

· 论 著 ·

HPLC-MS/MS 检测血清 25-羟维生素 D 方法的建立和基本性能评价*

赵 平, 周 慧, 张 曼[△]

(首都医科大学附属北京世纪坛医院医学检验科/尿液细胞分子诊断北京市重点实验室 100038)

摘要:目的 建立一种检测血清 25-羟维生素 D₂[25(OH)D₂]和 25-羟维生素 D₃[25(OH)D₃]的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)方法,以用于常规临床评价维生素 D 水平。**方法** 以稳定同位素标记的 25(OH)D₂-d₃ 和 25(OH)D₃-d₃ 作内标,血清标本和标准品采用饱和硫酸锌和乙腈沉淀血清蛋白,正己烷提取。采用 HPLC-MS/MS 技术进行分析,固定相为 Poroshell 120 EC-C18 正向柱,电喷雾离子源(ESI),多反应监测模式(MRM),干燥气温为 275 ℃,干燥气流为 10 L/min,喷雾器压力为 50 psi,毛细管电压为 5 000 V。以甲醇(80%)和超纯水(20%)为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,柱温为 50 ℃,质谱采用高温 ESI,以选择反应监测模式进行定量分析。**结果** 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 内标峰面积比与对应的水平线性相关系数均大于 0.995,检出限(LOD)均为 1.0 ng/mL,定量限(LOQ)分别为 2.0 ng/mL 和 1.5 ng/mL,25(OH)D₂ 批内和总变异系数分别为 3.01%~5.23%和 3.45%~8.72%,25(OH)D₃ 批内和总变异系数分别为 1.78%~3.43%和 2.19%~4.16%,准确度分别为 105.4%和 98.0%~104.9%,加样回收率分别为 99.67%~103.92%和 98.72%~104.04%。**结论** 本研究建立的 HPLC-MS/MS 方法检测血清中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 灵敏度高,准确性好,可用于常规临床评价维生素 D 含量。

关键词: 25-羟维生素 D; 液相色谱法; 串联质谱法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)02-0180-04

Establishment and evaluation of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in serum*

ZHAO Ping, ZHOU Hui, ZHANG Man[△]

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Key Laboratory of Urinary Cellular Diagnostica/Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (HPLC-MS/MS) for the quantitation determination of serum 25-hydroxyvitamin D₂ [25(OH)D₂] and 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] and to be used for routine clinical evaluation of Vitamin D levels. **Methods** Serum samples and standard samples were mixed respectively with 25(OH)D₂-d₃ and 25(OH)D₃-d₃ (internal standard) and treated with ZnSO₄ solution and methanol to precipitate. The residuals were then analyzed by HPLC-MS/MS system carried on a Poroshell 120 EC-C18 column. Electrospray ionization (ESI), multiple reaction monitor (MRM), dry gas temperature 275 ℃, dry gas flow 10 L/min, nebulizer 50 psi capillary voltage 5 000 V were performed. The column temperature was 50 ℃ with linear gradient elution using methanol (80%) and water (20%), and the flow rate was 0.5 mL/min. The quantitative analysis was performed by selective reaction monitoring mode of heater ESI. **Results** The correlation coefficients between the peak area ratios and 25(OH)D₂ as well as 25(OH)D₃ concentrations were higher than 0.995. The limit of detection (LOD) of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ both were 1.0 ng/mL and limit of quantification (LOQ) were 2.0 ng/mL and 1.5 ng/mL respectively. The within-run and total coefficients of variation of 25(OH)D₂ were 3.01%~5.23% and 3.45%~8.72%; within-run and total coefficients of variation of 25(OH)D₃ were 1.78%~3.43% and 2.19%~4.16%. The accuracy was 105.4 for 25(OH)D₂ and it ranged from 98.0% to 104.9% for 25(OH)D₃. The recovery rates of 25(OH)D₂ were 99.67%~103.92%, which of 25(OH)D₃ were 98.72%~104.04%. **Conclusion** A HPLC-MS/MS method for serum 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ has been established. It is sensitive and accurate, and can be used in the evaluation of vitamin D in routine clinical laboratory.

Key words: 25-hydroxy vitamin D; liquid chromatography; tandem mass spectrometry

维生素 D 在人体生长发育过程中具有维持钙磷水平稳定,维持骨骼和肌肉正常功能的重要作用。维生素 D 的缺乏会导致儿童佝偻病和成人软骨病及骨质疏松等骨骼疾病,并且维生素 D 缺乏还与肿瘤、心脑血管疾病、糖尿病以及结核等疾病有关^[1-4]。因此,准确测量人血清中维生素 D 水平具有重要意义。维生素 D 在体内主要来源于补充剂、植物性食物的

维生素 D₂ 和来源于动物性食物及紫外线照射自身合成的维生素 D₃。维生素 D₂ 和维生素 D₃ 在肝脏中转化为 25-羟维生素 D₂ [25(OH)D₂] 和 25-羟维生素 D₃ [25(OH)D₃], 二者总称为 25-羟维生素 D [25(OH)D]。25(OH)D 性质稳定,半衰期长,并且体内含量相对较高,是监测体内维生素 D 营养状况的最佳指标^[5-6]。目前,基于免疫学方法的各种检测方法和商

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(2014AA022304)。

作者简介:赵平,男,主管技师,主要从事质谱和微生物检验相关研究。△ 通信作者,E-mail:mzhang99@aliyu.com。

业化试剂盒在临床上被广泛应用于维生素 D 的检测。但是, 由于抗体的交叉反应和灵敏度低, 免疫学方法不能区别 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 其检测的准确性值得商榷^[7]。高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)能够有效区分 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 并且灵敏度高, 被认为是检测人血清中 25(OH)D 的金标准^[8]。本研究旨在建立一种能快速、简便、灵敏、准确的测量人血清中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的方法, 为临床准确评估患者体内维生素 D 的水平提供可靠的依据。

1 材料与与方法

1.1 仪器和试剂 安捷伦 1200 高效液相色谱仪和安捷伦 6460 三重串联四极杆质谱仪购自美国 Agilent 公司; 5418 离心机购自德国 Eppendorf 公司; GENIUS 3 漩涡混合器购自德国 IKA 公司; 超纯水处理系统购自美国 Millipore 公司。25(OH)D₃ monohydrate 及 25(OH)D₂ 标准品, 25(OH)D₃-d₃ 和 25(OH)D₂-d₃ 稳定同位素内标, 小牛血清以及甲酸购自美国 Sigma 公司。25(OH)D₂/D₃ 质控血清购自德国 Recipe 公司。SRM 972a 参考物购自美国国家标准与技术研究院(NIST)。色谱纯甲醇、乙腈和正己烷购自美国 Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 空白血清的制备 取 2.14 g Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.268 g NaH₂PO₄ · H₂O, 0.9 g NaCl 和 5 g 小牛血清粉剂, 溶于 75 mL 高纯水中, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4, 将溶液转移至 100 mL 容量瓶中, 加水定容至规定刻度, 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 标准和内标溶液的配制 分别准确称取 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 标准品各 1 mg, 加入甲醇 0.5 mL 溶解, 充分混匀, 配制成 2 mg/mL 的标准品储备液。应用小牛血清空白基质溶液将 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的标准品储备液分别精密定容稀释成水平为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5、5.0 和 2.5 ng/mL 的标准品工作液, 每支 150 μL 分装, -80 °C 保存。配制 25(OH)D₂-d₃ 和 25(OH)D₃-d₃ 内标甲醇溶液, 使水平为 1 000 ng/mL。将内标溶液分装于 1.5 mL 安瓿中, -20 °C 保存备用。

1.2.3 标本制备 精密吸取 150 μL 标准溶液和血清标本, 分别置于 1.5 mL 样品瓶中, 加 15 μL 1 000 ng/mL 内标溶液, 充分混匀; 加 150 μL 饱和硫酸锌水溶液, 加 300 μL 乙腈, 涡旋震荡 30 s, 室温静置 15 min; 加入 750 μL 正己烷, 涡旋震荡 30 s; 13 000 r/min 离心 5 min; 吸取上清液 0.5 mL 置样品管中, 室温下氮气吹干, 200 μL 甲醇: 水(75: 25)复溶, 充分混匀 30 s。

1.2.4 色谱质谱条件 色谱柱为 Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm × 50.0 mm, 2.7 μm); 柱温为 50 °C; 流速为 0.5 mL/min; 进样量为 10 μL; 流动相: 流动相 A 为超纯水 + 0.1% 甲酸, 流动相 B 为甲醇 + 0.1% 甲酸。采用梯度洗脱: 0.0~2.3 min 80%B, 2.3~2.4 min 80%B, 2.4~3.9 min 98%B, 3.9~4.0 min 98%B, 4.0~5.9 min 80%B。质谱参数: 离子源为电喷雾离子源(ESI); 离子模式为正极; 干燥气温为 275 °C; 干燥气流为 10 L/min; 喷雾器压力为 50 psi; 毛细管电压为 5 000 V。质谱多反应监测模式(MRM)参数见表 1。

1.3 方法学评价 参照美国食品和药品管理局(FDA)的生物分析方法验证导则标准^[9]对建立的 HPLC-MS/MS 进行基本分析性能验证。

1.3.1 标准曲线的建立及检测限评估 将用小牛血清配制的 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 系列水平的标准品按照上述 HPLC-

MS/MS 条件进行测定, 以标准溶液水平为 X 轴, 标准和内标峰面积的比值为 Y 轴, 进行线性回归分析, 经“1/X”权重得回归方程, 建立标准曲线。将标本峰面积代入标准曲线方程, 计算血清标本 25(OH)D 的水平。以信噪比(S/N)大于 3, 3 次测定变异系数(CV)小于 20% 为检出限(LOD); 以 S/N 大于 10, CV 小于 20% 为定量限(LOQ)。

表 1 质谱 MRM 参数

化合物	MRM	碰撞电压 (V)	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (V)
25(OH)D ₃	383.2~401.3	106	100	4
	159.1~401.3	106	100	24
25(OH)D ₂	395.3~413.3	106	100	4
	355.2~413.3	106	100	4
25(OH)D ₃ -d ₃	386.3~404.4	106	100	4
25(OH)D ₂ -d ₂	398.3~416.4	106	100	4

1.3.2 精密度的测试 对含有低、中、高水平 25(OH)D 的混合新鲜人血清以及低、中、高水平的质控血清进行 3 次重复分析, 每次每种血清重复分析 3 份, 每份重复进样 3 次, 以考察方法的精密度。

1.3.3 准确度验证 25(OH)D₃ 的准确度验证利用本研究建立的方法测定 NIST 有证标物 SRM 972a 的 3 个水平 Level 1、3 和 4, 25(OH)D₂ 准确度验证利用 SRM972a 的 1 个水平 Level 3, 均重复测定 3 次, 考察方法准确性。

1.3.4 加样回收试验 混合血清分别添加 25.0、125.0、250.0 ng/mL 的混合标准品溶液各 25 μL, 每管重复进样 3 次, 计算加样回收率。

2 结果

2.1 质谱分析结果 本试验条件下处理标准溶液、质控品及血清, 25(OH)D₂ 及内标的保留时间为 2.0 min, 25(OH)D₃ 及内标的保留时间约 2.2 min, 分析时间为 5.9 min, 各成分分离良好, 互不干扰。以 100.0 ng/mL 标准品为例, 其总离子图和 MRM 图, 见图 1。

2.2 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的标准曲线和检测限 用本研究的方法测定 2.5~200.0 ng/mL 的标准品建立标准曲线, 25(OH)D₂ 的回归方程为 Y=8.603 485X+0.010 245, 决定系数(R²)=0.996 2; 25(OH)D₃ 的回归方程为 Y=9.082 428X+0.012 153, R²=0.997, 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 在 2.5~200.0 ng/mL 范围内呈良好的线性关系, 见图 2。25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的 LOD 均为 1.0 ng/mL, LOQ 分别为 2.0 ng/mL 和 1.5 ng/mL, 方法具有较高的灵敏度, 能够满足临床低水平维生素 D 准确定量分析的要求。

2.3 精密度的测试 本研究分析 3 个水平新鲜人血清样品 [3 个水平均含有 25(OH)D₃, 仅高值血清中的 25(OH)D₂ 在线性范围内] 和 3 个水平质控血清 [同时含有 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃], 6 种血清分别进行 3 次重复分析, 每次每种血清重复分析 3 份, 结果显示 25(OH)D₃, 总 CV 的平均值为 3.07% (2.19%~4.16%), 批内 CV 为 2.38% (1.78~3.43%); 25(OH)D₂ 总 CV 的平均值为 6.32% (3.45%~8.72%), 批内 CV 为 4.28% (3.01%~5.23%), 见表 2。同时所用质控血清测定值均在其给定范围内, 提示本方法具有较好的精密度。

2.4 准确度测试 本研究采用 NIST 有证标物 SRM 972a 进

行准确度验证,结果显示 25(OH)D2 的准确度为 105.4%,25(OH)D3 的准确度在 98.0%~104.9%,见表 3。显示该方法具有较高的准确性。

表 2 HPLC-MS/MS 分析 25(OH)D2 和 25(OH)D3 的精密度

血清	25(OH)D3			25(OH)D2		
	均值(ng/mL)	平均批内 CV(%)	总 CV(%)	均值(ng/mL)	平均批内 CV(%)	总 CV(%)
S1	9.34	3.09	4.09	—	—	—
S2	21.21	2.01	3.21	—	—	—
S3	34.17	1.65	1.87	4.34	5.23	8.72
Q1	9.32	3.43	4.16	8.43	4.67	7.43
Q2	18.12	2.34	2.89	17.45	4.21	5.67
Q3	44.32	1.78	2.19	20.12	3.01	3.45

注:—表示低于检测线性下限。

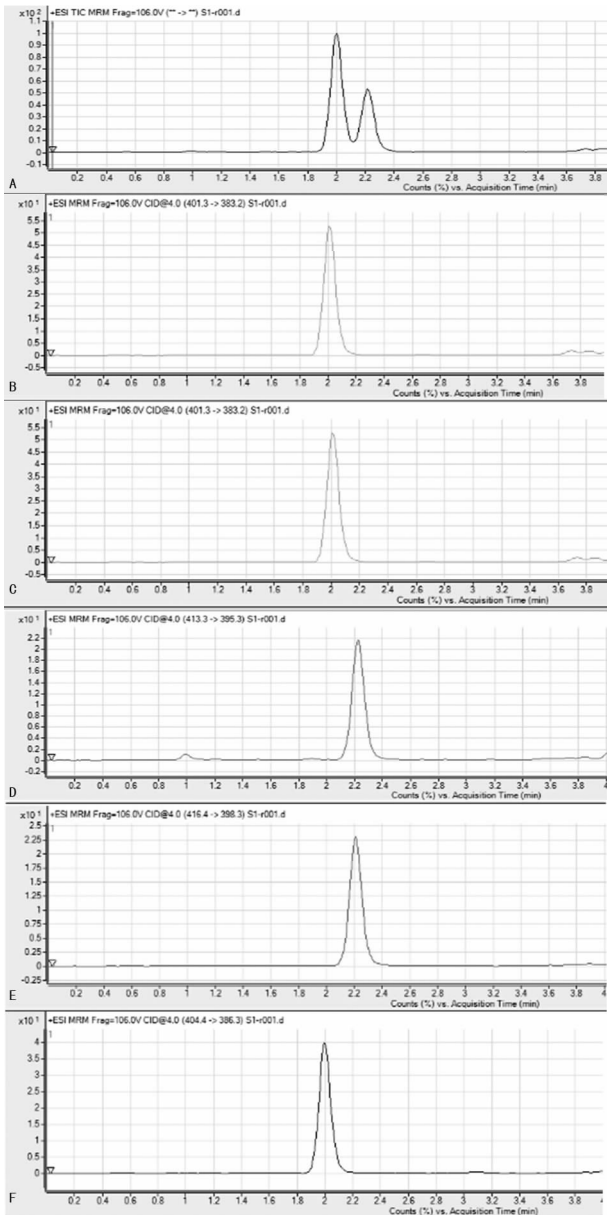
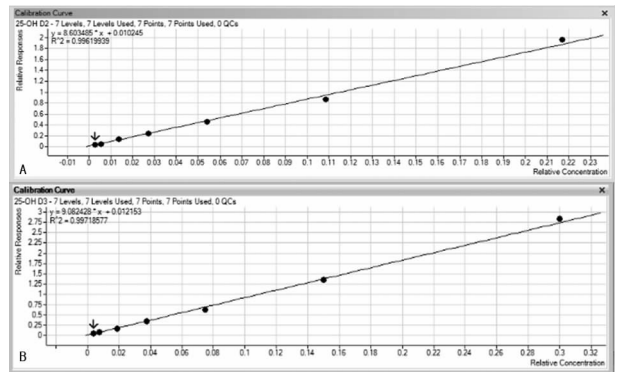


图 1 25(OH)D2 和 25(OH)D3 以及内标的 HPLC-MS/MS 分析色谱图

注:A 为总离子色谱图;B 为 25(OH)D3 的 MRM 色谱图;C 为 25(OH)D2 的 MRM 色谱图;D 为 25(OH)D2-d3 的 MRM 色谱图;E 为 25(OH)D3-d3 的 MRM 色谱图。



注:A 为 25(OH)D2 的标准曲线;B 为 25(OH)D3 的标准曲线。

图 2 25(OH)D2 和 25(OH)D3 的标准曲线

表 3 HPLC-MS/MS 法检测 25(OH)D2 和 25(OH)D3 准确度验证

25(OH)D	SRM	靶值 (ng/mL)	均值 (ng/mL)	偏倚 (%)	准确度 (%)
25(OH)D3	972a				
	L1	30.61	30.01	1.96	98.0
	L3	19.80	20.77	4.90	104.9
25(OH)D2	L4	55.40	54.34	1.91	98.1
	L3	13.30	14.02	5.41	105.4

注:L1 和 L4 中含有 3-epi-25(OH)D3,其中 L1 中 25(OH)D3 为 28.8 ng/mL,3-epi-25(OH)D3 为 1.81 ng/mL;L4 中 25(OH)D3 为 29.4 ng/mL,3-epi-25(OH)D3 为 26.0 ng/mL,所用靶值均为两者之和。

2.5 加样回收率 本研究测定 4 次试验的混合血清[25(OH)D2 和 25(OH)D3 的测定值分别为 2.61、23.6 ng/mL]添加 3 种水平(25.0、125.0、250.0 ng/mL)25(OH)D2 标准品的回收率分别为 103.92%、100.68%和 99.67%;25(OH)D3 标准品的回收率分别为 102.22%、98.72%和 104.04%。表明待测物 25(OH)D2 和 25(OH)D3 在本研究处理过程中基本没有损失,检测数据可靠。

3 讨论

维生素 D 在人体中的作用不仅体现在骨骼方面,其在肿瘤、心脑血管病、糖尿病以及感染性疾病等方面的作用也逐渐受到重视。维生素 D 在人体内主要以维生素 D2 和维生素 D3 两种形式存在,前者主要来源于食物,后者主要来源于阳光照

射下皮肤中生成。两种维生素 D 在肝脏中分别代谢生成 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 两者在体内半衰期均较长, 且水平较高, 是衡量维生素 D 营养状况的最佳指标^[8-9]。由于 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 来源不同, 并且生物学效应强度可能不同, 因此, 研究认为需对两者进行分别测定^[10]。但现有的检测 25(OH)D 的方法主要是基于利用抗原抗体反应的免疫学原理的检测方法, 其不能区分测定 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 部分方法仅能测定 25(OH)D₃, 对准确评估体内维生素 D 水平有很大的局限性^[11]。

随着色谱和质谱技术的发展, HPLC-MS/MS 分析技术被迅速应用于维生素 D 的检测。由于 HPLC-MS/MS 方法特异度和灵敏度均较高, 准确性好, 并且能同时检测出血清中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的水平, 被认为是检测 25(OH)D 的金标准。样本前处理和质谱分析是 HPLC-MS/MS 检测 25(OH)D 的中 2 个关键步骤。本研究中使用乙腈和饱和硫酸锌沉淀血清蛋白, 并用正己烷提取 25(OH)D, 采用高效液相色谱, Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm×50.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 并以甲醇和水为流动相, 分析时间为 4.9 min。本研究的标本前处理方法和质谱分析时间均较国际上的候选参考方法简便快速, 并且能对 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 分别定量, 适用于临床大样本量检测。本研究同时采用美国 NIST SRM 972a 有证标物对标准溶液进行靶值转移, 可溯源至国际 SI 单位, 采用 SRM 972a 的水平 Level 1、3 和 4 验证了方法的准确性, 结果显示 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的准确度在 98.0%~105.4%。

本研究的线性范围为 2.5~200.0 ng/mL, 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的 LOD 和 LOQ 分别为 1.0 ng/mL 和 1.0 ng/mL 及 2.0 ng/mL 和 1.5 ng/mL。此线性检测范围和灵敏度能够满足维生素 D 日常检测的需要, 与其他文献报道的线性性能类似^[11-12]。精密度评价结果显示本方法 25(OH)D₂ 批内 CV<6.00%, 总 CV<9.00%, 25(OH)D₃ 批内 CV<4.00%, 总 CV<5.00%。本研究中 25(OH)D₂ 的加样回收率均在 99.67%~103.92%, 25(OH)D₃ 加样回收率在 98.72%~104.04%, 提示本方法在样本处理过程中损失少, 数据可靠。本研究的线性评价、精密度及准确度的性能评价符合美国 FDA 的生物分析方法验证导则标准对建立的 HPLC-MS/MS 进行基本性能验证的要求。

有研究报道 3-epi-25(OH)D₃ 会影响 25(OH)D₃ 质谱法的检测结果^[13], 但由于内源性 3-epi-25(OH)D₃ 与 25(OH)D₃ 的分子大小相同, 结构上仅有一个羟基空间方向上的差异, 本研究无法将 3-epi-25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃ 有效区分开。但也有研究认为人体 3-epi-25(OH)D₃ 水平相对较低, 不影响对 25(OH)D 的检测^[14]。

总之, 本研究建立的 HPLC-MS/MS 测定血清 25(OH)D 的方法, 样本处理简单, 能够同时准确、精密测量 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 性能验证结果表明所建方法性能优异, 适合于临床评估维生素 D 水平。

参考文献

[1] Robsahm TE, Schwartz GG, Tretli S. The inverse relationship between 25-hydroxyvitamin D and cancer survival: discussion of causation[J]. *Cancers (Basel)*, 2013, 5(4):1439-1455.
 [2] Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ix JH, et al. Racial

differences in the association of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with coronary heart disease events [J]. *JAMA*, 2013, 310(2):179-188.
 [3] Zheng JS, Parnell LD, Smith CE, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, IRS1 variant rs2943641, and insulin resistance: replication of a gene-nutrient interaction in 4 populations of different ancestries [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1):186-196.
 [4] Pareek M, Innes J, Sridhar S, et al. Vitamin D deficiency and TB disease phenotype [J]. *Thorax*, 2015, 70(12):1171-1180.
 [5] Whiting SJ, Langlois KA, Vatanparast H, et al. The vitamin D status of Canadians relative to the 2011 Dietary Reference Intakes: an examination in children and adults with and without supplement use [J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 94(1):128-135.
 [6] Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status [J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(4):1087S-1091S.
 [7] Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, et al. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3):543-548.
 [8] Stepman HC, Vanderroost A, Vanuytfanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(3):441-448.
 [9] Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation [R]. Rockville: FDA, 2001.
 [10] Bruce SJ, Rochat B, Béguin A, et al. Analysis and quantification of vitamin D metabolites in serum by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry—a method comparison and validation [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(1):200-206.
 [11] 禹松林, 韩建华, 张江涛, 等. 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法快速测定血清 25-羟维生素 D₂ 和 25-羟维生素 D₃ 临床方法的建立 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(8):617-622.
 [12] 宋斌斌, 秦嘉倩, 彭颖斐, 等. 液相色谱-串联质谱法检测血清 25-羟基维生素 D 的方法建立和性能评价 [J]. *检验医学*, 2015, 30(5):416-421.
 [13] Chen Y, Kinney L, Bozovic A, et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche MODULAR Analytics E170 Total 25-OH Vitamin D assays [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17):1485-1490.
 [14] Keevil B. Does the presence of 3-epi-25OHD₃ affect the routine measurement of vitamin D using liquid chromatography tandem mass spectrometry? [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(1):181-183.