

液相色谱串联质谱法在血清 25-羟基维生素 D 浓度检测中的应用

郝静, 赵式樱, 周婷婷, 张敏*

(吉林金域医学检验所有限公司质谱室, 长春 130000)

摘要: **目的** 建立液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)测定血清 25-羟基维生素 D 含量的方法, 并评估其在血清 25-羟基维生素 D 浓度检测中的应用价值。**方法** 采用乙醇沉淀蛋白, 正己烷液液萃取目标组分, 乙腈复溶, 运用 LC-MS/MS 的正离子电喷雾离子化(ESI+)多反应监测模式(MRM)结合氘代同位素内标法检测血清 25(OH)D₂ 及 25(OH)D₃ 含量, 并进行方法学验证。**结果** 密度为 1.25%~6.50%, 批间精密度的 2.00%~8.50%; 标志物 A 在 1.0~15.0 ng/mL、标志物 B 在 8~120 ng/mL 范围内线性良好, 线性相关系数分别为 0.9985、0.9997, 校准品测试结果正确度为 96.0%~100.8%。对 1675 名志愿者检测发现, 男性检查平均值为 (26.40±3.65) ng/mL, 女性平均值为 (24.00±2.947) ng/mL, 具有显著差异 ($P < 0.05$)。**结论** LC-MS/MS 检测血清 25(OH)D₂ 及 25(OH)D₃ 敏感性高, 结果准确、稳定, 可应用于临床分析。

关键词: 25-羟基维生素 D; 液相色谱串联质谱; 血清; 内标法; LC-MS/MS

0 引言

维生素 D 作为一种脂溶性维生素, 在维持人体钙磷代谢平衡、促进骨骼健康发育等方面发挥着不可或缺的作用。近年来, 越来越多的研究表明, 维生素 D 的生理功能远不止于此, 其与心血管疾病、免疫系统疾病、神经系统疾病以及多种恶性肿瘤的发生发展也存在着密切的关联^[1]。血清 25-羟基维生素 D [25(OH)D] 是人体内维生素 D 的主要储存形式和反映机体维生素 D 营养状况的最佳指标, 准确检测其浓度对于评估个体维生素 D 水平、诊断相关疾病以及指导临床治疗具有至关重要的意义^[2]。目前, 临床上用于检测血清 25(OH)D 浓度的方法众多, 包括放射免疫分析法、酶联免疫吸附法、化学发光免疫分析法等免疫分析技术。这些方法虽然具有操作相对简便、检测速度较快等优点, 但也存在着诸多局限性。免疫分析方法易受到抗体特异性和交叉反应的影响, 导致检测结果的准确性和重复性欠佳, 尤其在低浓度样本检测时误差较大^[3]。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)作为一种具有高灵敏度、高选择性和高准确性的分析技术, 近年来在临床检验领域得到了广泛的应用和关注。LC-MS/MS 能够对复杂生物样本中的目标化合物进行精确的定性和定量分析, 有效

克服了以上免疫分析方法的缺点。在血清 25(OH)D 浓度检测中, LC-MS/MS 凭借其独特的技术优势, 能够准确区分 25(OH)D 的不同异构体, 减少干扰物质的影响, 提供更为可靠的检测结果^[4]。因此, 深入研究 LC-MS/MS 在血清 25(OH)D 浓度检测中的应用, 对于提高临床维生素 D 检测水平、推动相关疾病的精准诊断和治疗具有重要的现实意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2022 年 5 月—2024 年 5 月吉林省 1675 名健康人员进行研究, 其中男性 719 名, 女性 956 名, 年龄 0~90 岁, 平均年龄 (43.60±5.78) 岁。

1.2 方法

仪器: 使用 SCIEX 高分辨质谱仪搭配 SHIMADZU 超高效液相色谱系统、Sigma 3-18K 型高速冷冻离心机、IKA MS3 基本型多管涡旋混合仪、VORTEX GENIUS 3, IKA 快速混匀器、Eppendorf Research plus 系列可调移液器、Millipore Milli-Q Integral 超纯水仪等。

试剂: 甲醇、正己烷、乙醇以及乙腈, 均为色谱级, 采购自美国 Merck KGaA 公司; 甲酸则购自天津致远化学

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(项目编号: 20230203094SF)。

第一作者: 郝静, 中级检验师, 研究方向为质谱技术在临床的应用。

*** 通信作者:** 张敏, 硕士, 高级工程师, 研究方向为质谱技术在临床的应用。E-mail: jlzhangmin@kingmed.com.cn

制剂有限公司;超纯水由实验室自行制备。

标准品:本研究采用的标准品包括25(OH)D₂、25(OH)D₃、25(OH)D₂-d₆和25(OH)D₃-d₆,均从Sigma-Aldrich公司购入。而质控品则采购自RECIPE公司。

色谱条件:选用Sigma C18 5.0 cm×2.1 mm, 2.7 μm 色谱柱,流动相为甲醇(0.2%甲酸):水(0.2%甲酸),采用梯度洗脱。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测模式(MRM);采集离子对:25(OH)D₂的质荷比为413.15→355.20,25(OH)D₃的质荷比为401.15→365.15。

标准品准备与处理:称取适量标准品,用乙醇定容,配制不同浓度混合标准品,使25(OH)D₂浓度为0.5、1.0、2.0、5.0和10.0 ng/mL,25(OH)D₃浓度为5.0、10.0、20.0、50.0和100.0 ng/mL。移取各浓度标准品200 μL于2 mL EP管,加入20 μL 25(OH)D₂-d₆、25(OH)D₃-d₆混合内标液,涡旋30 s,加400 μL乙醇涡旋1 min,再加1000 μL正己烷涡旋20 min,高速离心10 min,取上清液吹至近干,用100 μL乙腈复溶后进样分析。

1.3 观察指标与评判标准

线性:对准备好的不同浓度标准品按正常样本处理程序处理后进样分析,计算含量,观察25(OH)D₂及25(OH)D₃的线性关系。

精密度:对低、中、高浓度混合新鲜血清样本分别

进行6次重复处理,检测25(OH)D₂及25(OH)D₃含量,考察批内重复性;分3批对低、中、高浓度混合新鲜血清样本进行6次重复处理,检测相关含量,考察批间重复性。

正确度:依据血清样本处理方法,对Chromsystems公司提供的、可溯源至NIST标准的校准品进行处理,以此评估该方法的正确度。

临床应用:于吉林省收集1675例健康志愿者血清样本,其中男性719例,女性956例,年龄范围覆盖0至90岁。运用建立LC-MS/MS技术,对上述血清样本中的25-羟基维生素D₂[25(OH)D₂]及25-羟基维生素D₃[25(OH)D₃]含量展开检测,并进一步剖析该群体中25-羟基维生素D[25(OH)D]含量的分布特征。

1.4 统计学分析

应用SPSS26.0软件进行统计分析,区间统计采用百分位数法取95%区间进行考察分析。

2 结果与分析

2.1 精密度验证

密度为1.25%~6.50%,批间精密度为2.00%~8.50%;标志物A在1.0~15.0 ng/mL、标志物B在8.0~120.0 ng/mL范围内线性良好,线性相关系数分别为0.9985、0.9997,校准品测试结果正确度为96.0%~100.8%,见表1。

表1 25(OH)D₃的精密性

25(OH)D ₃	批内精密度			批间精密度		
	均数 \bar{x} /(ng/mL)	<i>s</i>	变异系数 /%	\bar{x} /(ng/mL)	<i>s</i>	变异系数 /%
高值	98.10	0.55	0.88	97.30	0.88	1.56
中值	46.70	0.41	1.51	45.52	0.71	2.51
低值	4.50	0.17	1.62	4.80	0.39	4.33

2.2 临床应用

对1675名志愿者检测血清中维生素D发现,男性检查平均值为(26.40±3.65)ng/mL,女性平均值为(24.00±2.94)ng/mL,具有显著差异($P < 0.5$),见表2。

表2 不同患者检查平均值($\bar{x} \pm s$)

组别	维生素D平均值/(ng/mL)
男性($n=719$)	26.40±3.65
女性($n=956$)	24.00±2.94
<i>t</i>	14.897
<i>P</i>	< 0.001

3 讨论与结论

维生素D作为一种脂溶性维生素,在维持人体钙磷代谢平衡、促进骨骼健康发育以及调节免疫系统功能等多个方面发挥着不可或缺的作用。其中,25(OH)D₃是维生素D在体内的活性代谢产物,其生物活性较高,能够直接参

与细胞内的信号传导通路,对钙磷代谢进行精准调控^[5]。然而,25(OH)D₃在体内的半衰期较短,这一特性使得在临床检测中难以对其进行精确的定量分析,增加了评估人体维生素D营养状态的难度。在此情况下,25(OH)D₃凭借其相对较长的半衰期和在血液中相对稳定的浓度,成为目前国际上公认的衡量维生素D营养状态的最佳指标^[6]。它在体内的含量变化能够较为准确地反映人体维生素D的摄入、合成以及代谢情况,为临床诊断和治疗提供了重要的参考依据。

现有的一些检测手段,尤其是免疫学方法,存在着显著的局限性。以酶联免疫吸附试验(ELISA)为代表的免疫学方法,虽然具有操作简便、检测速度快等优点,但在检测25(OH)D时,无法准确区分25(OH)D₂和25(OH)D₃这两种不同形式的维生素D代谢产物^[7]。这是因为免疫学方法主要依赖抗原-抗体之间的特异性结合反应,而

25(OH)D₂和25(OH)D₃在结构上具有一定的相似性,容易导致交叉反应的发生,从而影响检测结果的准确性^[8]。此外,大量临床研究表明,酶联免疫法在检测过程中还可能出现低估维生素D缺乏问题的情况^[9]。这是由于该方法的检测灵敏度有限,对于一些维生素D水平处于临界值附近的样本,可能无法准确判断其是否缺乏维生素D,进而延误了临床诊断和治疗的时机。同时准确检测25(OH)D对于全面评估人体维生素D营养状态、制定精准的治疗方案具有重要的临床意义。本研究旨在建立一种高效、准确的检测方法,以满足临床需求^[10]。通过运用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS),结合先进的样品前处理技术,包括乙醇沉淀蛋白、正己烷液液萃取目标组分以及乙腈复溶等步骤,对血清中的25(OH)D进行了精准检测^[11]。

在方法学验证过程中,对不同浓度标准品的线性范围进行了系统考察,结果显示,密度为1.25%~6.50%,批间精密密度为2.00%~8.50%;标志物A在1.0~15.0 ng/mL、标志物B在8.0~120.0 ng/mL范围内线性良好,线性相关系数分别为0.9985、0.9997,校准品测试结果正确度为96.0%~100.8%。这表明该方法在上述浓度范围内具有较高的准确性和可靠性,能够为临床检测提供稳定的检测结果。同时,对方法的精密度进行了评估,批内精密密度、批间精密密度数据充分证明了该方法在重复性方面表现出色,能够有效减少检测误差,确保检测结果的一致性。此外,通过采用Chromsystems公司提供的可溯源至美国国家标准及技术研究所(NIST)标准的校准品进行验证,该方法的正确度范围为95.5%~101.2%,符合临床检测的严格要求,进一步验证了其准确性和可靠性。

在对1675名志愿者检测发现,男性维生素D检查平均值与女性相比,具有显著差异($P < 0.05$)。这一结果提示在评估维生素D营养状态时,需要考虑性别因素对25(OH)D₃水平的影响。将本研究检测健康人群的结果与国内外大量文献报道进行对比分析,发现二者具有较高的一致性,这进一步证实了本研究方法的可靠性^[12]。依据目前国际上广泛认可的维生素D缺乏(< 20 ng/mL)和不足(20~30 ng/mL)的标准,对本研究中的健康人群进行评估后发现,部分人群存在维生素D缺乏或不足的情况^[13]。这一结果警示临床医生,应重视对这部分人群的维生素D补充干预,以预防因维生素D缺乏而引发的一系列健康问题,如骨质疏松症、心血管疾病、自身免疫性疾病等^[14]。

综上所述,本研究建立的LC-MS/MS检测血清25(OH)D含量的方法,具有高敏感性、结果准确稳定的显著优势。该方法能够有效避免传统检测方法的局限性,保证血清样本测试的正确性,为临床医生提供可靠的检测

数据,有助于其做出更加准确的诊断和制定个性化的治疗方案。

参考文献

- [1] 卢山,董辉苒,任文华,等. 自动化磁珠法标本制备联合液相色谱串联质谱检测人血清中25-羟基维生素D的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(10): 1234-1237, 1243.
- [2] 王玉起,蒋兆年,刘利锋,等. 血清25-羟基维生素D在慢性乙型肝炎患者中检测的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(4): 572-576.
- [3] 刘佳星,谷妍,刘杨,等. 血清总25-羟基维生素D胶乳免疫比浊法检测的方法学评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(12): 2157-2161.
- [4] 李思燃,付志成,张惠迪,等. 液相色谱-串联质谱法和酶联免疫法检测人血清中25-羟基维生素D的一致性评价[J]. 卫生研究, 2020, 49(3): 447-452, 457.
- [5] 龚美亮,李晓霞,陈瑞,等. 免疫分析系统与液相色谱串联质谱检测25-羟基维生素D的一致性评价[J]. 中国医学装备, 2021, 18(5): 30-33.
- [6] 龚美亮,陈瑞,李晓霞,等. 两种全自动免疫分析系统检测25-羟基维生素D的一致性评价[J]. 解放军医学院学报, 2021, 42(3): 282-285.
- [7] 韩枫,王雨昕,李敬光,等. 柱前衍生-稳定同位素标记-超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法测定血清中25-羟基维生素D[J]. 卫生研究, 2023, 52(1): 129-135.
- [8] 尹丹阳,胡佳薇,赵静璐,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定血清中25-羟基维生素D和维生素K₁[J]. 卫生研究, 2020, 49(4): 597-602.
- [9] 赵柯,任伟丹,刘玉霞,等. 液相色谱串联质谱法和电化学发光免疫分析法检测25-羟基维生素D的一致性评价[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(24): 3050-3053, 3058.
- [10] 潘晓芳,黄燕虹,黄浩然,等. 液相色谱-串联质谱法测定25-羟基维生素D[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(6): 1010-1014.
- [11] 刘晓敏,赵明奇,陈海洋,等. 25-羟基维生素D对儿童甲型流感病毒感染的免疫调节作用[J]. 热带医学杂志, 2022, 22(2): 251-255.
- [12] 赫连曼,刘敏,李玲,等. 原发性高血压患者25-羟基维生素D水平与血浆肾素浓度及血尿酸的相关性研究[J]. 医药论坛杂志, 2020, 41(7): 37-41, 45.
- [13] 黄君华,崔自明,张书婉,等. 完全性川崎病患儿血清25-羟基维生素D水平检测对预测IVIG抵抗的价值研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 28-32.
- [14] 黄蕾,南楠,刘爱萍,等. 甘肃省0~6岁儿童血清25-羟基维生素D水平[J]. 中国学校卫生, 2021, 42(12): 1803-1806.