

使用安捷伦三重四极杆液质联用系统和自动化在线样品净化技术快速分析血清中的 25-羟基维生素 D

应用简报

临床研究

作者

Rory Doyle、Andre Szczesniewski 和
Kevin McCann
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA USA

摘要

通过将 Agilent 1260 Infinity 液相色谱与带安捷伦喷射流离子聚焦技术 (AJS) 的 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪联用, 建立了一种对血清中 25-羟基维生素 D 进行准确、高灵敏度且高重现定量的快速可靠的 LC/MS 研究方法。样品前处理只需要进行简单的液液萃取。自动化在线样品净化技术进一步减少了基质干扰和离子抑制, 在不增加人工样品处理的情况下提高了定量准确度。本方法在 1 到 250 ng/mL 范围内呈良好线性, 分析时间仅为 5 分钟, 日间精度低于 10%。



Agilent Technologies

前言

维生素 D 有两种活性形式：D2 和 D3，每种形式的代谢都相似，即形成 25-羟基维生素 D (25-OH D)。血液中的 25-OH D2 和 D3 都需要测量，它们通常被统称为维生素 D 或 25-OH D。为了准确定量 25-OH D 的水平，区分这两种代谢物非常重要。由于 LC/MS 具有准确区分这两种代谢物的能力，因此被选为该代谢物的分析研究方法。

本应用简报报导了一种采用配备了安捷伦喷射流离子聚焦技术 (AJS) 的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统对血清中 25-OH 维生素 D2 和 D3 进行快速、高灵敏度而准确的测定方法。采用简单的液液萃取样品前处理和自动化在线样品净化技术，有效减少了基质效应和离子抑制，在对大量血清样品测定过程中未见干扰。

实验部分

试剂和标样

25-OH D2、25 OH D3 及其氘代内标（购自 IsoSciences）的储备液用甲醇（购自 Honeywell）配制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。用这些储备液和空白血清配制成 1、25、75、125 和 250 ng/mL 的校正标准（注意：空白血清中含内源性维生素 D 代谢物。为了得到低于该内源性水平的校正浓度，用 5% 牛血清白蛋白对空白血清进行稀释）。氘代 25-OH D2 和 D3 内标用甲醇稀释到 1000 ng/mL 。

自动化在线样品净化

本方法所用的 HPLC 采用两个二元泵进行自动化样品净化（图 1）。将样品上样到捕集柱上，分析物将保留在柱里，然后使用第一个泵进行冲洗。冲洗液流入废液容器，减少了进入质谱仪的基质质量。在分析物即将从捕集柱中洗脱之时切换阀，使洗脱的分析物进入分析柱，然后通过第二个二元泵进行色谱分离。

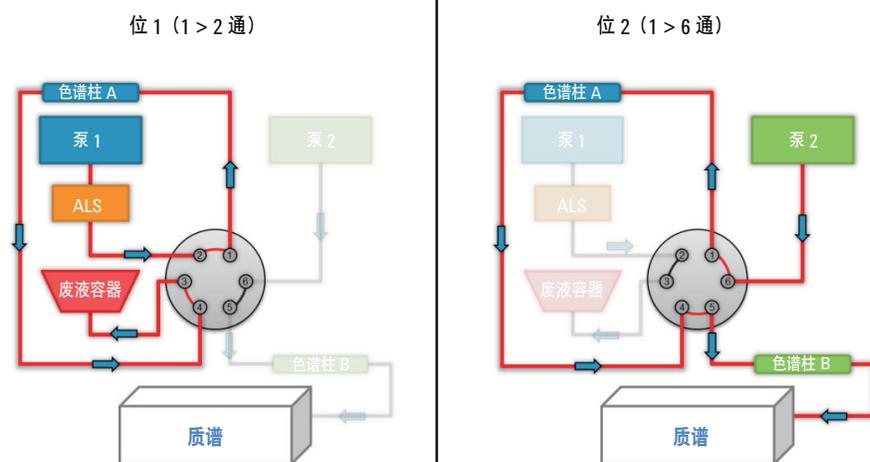


图 1. 自动化在线样品净化的液相色谱配置

液相色谱配置和条件

| 配置 | |
|--|---|
| 2 x Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B) | |
| 1 x 高性能自动进样器 (G1367E) | |
| 1 x 进样器温控器 (G1330B) | |
| 1 x 柱温箱 (G1316C, 带选项 058) | |
| 1 x 2 位/6 通阀头 (G4231A) | |
| 捕集柱 | Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 保护柱, 2.1 × 12.5 mm, 5 μm |
| 分析柱 | Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm |
| 柱温 | 50 °C |
| 进样量 | 10 μL |
| 针头冲洗 | 冲洗口, 50:25:25 IPA:甲醇:H ₂ O, 5 秒 |
| 流动相 A | H ₂ O + 0.1 % 甲酸 |
| 流动相 B | MeOH + 0.1 % 甲酸 |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 停止时间 | 5.0 分钟 |

| 载样 (泵 1) 梯度 | | 洗脱 (泵 2) 梯度 | | 阀切换时间 | |
|-------------|-----|-------------|-----|----------|----|
| 时间 | B % | 时间 | B % | 时间 (min) | 位置 |
| 0.00 | 50 | 0.00 | 85 | 0.00 | 1 |
| 1.00 | 90 | 3.20 | 85 | 1.90 | 2 |
| 2.30 | 90 | 3.21 | 98 | 2.30 | 1 |
| 2.31 | 98 | 3.80 | 98 | | |
| 3.30 | 98 | 3.81 | 85 | | |
| 3.31 | 50 | | | | |

MS/MS 配置和条件

| 配置 | |
|--|----------|
| 配置安捷伦喷射流离子聚焦技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 | |
| 离子模式 | 正离子 |
| 干燥气温度 | 250 °C |
| 干燥气流量 | 5 L/min |
| 雾化器压力 | 45 psi |
| 鞘气温度 | 325 °C |
| 鞘气流量 | 11 L/min |
| 毛细管电压 | 5000 V |
| ΔEMV | 200 V |
| 喷嘴电压 | 1500 V |

| MRM transitions | | | | | |
|-----------------|-------|-------|----------|-----------|----------|
| 化合物 | 母离子 | 子离子 | 裂解电压 (V) | 驻留时间 (毫秒) | 碰撞能量 (V) |
| 25-OH 维生素 D3 | 401.3 | 383.2 | 106 | 50 | 4 |
| 25-OH 维生素 D3 | 401.3 | 365.3 | 106 | 50 | 4 |
| 25-OH 维生素 D2 | 413.3 | 395.3 | 106 | 50 | 4 |
| 25-OH 维生素 D2 | 413.3 | 355.2 | 106 | 50 | 4 |
| 25-OH 维生素 D3-d3 | 404.3 | 386.3 | 106 | 50 | 4 |
| 25-OH 维生素 D2-d3 | 416.4 | 398.3 | 106 | 50 | 4 |

样品前处理

血清样品进行简单的液液萃取:

1. 加入 15 μL 1000 ng/mL 内标溶液、150 μL 血清和 150 μL 乙腈
2. 涡旋混合 30 秒, 然后在室温下静置 15 分钟
3. 加入 750 μL 庚烷, 再涡旋混合 30 秒
4. 以 13000 rpm 的转速离心 5 分钟
5. 将有机相 (上层) 转移到干净的试管中
6. 室温下用氮气吹干
7. 用 200 μL 75:25 甲醇:0.1% 甲酸的水溶液复溶

结果与讨论

实现了5分钟内25-OH D2和D3的快速分析(图2)。采用1ng/mL、25ng/mL、75ng/mL、125ng/mL和250 ng/mL浓度的25-OH维生素D2和D3建立校正曲线。图3显示了两种分析物获得的良好线性, R^2 值 ≥ 0.995 。标准参比物中两种维生素D代谢物的日间定量变异系数(CV)良好,未超过10%(表3)。

表3. 各浓度25-OH维生素D2和D3的CV值

| ng/mL | D2 | D3 |
|-------|-----|-----|
| 10 | 2.8 | 3.3 |
| 30 | 2.7 | 2.7 |
| 70 | 8.0 | 7.8 |

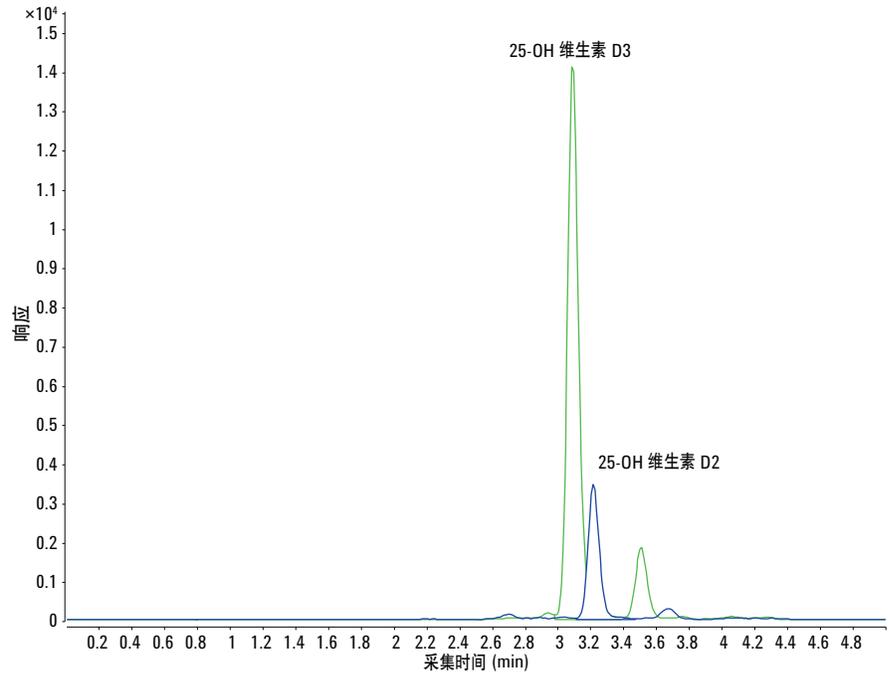


图2. 25-OH 维生素 D2 和 D3 的色谱图

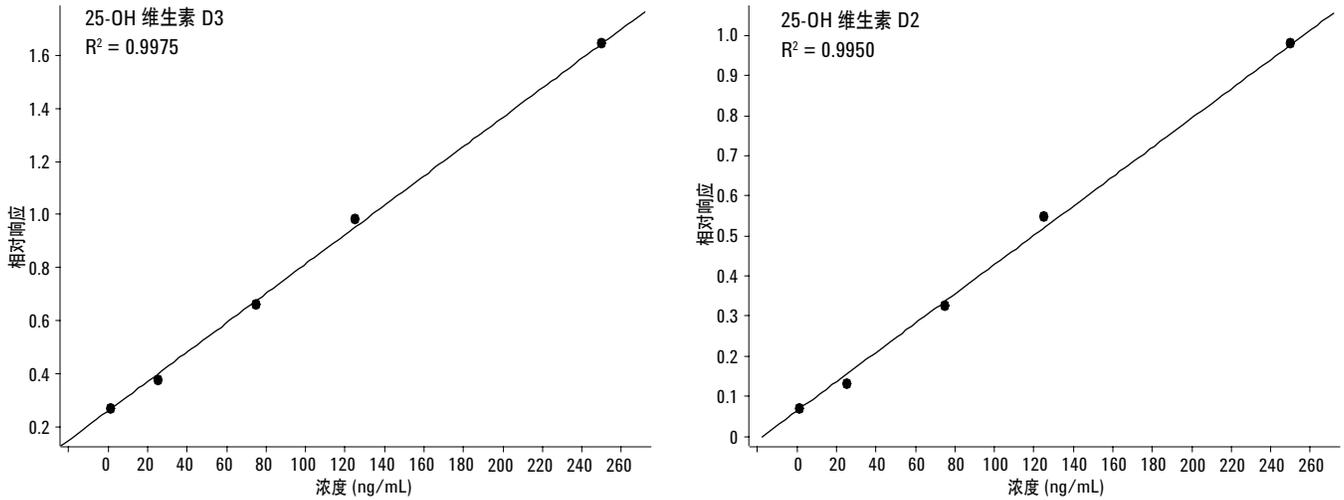


图3. 25-OH 维生素 D2 和 D3 在1ng/mL到250 ng/mL浓度范围内的校正曲线

结论

使用 6460 三重四极杆 LC/MS 建立了一种快速可靠的检测血清中 25-OH 维生素 D2 和 D3 高准确性、高灵敏度和高重现的方法，在 1 ng/mL 到 250 ng/mL 范围内线性良好。简单的液液萃取，然后进行自动化在线样品净化，最大限度地减少了血清中脂类和其它生物化合物造成的基质效应和离子抑制。短短 5 分钟内即可完成分析。

www.agilent.com/chem/QQQ

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

本资料仅限研究使用，不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技公司，2013
2013年3月8日，中国印刷
5991-2035CHCN



Agilent Technologies