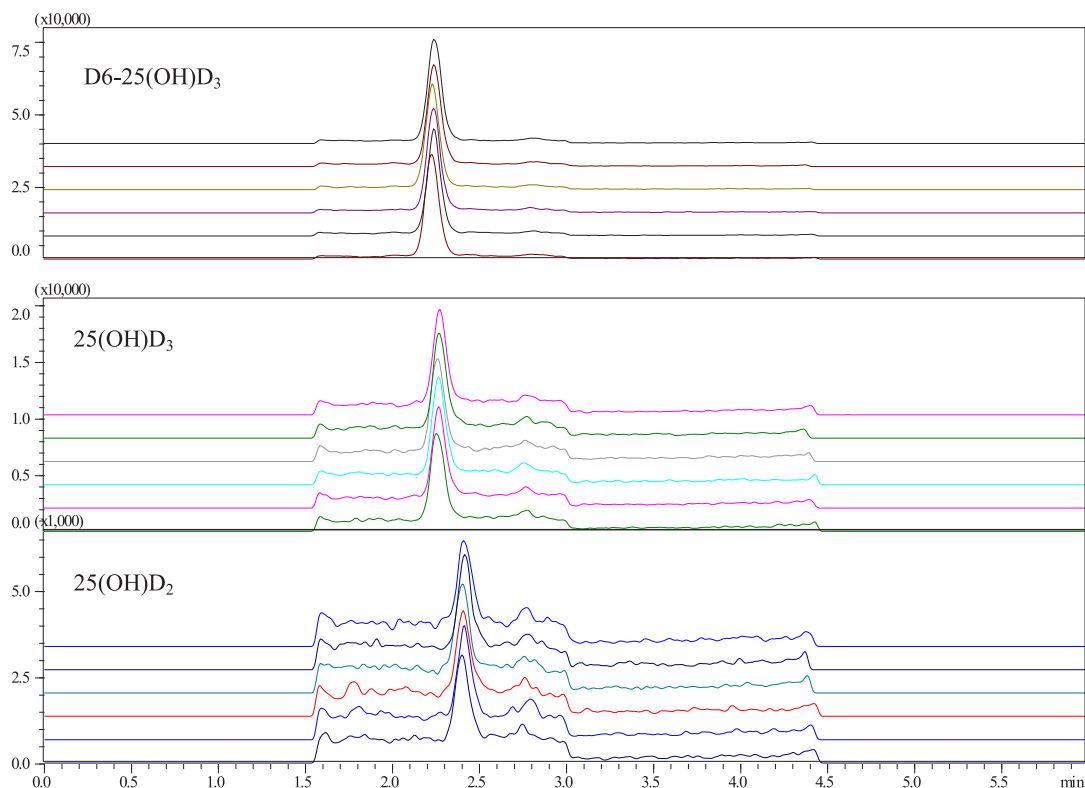


图4 5.00 pg/μL外标加标浓度血清重复6次MRM色谱图(血清本底中25(OH)D<sub>3</sub>含量为4.92pg/μL)

### 2.5 血液加标样品回收率实验

图5为血清基质按照1.3中样品制备方法所得MRM色谱图。往血清基质中添加25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>及同位素内标混合标样，加标MRM色谱图如图5所示，从图5中可以看到，基质加标样品有很好的响应，加标回收率结果见表5。

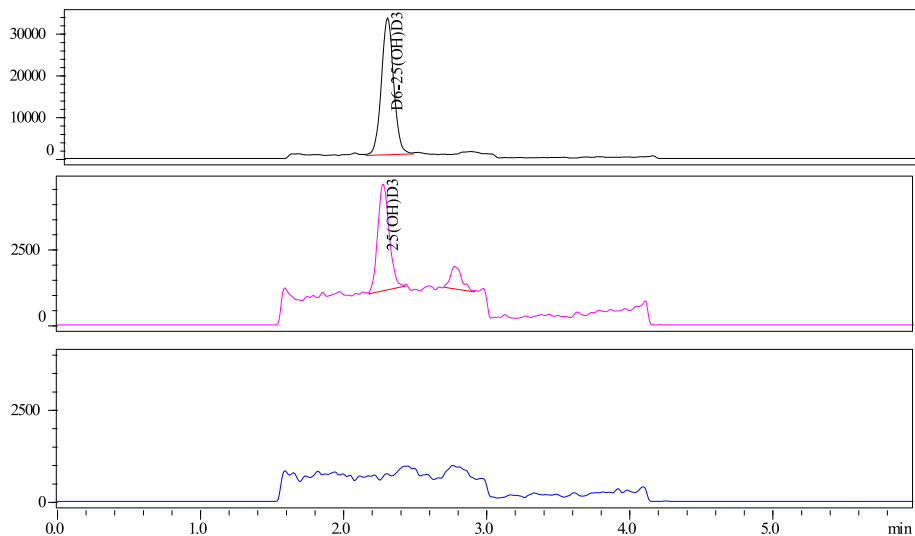


图5 血清基质的MRM色谱图(加入50 pg/μL内标)

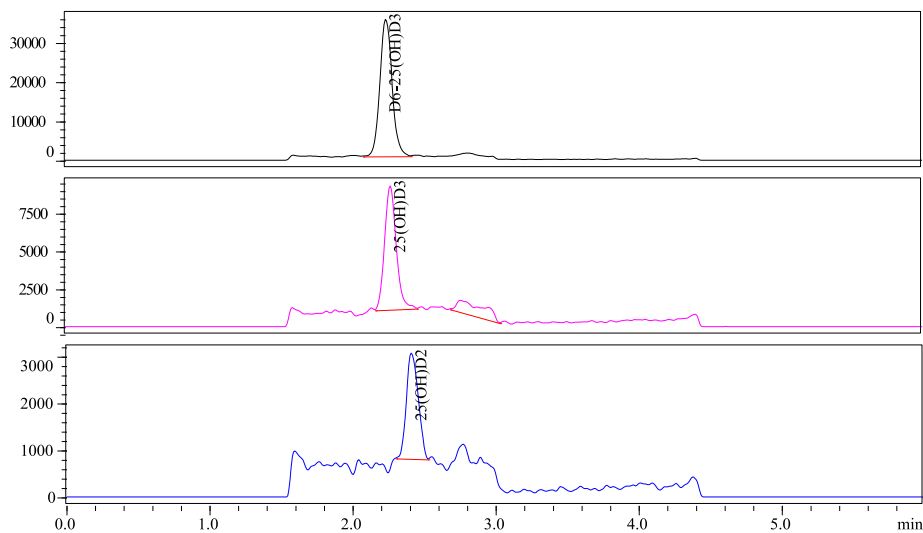


图6 血清基质加外标5.00 pg/μL、50 pg/μL内标的MRM色谱图

表5 血清加标回收率结果(n=3)

| 目标物                  | 本底值   | 加标浓度 5 pg/μL |       | 加标浓度 50 pg/μL |       | 加标浓度 200 pg/μL |       |
|----------------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|----------------|-------|
|                      | μg/L  | 回收率 %        | RSD % | 回收率 %         | RSD % | 回收率 %          | RSD % |
| 25(OH)D <sub>3</sub> | 4.92* | 111.71       | 3.51  | 103.69        | 1.26  | 103.51         | 3.29  |
| 25(OH)D <sub>2</sub> | -     | 102.01       | 8.05  | 107.78        | 3.74  | 108.91         | 2.30  |

\*内标法检出浓度

## 2.6 基质效应考察

使用无切阀模式，柱后接入三通，考察分离过程中的基质效应。将 100 pg/ $\mu$ L 外标和内标作为柱后补偿液以 0.05 mL/min 的流速泵入三通与色谱柱流出液汇合后进入质谱，由此来评价方法的基质效应。分析血清基质样品（同图 5 样品）得到的色谱图如图 7 所示：结果表明在 1.5~3.0 min 色谱分离过程中不存在明显的基质效应。

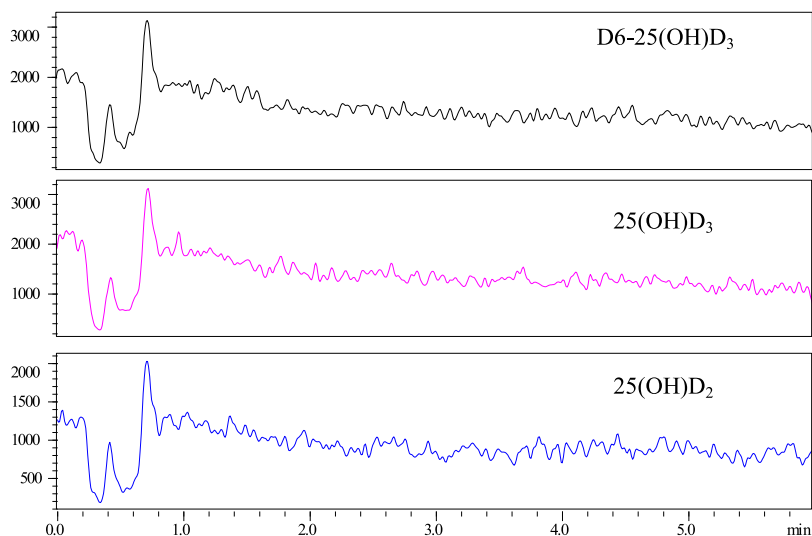


图7 基质效应考察

## 2.7 医院提供血液样品分析结果

向长沙某医院取得样品三个，分析结果如图 8-10 所示。

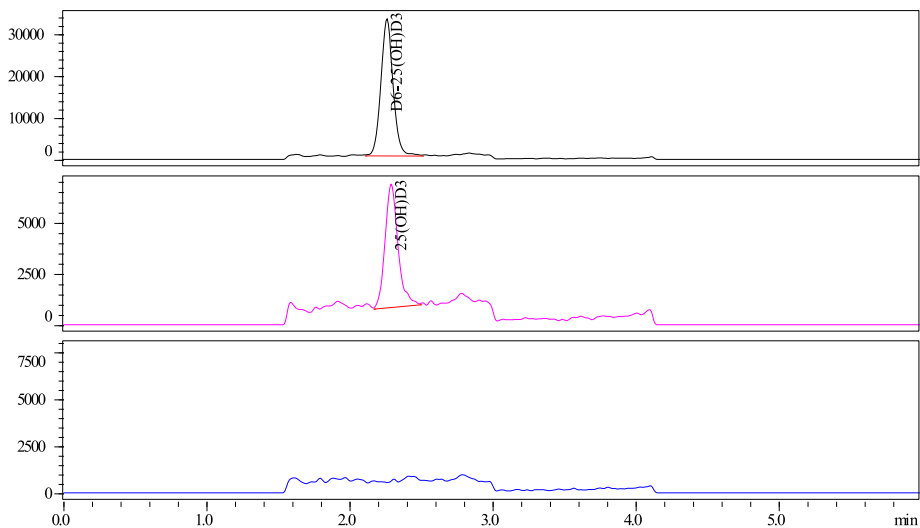


图8 儿童#1血清检出25(OH)D<sub>3</sub>浓度为8.53 pg/ $\mu$ L

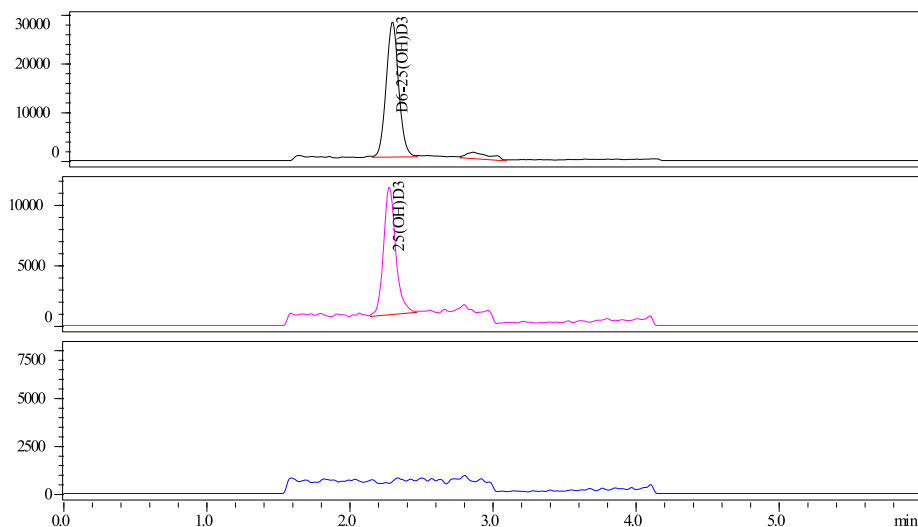


图9 儿童#2血清检出25(OH)D<sub>3</sub>浓度为15.9 pg/μL

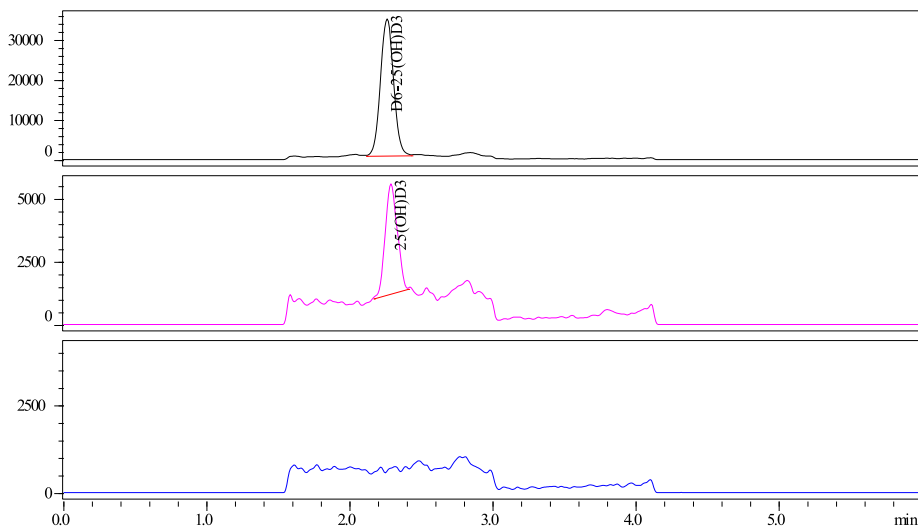


图10 成人#1血清检出25(OH)D<sub>3</sub>浓度为6.40 pg/μL

## 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用仪配合蛋白沉淀法及内标定量法在6分钟内测定血清中25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>的分析方法。2种VD在5.00~200 pg/μL线性范围内，相关系数为0.9994和0.9987。对低中高不同浓度的血清加标样品进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别0.18~0.34%和0.99~6.57%之间，仪器和方法精密度良好。25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>方法检出限分别为0.70 pg/μL和1.41 pg/μL，定量限为2.33 pg/μL和4.69 pg/μL；不同浓度加标回收率在102.01~111.71%之间，RSD在1.26~8.05%之间。实验结果表明该方法分析速度快、线性良好、灵敏度高、稳定性好、准确度优异，可以用于血清中25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>的快速、准确定量分析。