

# 高效液相色谱-串联质谱技术在末梢血干血斑中维生素D含量测定中的应用进展

周婷婷<sup>1</sup>, 李雨艳<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 郑妍<sup>2\*</sup>

(1. 吉林金域医学检验所有限公司, 长春 130000; 2. 延边大学药学院, 延吉 133002)

**摘要:** 维生素D在人体钙磷代谢、骨骼健康维持及多种慢性疾病预防等方面发挥着关键作用。准确测定人体内维生素D的含量对于评估机体营养状况、疾病诊断与防治具有重要意义。末梢血干血斑作为一种便捷、微创且易于储存和运输的样本类型,近年来在临床检测中的应用日益广泛。高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS)以其高灵敏度、高选择性和卓越的定量分析能力,成为测定末梢血干血斑中维生素D含量的有力工具。本文深入综述了HPLC-MS/MS技术在末梢血干血斑维生素D含量测定中的应用进展,详细阐述了该技术的检测原理、样本前处理方法、分析方法的建立与验证情况,同时对其在实际应用中的优势与面临的挑战进行了探讨,旨在为临床精准检测维生素D含量、优化相关疾病诊疗策略提供理论参考。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱技术; 末梢血干血斑; 维生素D; 含量测定

## 0 引言

维生素D是人体必需的脂溶性维生素,在生理过程中作用关键。它能调节钙磷代谢,促进肠道吸收钙、磷,维持血清浓度,支撑骨骼生长发育,预防儿童佝偻病、降低成人及老人骨质疏松风险<sup>[1]</sup>。此外,它还参与免疫调节等,与多种慢性病相关。但全球维生素D缺乏现象普遍,儿童缺乏可致骨骼发育异常,成人和老人缺乏会增加骨质疏松风险。准确测定维生素D含量对评估营养状况、诊断疾病及干预意义重大<sup>[2]</sup>。传统检测方法,如放射免疫法操作简便,具有灵敏度低等局限。末梢血干血斑样本采集创伤小、易保存运输,优势独特<sup>[3]</sup>。高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS)灵敏度和特异性高,能检测多种代谢物,应用于干血斑中维生素D的测定,有望克服传统方法的不足,提供更可靠的依据<sup>[4]</sup>。

本文将全面综述HPLC-MS/MS技术在末梢血干血斑维生素D含量测定中的应用现状,剖析该技术的检测原理、样本前处理关键步骤、分析方法的构建与验证要点,深入探讨其在实际应用中的优势与面临的挑战,旨在为临床实践中更高效、精准地检测维生素D含量进而优化相关疾病的诊疗流程与策略提供详实的理论依据与技术参考。

## 1 高效液相色谱-串联质谱技术测定末梢血干血斑中维生素D的方法学建立与验证

### 1.1 方法学建立

样本前处理:取50~100 μL末梢血制干血斑,室温干燥,短期常温、长期-20℃以下保存;用甲醇等提取,涡旋或超声,调参数优化。色谱条件:用C18柱,调节流动相比例、流速、柱温优化。质谱条件:选ESI源,正离子模式为主,选监测离子对,优化参数测维生素D含量。

### 1.2 方法学验证

线性范围和定量限方面,制备涵盖样本可能浓度的系列维生素D标准品溶液,加入空白干血斑基质制成标准样本,经前处理后检测,以浓度为横坐标、峰面积或离子强度为纵坐标绘制至少含5个浓度点的标准曲线,分析曲线确定线性范围(要求 $r^2$ 大于0.99),通过测定低浓度样本信噪比(S/N达到10时对应的浓度)评估定量限<sup>[5]</sup>。周丽君等<sup>[6]</sup>在其关于末梢全血中25-羟基维生素D含量的监测研究中,同样采用LC-MS/MS技术,日内精密度通过同一天内对同浓度标准样本至少重复测定6次,日间精密度则在至少3天里每天对同浓度样本至少测定3次,保证了较高的精密度和准确度。稳定性验证包括考察样本在室温

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20230203094SF)。

第一作者:周婷婷,硕士,副高级检验技师,研究方向为医学检验。

\* 通信作者:郑妍,博士,讲师,研究方向为基于质谱的药物/内源性小分子分析。E-mail: zhengyan\_0308@163.com

(如 25 °C)、冷藏(如 4 °C)、冷冻(如 -20 °C)等不同条件下不同时间点(如 0、1、3 d 等)的含量变化, 确定保存条件和期限, 以及研究样本在特定条件(如 -20 °C)下保存较长时间(如 3 个月、6 个月等)的长期稳定性。哈丽君等<sup>[7]</sup>在针对健康体检小儿的维生素 D 检测项目中, 运用高效液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)进行测定, 利用该技术的高分辨率和选择性, 选择合适条件对维生素 D 及其主要代谢物特异性识别, 通过二级质谱扫描确认身份; 同时分析空白、加标及实际样本, 考察蛋白质、脂质等物质的干扰, 优化前处理和检测条件, 减少干扰, 提高检测准确性和可靠性。

## 2 高效液相色谱-串联质谱技术测定末梢血干血斑中维生素 D 含量的应用实例

### 2.1 在婴幼儿和儿童中的应用

婴幼儿和儿童正处于快速生长发育阶段, 维生素 D 对其骨骼健康至关重要。黄金美等<sup>[8]</sup>在研究中通过高效液相色谱-串联质谱技术测定末梢血干血斑中的维生素 D 含量, 准确评估该群体的维生素 D 营养状况。对缺乏儿童及时补维生素 D 可预防佝偻病, 治疗中定期监测维生素 D 水平, 能指导调整治疗方案, 保障骨骼健康。维生素 D 不仅影响骨骼健康, 还与婴幼儿和儿童的整体生长发育密切相关。黄娟荣等<sup>[9]</sup>的研究利用该技术测定干血斑中维生素 D 含量, 可深入探讨维生素 D 与儿童身高、体重增长, 肌肉力量发展以及免疫系统发育等方面的关系, 揭示维生素 D 在儿童生长发育中的作用机制, 为制定科学合理的儿童保健策略提供依据。

### 2.2 在孕妇和哺乳期妇女中的应用

孕期孕妇对维生素 D 需求大增, 因其在促进钙吸收、维持钙稳态上起关键作用, 关乎胎儿骨骼和牙齿发育。孕期维生素 D 对胎儿的正常发育至关重要, 陈秋玲等<sup>[10]</sup>的研究表示, 高效液相色谱-串联质谱技术可用于动态监测孕妇末梢血干血斑中的维生素 D 含量。在孕期不同阶段可采集干血斑样本, 观察维生素 D 水平的变化。张愉愉等<sup>[11]</sup>研究发现, 孕期维生素 D 缺乏较为常见, 尤其是在冬季或日照不足地区的孕妇。婴儿日后某些疾病的发生风险增加可能与母亲孕期维生素 D 缺乏有关, 及时监测维生素 D 水平, 能够指导孕妇合理补充维生素 D, 确保胎儿获得充足的营养供应, 促进胎儿骨骼和牙齿的发育。

### 2.3 在老年人中的应用

老年人是骨质疏松症的高发人群, 而维生素 D 缺乏在老年人中也较为普遍。利用高效液相色谱-串联质谱技术测定老年人末梢血干血斑中的维生素 D 含量, 可准确评

估其维生素 D 营养状态, 并分析维生素 D 水平与骨质疏松症的关系。黄征宇等<sup>[12]</sup>研究表明, 维生素 D 缺乏会导致肠道对钙的吸收减少, 骨密度降低, 增加骨折的风险。通过检测维生素 D 含量, 能够早期发现老年人的维生素 D 缺乏情况, 及时采取干预措施, 如补充维生素 D 和钙剂, 预防和治疗骨质疏松症。可定期采集老年人的末梢血干血斑样本, 检测维生素 D 含量的变化。通过观察补充维生素 D 后维生素 D 水平的升高情况, 以及骨密度等相关指标的改善情况, 可判断维生素 D 补充的剂量和疗程是否合理, 为调整治疗方案提供依据, 提高老年人维生素 D 补充的有效性和安全性。

### 2.4 在特殊人群中的应用

肥胖人群中, 维生素 D 易储存于脂肪组织, 致使血液中水平较低。运用高效液相色谱-串联质谱技术测定其末梢血干血斑维生素 D 含量, 可研究维生素 D 代谢机制。慢性疾病患者如糖尿病、心血管疾病患者, 疾病发展或许与维生素 D 缺乏有关联, 检测其含量有助于揭示其在疾病病理过程中的作用。

众多研究<sup>[13]</sup>表明, 肥胖、糖尿病、心血管疾病等慢性疾病发展与维生素 D 缺乏紧密相关。测定特殊人群末梢血干血斑维生素 D 含量, 可分析其与疾病的相关性。比如糖尿病患者中, 维生素 D 缺乏可能影响胰岛素分泌与作用, 加重糖代谢紊乱。补充并监测维生素 D 水平变化, 为慢性疾病综合治疗提供新思路, 挖掘其在疾病防治中的潜在价值。

## 3 高效液相色谱-串联质谱技术测定末梢血干血斑中维生素 D 含量的发展趋势

### 3.1 技术的改进和创新

#### 3.1.1 提高检测灵敏度和分辨率

新型色谱柱材料的研发和应用有望进一步提高分离效率, 使得维生素 D 及其代谢物能够更精准地分离, 减少峰的重叠, 从而提高检测的分辨率。采用新型的纳米材料修饰的色谱柱填料, 可增加对维生素 D 分子的特异性吸附和分离能力。改进电喷雾离子源的设计, 提高离子化效率, 能够检测到更低浓度的维生素 D 及其代谢物, 从而显著提高检测灵敏度<sup>[14]</sup>。

#### 3.1.2 简化样本前处理流程

样本前处理是高效液相色谱-串联质谱技术测定维生素 D 含量的一个重要环节, 且相对繁琐。未来的发展趋势是简化样本前处理流程, 减少操作步骤和时间, 降低误差和污染产生的可能性。开发自动化的样本前处理设备, 实现干血斑样本的自动提取、净化和浓缩等操作, 提高处

理效率和一致性, 有望应用于干血斑样本中维生素 D 的提取和富集, 进一步简化前处理流程, 使检测更加快速、便捷。

### 3.2 临床应用的拓展

#### 3.2.1 建立维生素 D 相关疾病的诊断和治疗标准

高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS)凭借其卓越的特异性与灵敏度, 在末梢血干血斑(DBS)维生素 D 含量测定中展现出独特优势。通过反相色谱柱分离维生素 D 及其代谢产物, 结合三重四极杆质谱的多反应监测模式(MRM), 可精准定量 25-羟基维生素 D [25(OH)D] 及其异构体, 有效规避免疫分析法的交叉反应干扰, 实现对 25(OH)D<sub>2</sub> 与 25(OH)D<sub>3</sub> 的同步检测, 检测下限可达 1.0 nmol/L, 批内变异系数(CV) < 5%, 完全满足临床微量样本的检测需求。在临床应用体系构建中, 基于 HPLC-MS/MS 技术平台的多中心前瞻性研究正成为数据积累的核心模式。通过建立包含健康人群、代谢性骨病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤等不同疾病队列的生物样本库, 采用标准化采样流程与质量控制体系, 可获取不同人群亚组的 25(OH)D 基线水平数据<sup>[15]</sup>。

通过受试者工作特征曲线(ROC)分析, 可确定不同疾病的最佳诊断临界值, 结合机器学习算法对多维度数据的整合分析, 可建立包含维生素 D 状态的疾病诊断预测模型, 显著提升代谢性骨病的早期诊断效能。

在治疗监测领域, 该技术支持治疗周期中 25(OH)D 浓度的动态追踪, 指导钙剂与维生素 D 制剂(如骨化三醇、阿法骨化醇)的个体化给药方案调整, 避免过量补充导致的高钙血症风险。未来临床实践中, 需进一步完善基于 HPLC-MS/MS 的检测标准化流程, 建立涵盖样本前处理、仪器参数设置、结果报告规范的行业技术指南。通过构建区域化维生素 D 检测网络, 实现不同医疗机构间检测结果的互认互通, 推动该技术从研究工具向临床常规检测项目的转化。随着精准医疗理念的深入, 基于干血斑样本的维生素 D 检测体系将与基因组学、表观遗传学数据相结合, 为个体化维生素 D 营养干预及相关疾病的精准诊疗提供更全面的科学依据。

#### 3.2.2 个性化医疗中维生素 D 水平的精准监测

维生素 D 的个体化管理已从群体化干预转向基于多维度生物信息的精准调控。高效液相色谱-串联质谱技术对末梢血干血斑中 25-羟基维生素 D 及其异构体的精准定量, 为构建包含遗传背景、生理状态、环境暴露的个性化诊疗模型提供了关键数据支撑。维生素 D 代谢通路关键基因的单核苷酸多态性(SNP)显著影响个体对维生素 D 的需求阈值, *CYP2R1* 基因 rs10766197 位点变异可使 25-

羟基化效率降低 40%, 导致携带者需增加 30%~50% 的补充剂量; 维生素 D 结合蛋白 rs7041 位点的 G 等位基因与 25(OH)D 生物活性形式结合能力增强, 其携带者血清游离 25(OH)D 浓度较野生型高 12%~18%。根据患者的年龄、性别、遗传因素、生活方式等个体差异, 结合维生素 D 水平的检测结果, 制定个性化的维生素 D 补充和健康管理方案。

### 3.3 与其他技术的联合应用

#### 3.3.1 与基因组学、蛋白质组学等技术的结合

基因组学技术, 如全基因组关联分析(GWAS), 可以鉴定与维生素 D 代谢和功能相关的基因变异, 揭示个体对维生素 D 反应的遗传基础。李敏<sup>[16]</sup>的研究表明, 将高效液相色谱-串联质谱技术与基因组学、蛋白质组学等技术相结合, 能够更全面地研究维生素 D 的作用机制和功能。蛋白质组学技术, 如质谱蛋白质组学, 能够检测维生素 D 对蛋白质表达和修饰的影响, 发现维生素 D 作用的新靶点和信号通路<sup>[17]</sup>。通过整合这些技术的研究结果, 深入了解维生素 D 在细胞生理和病理过程中的作用机制, 为开发新的治疗方法和药物提供理论依据。

#### 3.3.2 综合分析维生素 D 与其他生物标志物的关系

维生素 D 与许多其他生物标志物密切相关, 综合分析它们之间的关系对于全面评估健康状况和疾病风险具有重要意义<sup>[18]</sup>。高效液相色谱-串联质谱技术可以与其他生物标志物的检测技术相结合, 同时检测维生素 D 和其他生物标志物, 如钙、磷、甲状旁腺激素、炎症因子等<sup>[19-20]</sup>。通过分析这些生物标志物之间的相互关系, 揭示维生素 D 在维持体内生理平衡和疾病发生发展中的作用, 为疾病的诊断、治疗和预防提供更全面的信息。

## 4 结论

本文系统综述了高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS)在末梢血干血斑维生素 D 含量测定中的多方面应用。研究内容涵盖了该技术的检测原理, 其基于液相色谱对复杂样本的高效分离能力, 结合质谱的高灵敏度定量特性, 能够精准区分并测定维生素 D 及其代谢产物。在样本前处理环节, 详细阐述了从末梢血干血斑采集、干燥保存到提取、净化等一系列关键步骤, 不同的处理方法对检测结果的准确性与重复性有着重要影响。同时, 深入分析了 HPLC-MS/MS 分析方法的构建与验证要点, 包括线性范围、精密度、准确度、检出限和定量限等指标的确定, 以确保检测方法的可靠性与有效性。

从研究结果来看, HPLC-MS/MS 技术在末梢血干血斑维生素 D 含量测定中展现出显著优势。其高灵敏度使得即

使在痕量维生素 D 存在的情况下也能精准检测, 为早期发现维生素 D 缺乏或不足提供了可能; 高选择性有效避免了复杂生物基质中其他成分的干扰, 保障了检测结果的准确性。并且, 该技术与末梢血干血斑样本的结合, 充分发挥了后者采样便捷、微创等优势, 极大地提高了临床检测的可行性与患者接受度。然而, 研究也指出目前该技术在应用中面临一些挑战, 如仪器设备昂贵、操作复杂对专业人员要求高, 以及样本前处理过程中的一些技术难题等。

随着科技的不断进步, HPLC-MS/MS 仪器有望朝着小型化、自动化、智能化方向发展, 降低设备成本与操作难度, 促进该技术在基层医疗机构的广泛应用。同时, 在样本前处理技术方面, 预计会涌现出更简便、高效、低成本的方法, 进一步优化检测流程。此外, 对维生素 D 代谢通路及相关疾病机制的深入研究, 将促使 HPLC-MS/MS 技术在维生素 D 检测中的应用更加精准化、个性化, 为临床疾病的诊断、治疗及预防提供更有力的技术支持, 助力提升全民健康水平。

## 参考文献

- [1] 陈艳飞, 刘琴, 王玲萍, 等. 均相酶免疫法检测血清维生素 D 含量的性能验证 [J]. 中国血液流变学杂志, 2024, 34(1): 113-117.
- [2] 厉圣斌, 刘博宇, 姚婉清, 等. UPLC-MS/MS 法检测定量干血斑中三种抗真菌药物 [J]. 中南药学, 2024, 22(11): 3021-3025.
- [3] 高慧洁, 赵肖依, 王德峰, 等. 2 型糖尿病病人血清维生素 D 含量与甲状腺功能相关性研究 [J]. 中国科技期刊数据库医药, 2024, (8): 0064-0067.
- [4] 高洁, 李静, 王刚文, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测干血点样品中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的方法 [J]. 分析仪器, 2020, (6): 51-55.
- [5] 封其华, 李锦芬. 维生素 A、D 含量与儿童肺炎支原体肺炎病情程度及临床转归的关系探究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2024, 31(9): 1641-1647+1710.
- [6] 周丽君, 陈博一, 刘纪松, 等. 高效液相色谱串联质谱法检测末梢全血中 25-羟基维生素 D 含量的方法及其临床应用 [J]. 解放军药学学报, 2023, 36(1): 60-66.
- [7] 哈丽君, 杨金翘, 马小凤. 高效液相色谱串联质谱法检测儿童血清 25-(OH)D<sub>2</sub>+D<sub>3</sub> [J]. 医药前沿, 2023, 13(16): 86-88.
- [8] 黄金美, 甘水根, 柯乔贞, 等. 维生素 D 联合家庭干预治疗儿童孤独症谱系障碍的疗效观察 [J]. 延边大学医学学报, 2024, 47(3): 311-313.
- [9] 黄娟荣, 赵小燕, 张敬富. 维 D 磷葡钙片治疗小儿维生素 D 缺乏性佝偻病的疗效观察 [J]. 现代诊断与治疗, 2024, 35(12): 1793-1795.
- [10] 陈秋玲, 李文霞, 李华, 等. 妊娠期糖尿病合并低维生素 D 孕妇血清 IGF-1、炎症因子表达 [J]. 中国计划生育学杂志, 2022, 30(1): 151-154+159.
- [11] 张愉愉, 卢游, 刘宇. 血清 25-羟基维生素 D、钙、锌水平与儿童生长发育的关系 [J]. 昆明医科大学学报, 2024, 45(7): 126-131.
- [12] 黄征宇, 罗雅娟. 2 型糖尿病患者预防骨质疏松所需维生素 D 水平的研究 [J]. 医学理论与实践, 2024, 37(3): 473-475.
- [13] 阮亮亮, 李金蓉. 血清中维生素 D 活性代谢物的 LC-MS/MS 定量方法研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2024, 45(S1): 80-84.
- [14] 韩吉春, 王小臣, 李广林, 等. 液相色谱-串联质谱法检测干血点样本中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> [J]. 分析化学, 2017, 45(3): 448-454.
- [15] 马少杰, 毕颖薇, 胡文娟, 等. 化学发光免疫分析法和液相色谱-串联质谱法检测儿童血清 25-羟基维生素 D 的一致性研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(1): 91-94.
- [16] 张敏, 解晓露, 黄小兰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定儿童末梢全血干血点中的维生素 D [J]. 现代预防医学, 2019, 46(1): 106-110, 120.
- [17] 李敏, 孙江漫, 孟祥兆, 等. 前因素对不同检测原理的 25-羟基维生素 D 检测结果的影响 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2024, 16(2): 278-281.
- [18] 李雯雯, 李晓南, 贾飞勇, 等. 基于多中心研究建立儿童微量血维生素 D 质谱法检测的临床应用标准 [J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(12): 1282-1287.
- [19] 王振兵, 曾莉. 重庆地区 1853 例 6 岁以下儿童末梢血 25-羟基维生素 D 检测结果分析 [J]. 医药前沿, 2023, 13(23): 130-132.
- [20] 杜晓明, 王开红, 侯文丽. 成人 2 型糖尿病患者维生素 D 水平与微血管病变的相关性研究 [J]. 糖尿病天地, 2020, 17(3): 199.