

基于血清中维生素 D 代谢产物监测的高钙血症风险评估

LCMSMS-832

摘要： 本文使用岛津临床质谱 LCMS-8050CL，建立了血清中 4 种维生素 D 代谢产物的联合检测方法并进行了部分方法学验证；使用该方法检测了 120 例临床高值样本，发现其中 16 例样本可能存在 CYP24A1 缺陷并伴有高钙血症风险。实验结果表明，该方法线性关系良好、灵敏度高、检测稳定性好，适用于血清中 1,25-二羟基维生素 D₃、24,25-二羟基维生素 D₃、25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的定量分析，能够为临床上非 PTH 介导的高钙血症的风险评估和诊断提供参考方法。

关键词： LCMS-8050CL 1,25-二羟基维生素 D 维生素 D 代谢产物 高钙血症

技术特点：

- ❖ 首次使用 LCMS-8050CL 联合检测血清中双羟基维生素 D 含量。
- ❖ 该方法的样品前处理方式简便快捷，无需复杂的衍生化处理和固相萃取流程。

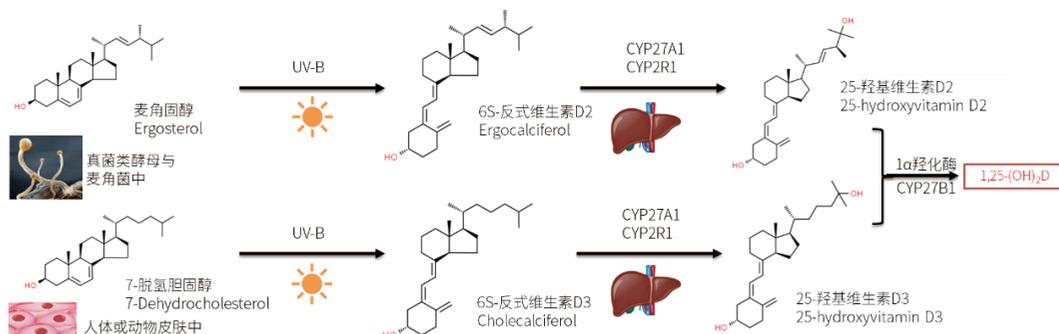
维生素 D (Vitamin D) 是维持骨骼肌功能的重要激素，外源性麦角固醇和内源性 7-脱氢胆固醇在紫外线作用下合成维生素 D₂ 和 D₃，随后转运至肝脏被代谢为 25-羟基维生素 D₂ 和 D₃，储存于脂肪和血液循环中，CYP2R1 和 CYP27A1 被认为是维生素 D 转化为 25-羟基维生素 D 的关键酶，由于 CYP2R1 和 CYP27A1 为非限速酶，维生素 D 向 25-羟基维生素 D 转化是畅通无阻的，在临床上，血 25-羟基维生素 D 的水平被作为评估维生素 D 营养状态的重要指标。

25-羟基维生素 D 在肾脏中进一步代谢为 1,25-二羟基维生素 D 和 24,25-二羟基维生素 D 两类主要的二羟代谢产物，其中 1,25-二羟基维生素 D 是维生素 D 的主要活性形式，其合成受 CYP27B1 和 CYP24A1 基因控制，并受甲状旁腺激素 (PTH)、降钙素、孕激素等条件因子调节。多余的 25-羟基维生素

素 D 会转化为 24,25-二羟基维生素 D 等代谢产物，大部分维生素 D 代谢物会转化成降钙酸 (Calcitroic acid) 经胆汁和尿液排出体外。

编码维生素 D 24-羟化酶的 CYP24A1 基因具有重要的临床意义，它用于调节 1,25-二羟基维生素 D 和 24,25-二羟基维生素 D 的分解代谢。由致病性 CYP24A1 基因突变引起的 24-羟化酶缺乏会破坏 1,25-二羟基维生素 D 的代谢，从而导致非 PTH 介导的高钙血症（如：特发性婴儿高钙血症，IIH）并使患者易患高钙尿症，肾结石和肾钙素病。

25-羟基维生素 D / 24,25-二羟基维生素 D 比值是维生素 D 分解代谢的明确标志物，该比值的升高也可作为维生素 D 缺乏的潜在指标，亦可用于鉴别 CYP24A1 突变引起的高钙血症。



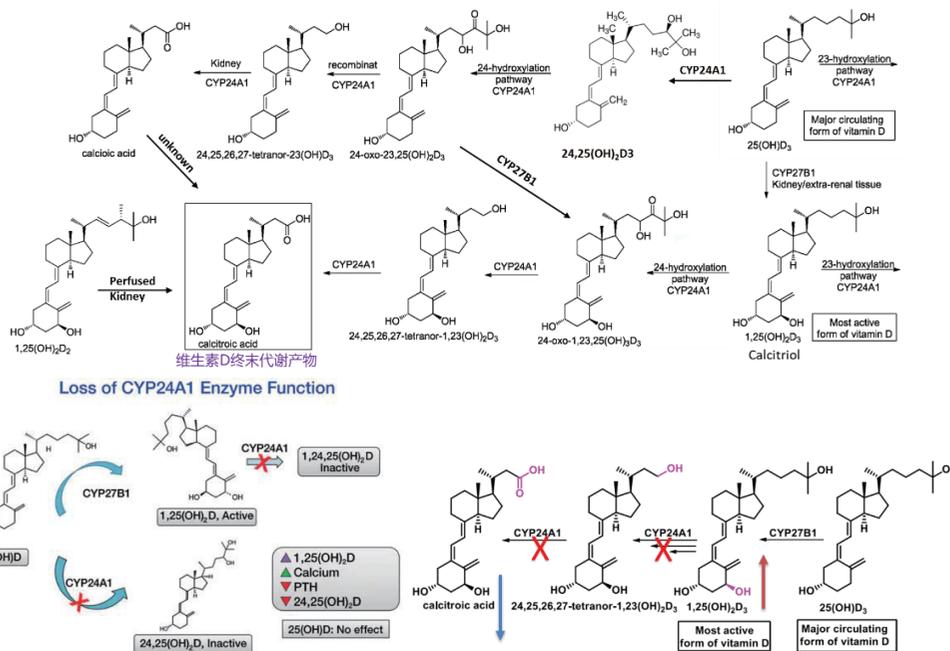


图1 维生素D在体内的代谢过程与非PTH介导的高钙血症的联系

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8050CL，具体配置如下：

系统控制器：CBM-20A CL	脱气机：DGU-20A _{5R} CL
输液泵：LC-30A CL X2	自动进样器：SIL-30ACMP CL
柱温箱：CTO-30AC CL	色谱工作站：LabSolutions Version 5.87
质谱仪：LCMS-8050	

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox Biphenyl (100 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-32013-03)

流动相：A相 -0.1% 甲酸水溶液；B相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min 柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为75%，时间程序见表2

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	75
0.50	Pumps	Pump B Conc.	75
10.90	Pumps	Pump B Conc.	98
12.90	Pumps	Pump B Conc.	98
13.00	Pumps	Pump B Conc.	75
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源 : ESI+	加热模块温度 : 300°C
雾化气流速 : 2.8 L/min	D L 温度 : 200°C
加热气流速 : 10.0 L/min	接口温度 : 400°C
干燥气流速 : 10.0 L/min	接口电压 : 4.0 kV
MRM 参数 : 见表 3	

表 2 MRM 参数

序号	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias	Collision Energy	Q3 Pre Bias	内标
1	1,25-(OH)2D3	399.20	151.10*	-29.0	-23.0	-16.0	24,25-(OH)2D3-d6
			133.20	-29.0	-33.0	-25.0	
2	24,25-(OH)2D3	381.2	121.10*	-15.0	-21.0	-13.0	24,25-(OH)2D3-d6
			93.10	-15.0	-39.0	-16.0	
3	25-(OH)D2	413.25	337.3*	-16.0	-12.0	-17.0	25-(OH)D3-d6
			395.3	-16.0	-10.0	-21.0	
4	25-(OH)D3	401.35	365.30*	-13.0	-13.0	-18.0	25-(OH)D3-d6
			383.30	-15.0	-10.0	-19.0	
5	24,25-(OH)2D3-d6	405.20	387.35	-29.0	-13.0	-19.0	—
			121.10	-15.0	-22.0	-13.0	
6	25-(OH)D3-d6	389.20	371.35	-29.0	-15.0	-19.0	—
			263.20	-27.0	-18.0	-28.0	

注：* 表示定量离子

1.3 标品制备和前处理

1.3.1 化合物信息

表 3 标准品信息

序号	中文名	英文名	CAS 号
1	1,25- 二羟基维生素 D3	1,25-(OH)2D3	3222-06-3
2	24,25- 二羟基维生素 D3	24,25-(OH)2D3	55721-11-4
3	25- 羟基维生素 D2	25-(OH)D2	21343-40-8
4	25- 羟基维生素 D3	25-(OH)D3	19356-17-3
5	24,25- 二羟基维生素 D3-d6	24,25-(OH)2D3-d6	1440957-55-0
6	25- 羟基维生素 D3-d6	25-(OH)D3-d6	78782-98-6

1.3.2 标品制备

- VD 混标工作液：分别称取 / 移取 1,25- 二羟基维生素 D3、24,25- 二羟基维生素 D3、25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 标准品于 10 mL 容量瓶，加入甲醇定容，得到终浓度分别为 30、40、2000、4000 ng/mL 的混合标准工作溶液。
- 内标工作液：分别移取 24,25- 二羟基维生素 D3-d6 和 25- 羟基维生素 D3-d6 标准品于试剂瓶中加入含 0.1% 甲酸的甲醇溶液得到内标工作液（24,25-(OH)2D3-d6 为 6 ng/mL，25-(OH)D3-d6 为 300 ng/mL）；

- 校准品: 将VD混标工作液加入到含4%BSA的1xPBS溶液中, 获得7个系列浓度的校准品(1,25-(OH)2D3为0.03~1.5 ng/mL, 24,25-(OH)2D3为0.04~2.0 ng/mL, 25-(OH)D2为2~100 ng/mL, 25-(OH)D3为4~200 ng/mL);
- 质控品: 将VD混标工作液加入到去VD人血清中得到3个系列浓度的质控品(1,25-(OH)2D3为0.1125~1.125ng/mL, 24,25-(OH)2D3为0.15~1.5 ng/mL, 25-(OH)D2为7.5~75 ng/mL, 25-(OH)D3为15~150 ng/mL)。

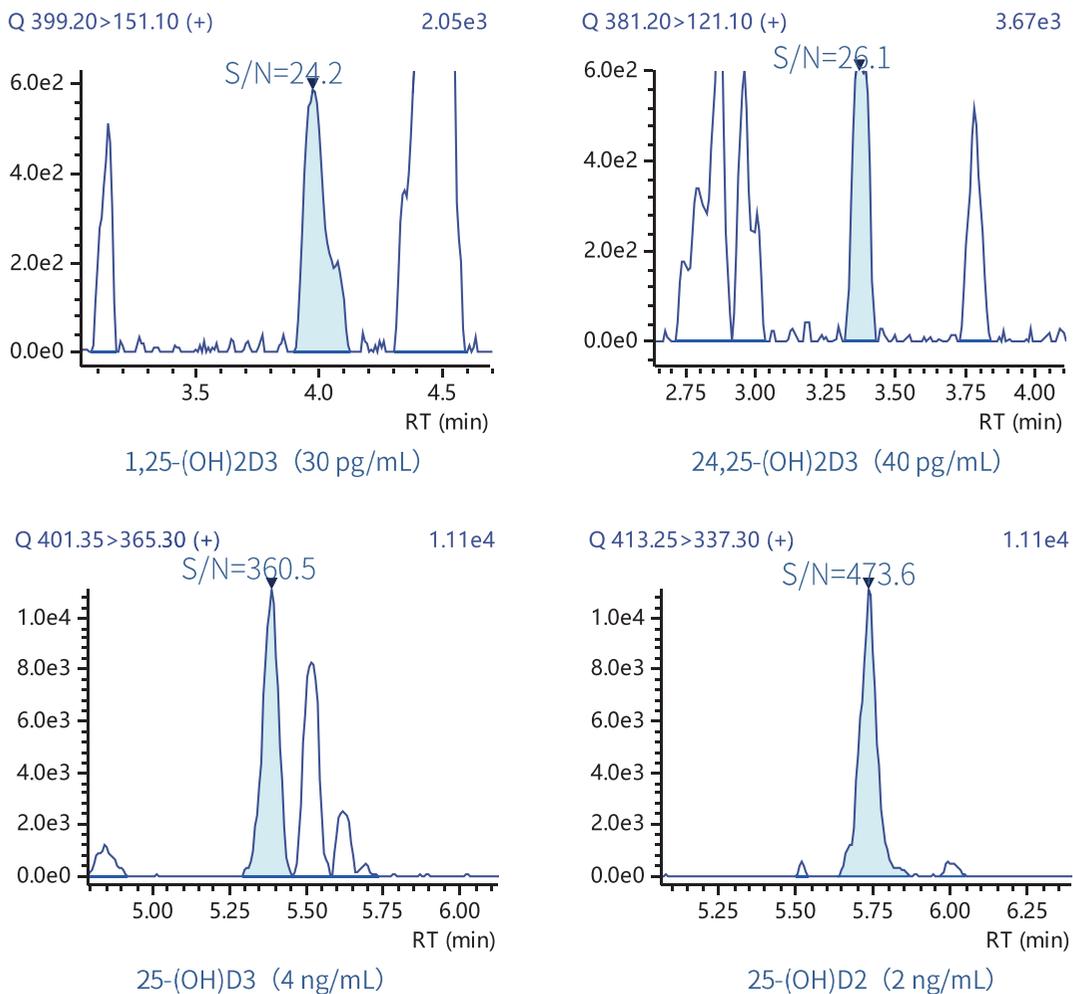
1.3.3 样品前处理

- (1) 移取500 μL校准品/质控品/待测血清样本于2 mL离心管;
- (2) 加入20 μL内标工作液和500 μL 0.1 M ZnSO₄/MeOH(1:1) 涡旋混合1 min;
- (3) 加入1000 μL正己烷/异丙醇(9:1) 萃取2次(可配合Aquamatrix, SLLE(PN: OC21SLLE-1) 使用);
- (4) 离心后取全部上清于96孔板中氮气流吹干, 加入100 μL70% 甲醇水溶液复溶;
- (5) 上机后自动进样器以30 μL 进样分析。

■ 实验结果

2.1 MRM 色谱图

如图2所示, 4个维生素D代谢物 and 同位素内标在基质校准品中的峰型对称, 与内源性干扰峰基线分离, 各目标分析物信噪比(S/N) 不低于24, 满足定量要求。



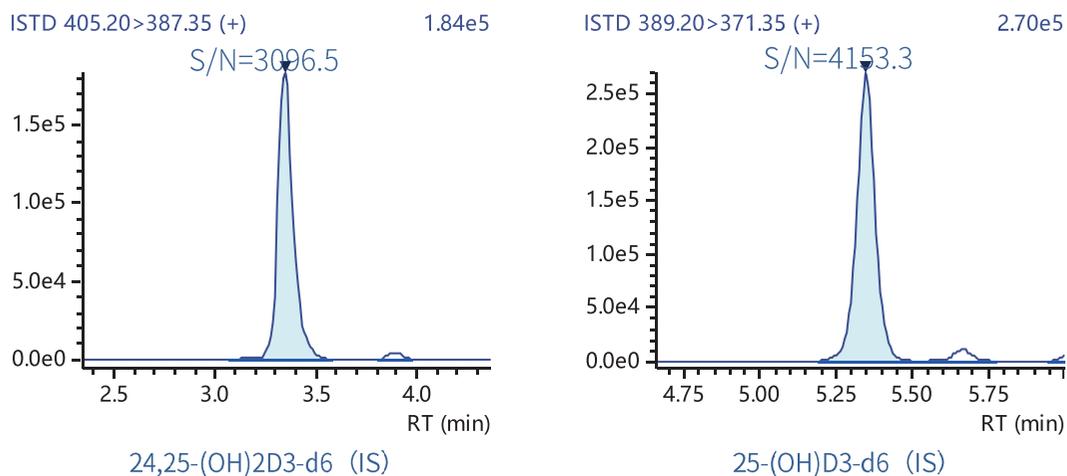


图2 维生素 D 代谢物 and 同位素内标的色谱图 (校准曲线最低点)

2.2 校准曲线

按照 1.3.2 步骤分析配制一系列浓度的标准溶液, 采用内标法定量, 以各目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积与内标峰面积比为纵坐标, 绘制校准曲线, 各目标物的校准曲线方程、相关系数、线性范围和校准品准确度见表 4。

表 4 校准曲线参数 (1/C 加权)

序号	化合物	保留时间	相关系数 R	线性范围 (pg/mL)	准确度 (%)
1	1,25-(OH)2D3	3.97	0.9990	30~1,500	91.3~116.5
2	24,25-(OH)2D3	3.38	0.9991	40~2,000	85.0~109.1
3	25-(OH)D2	5.74	0.9992	2,000~100,000	87.8~107.9
4	25-(OH)D3	5.39	0.9994	4,000~200,000	87.2~103.5

2.3 精密度与准确度

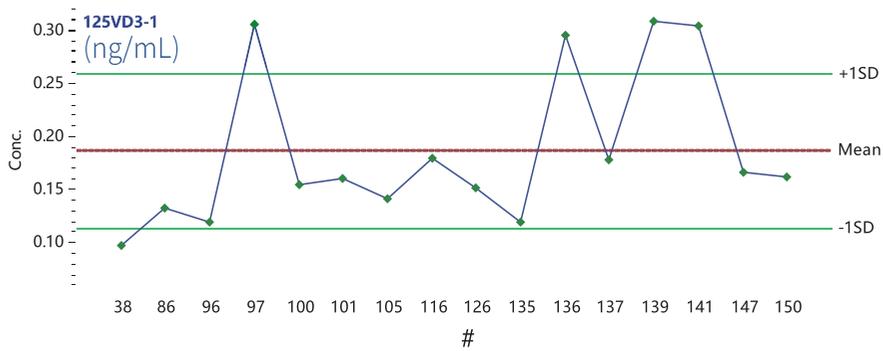
分别对低、中、高三个浓度的基质质控样品 (去 VD 血清中加标获得) 进行 5 次重复测定, 各分析物的精密度 RSD 范围在 4.3%~13.7% 之间, 准确度相对偏差范围在 -9.5%~13.2% 之间, 满足临床检测要求, 数据结果见附表 5。

表 5 T4 精密度 & 准确度结果

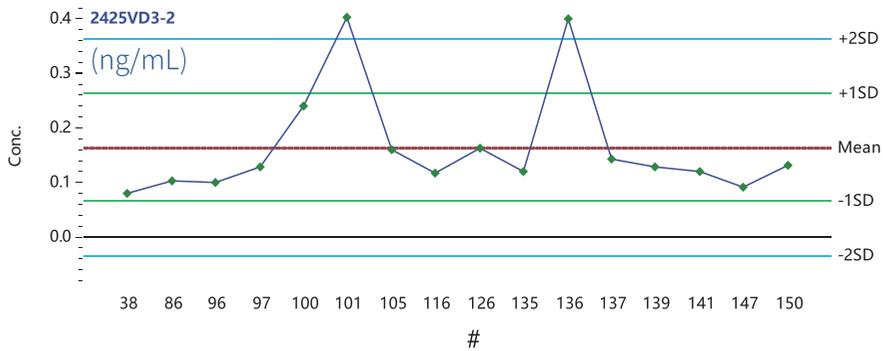
样本	化合物	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 ng/mL	% 偏差
LQC	1,25-(OH)2D3	0.1092	10.6	0.1125	-2.9
	24,25-(OH)2D3	0.1627	11.0	0.15	8.5
	25-(OH)D2	8.4895	8.2	7.5	13.2
	25-(OH)D3	14.7100	10.3	15	-1.9
MQC	1,25-(OH)2D3	0.2042	13.7	0.225	-9.2
	24,25-(OH)2D3	0.2715	11.2	0.3	-9.5
	25-(OH)D2	14.3927	4.3	15	-4.0
	25-(OH)D3	27.5997	6.0	30	-8.0
HQC	1,25-(OH)2D3	1.0380	10.6	1.125	-7.7
	24,25-(OH)2D3	1.3677	13.0	1.5	-8.8
	25-(OH)D2	77.8260	1.6	75	3.8
	25-(OH)D3	161.0450	4.7	150	7.4

2.4 临床样本检测与高钙血症的风险评估

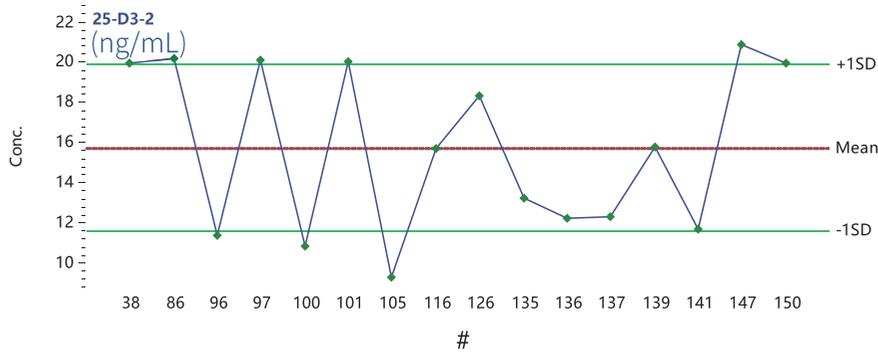
按照 1.3 步骤中的标品制备和前处理流程，测试了 120 例儿童临床血清样本，如图 3 所示，发现编号为 38、86、96、150 等 16 个临床样本的相关维生素 D 代谢产物浓度异常，表现为典型的 1,25-(OH)2D3 水平上调 (> 86 pg/mL)，25-(OH)D2+25-(OH)D3 水平偏低 (≤ 20 ng/mL)，24,25-(OH)2D3 水平下调 (24,25-(OH)2D3 < (25-(OH)-D/25))，该指标表明患儿可能存在 CYP24A1 缺陷，导致 25(OH)D 的两条主要代谢途径的阻断，致使 25-(OH)-D 向 1,25-(OH)2D 的转化失控或引发高血钙和高尿钙症，需进一步检测甲状旁腺激素 (PTH) 水平和血浆钙离子浓度做进一步确诊。



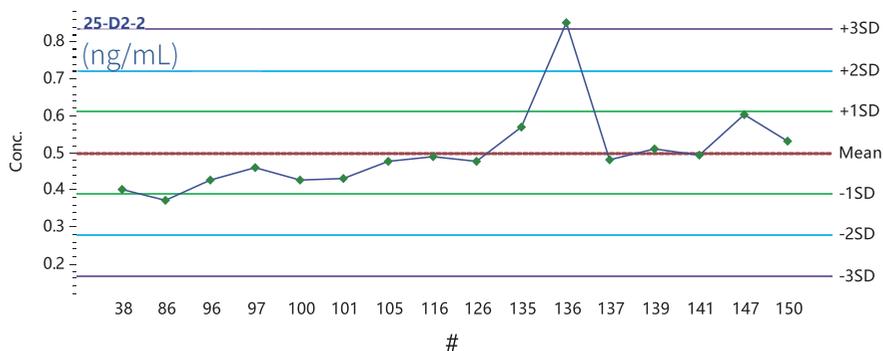
16 个异常血清样本中 1,25-(OH)2D3 的浓度



16 个异常血清样本中 24,25-(OH)2D3 的浓度



16 个异常血清样本中 25-(OH)D3 的浓度



16 个异常血清样本中 25-(OH)D2 的浓度

图 3 16 个异常血清样本中各维生素 D 代谢物浓度范围

■ 结论

本文利用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL 建立一种简便、快速、准确的血清中 1,25-二羟基维生素 D₃、24,25-二羟基维生素 D₃、25-羟基维生素 D₃ 和 25-羟基维生素 D₂ 的联合检测方案；方法通过蛋白沉淀 + 液液萃取的处理方式，实现了高灵敏度的检测，其中 1,25-二羟基维生素 D₃ 和 24,25-二羟基维生素 D₃ 的定量下限可达到 30 pg/mL 和 40 pg/mL，在 50 倍的线性范围内的相关系数达到 0.9990 以上，各分析物的精密度 RSD 范围在 4.3%~13.7% 之间，准确度相对偏差范围在 -9.5%~13.2% 之间，满足日常临床检测的需求，为临床上非 PTH 介导的高钙血症的风险评估和诊断提供参考方法。

岛津应用云

