

# Экспресс-анализ 25-ОН витамина D в плазме с использованием трехквадрупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent с автоматической онлайн-очисткой проб

## Методическая информация

Клинические исследования

### Авторы

Рори Дойл, Андрэ Шчесниевски  
и Кевин Маккэнн  
Agilent Technologies, Inc.  
Санта-Клара, штат Калифорния, США

### Аннотация

Быстрый и надежный метод исследований ВЭЖХ-МС для точного, чувствительного и воспроизводимого количественного анализа 25-ОН витамина D в плазме разработан при использовании системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity, совмещенной с трехквадрупольным масс-спектрометром Agilent 6460 с технологией Agilent JetStream (AJS). Пробоподготовка заключается в простой жидкость-жидкостной экстракции. Автоматическая онлайн-очистка проб позволяет дополнительно уменьшить влияние посторонних компонентов пробы и ионную супрессию, что повышает качество количественного анализа без необходимости дополнительной ручной обработки проб. Превосходная линейность наблюдается в диапазоне концентраций от 1 до 250 нг/мл, при этом время анализа составляет всего 5 минут, а внутрилабораторная прецизионность существенно ниже 10%.



**Agilent Technologies**

## Введение

Витамин D существует в двух формах (D2 и D3), каждая из которых в ходе схожего процесса метаболизма превращается в 25-гидроксивитамин D (25-ОН D). Содержание обоих 25-гидроксивитаминов, D2 и D3, определяется в крови, и их часто объединяют общим названием витамин D или 25-ОН D. Для правильного количественного определения уровня 25-ОН D важно различать эти метаболиты. Возможность точно различить эти метаболиты и привела к признанию ЖХ-МС как основной методики выполнения анализа.

Приведенная здесь методическая информация описывает метод быстрого, чувствительного и точного определения 25-гидроксивитамина D2 и D3 в плазме с помощью трехквартупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent 6460 с технологией Agilent JetStream (AJS). Пробоподготовка с применением простой жидкость-жидкостной экстракции и автоматическая онлайн-очистка проб позволяют уменьшить воздействие посторонних компонентов пробы и ионную супрессию. При этом в ходе анализа большого количества проб плазмы помех выявлено не было.

## Экспериментальная часть

### Реагенты и стандартные растворы

Основные стандартные растворы 25-ОН D2, 25-ОН D3 и их дейтерированные внутренние стандарты (от компании IsoSciences) приготовили в метаноле (компании Honeywell) в концентрации 10 мкг/мл и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Растворы калибровочных стандартов приготовили из этих основных стандартных растворов в смешанной плазме в концентрации 1, 25, 75, 125 и 250 нг/мл. (Примечание: смешанная плазма содержит эндогенный уровень метаболитов витамина D. Для того чтобы содержание витамина в калибровочных пробах было меньше эндогенного уровня, смешанную плазму разбавили 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина.) Дейтерированные внутренние стандарты 25-ОН D2 и D3 разбавили метанолом до концентрации 1 000 нг/мл.

### Автоматическая онлайн-очистка проб

Используемая в данном методе система ВЭЖХ была оснащена автоматической системой очистки проб при помощи двух бинарных насосов (рис. 1). Пробы загружались в улавливающую колонку, в которой определяемые вещества удерживались и промывались с помощью первого насоса. Промывочная жидкость выводилась в отходы, в результате чего сокращалось попадание посторонних компонентов пробы в масс-спектрометр. Незадолго до элюирования определяемых веществ из улавливающей колонки кран переключали и аналиты элюировались в аналитическую колонку, в которой с помощью второго бинарного насоса выполняли дальнейшее хроматографирование.

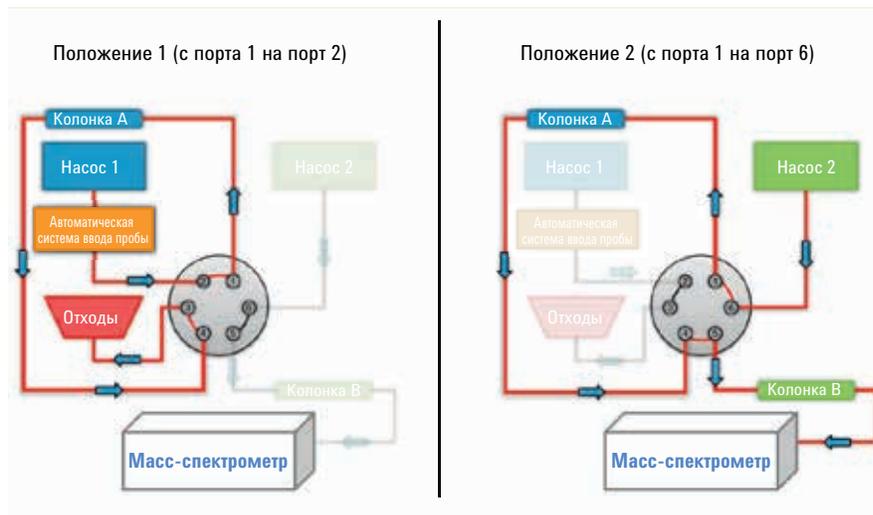


Рис. 1. Конфигурация ВЭЖХ для автоматической онлайн-очистки проб

## Конфигурация ВЭЖХ и условия

Конфигурация	
2	бинарных насоса Agilent 1260 Infinity (G1312B)
1	высокопроизводительный пробоотборник с лунками (G1367E)
1	термостат пробоотборника (G1330B)
1	термостатированный отсек для колонок (G1316C с доп. функцией № 058)
1	головка 2-позиционного/6-портового крана (G4231A)
Улавливающая колонка	предколонка Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1×12,5 мм, 5 мкм
Аналитическая колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1×50 мм, 2,7 мкм
Температура колонки	50 °С
Объем ввода	10 мкл
Промывка иглы	через порт для промывки, смесь изопропанола, метанола и воды в соотношении 50:25:25, в течение 5 секунд
Подвижная фаза А	H <sub>2</sub> O + 0,1% раствор муравьиной кислоты
Подвижная фаза В	метанол + 0,1% раствор муравьиной кислоты
Скорость потока подвижной фазы	0,5 мл/мин
Время элюирования	5,0 мин

Загрузочный градиент (насос 1)		Элюирующий градиент (насос 2)		Время работы крана	
Время	В%	Время	В%	Время (мин)	Положение
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				

## Конфигурация МС-МС и условия

Конфигурация	
Трехквadrупольная система ВЭЖХ-МС Agilent 6460 с технологией Agilent JetStream	
Режим ионизации	Положительно заряженные ионы
Температура газа-осушителя	250 °С
Расход газа-осушителя	5 л/мин
Давление в распылителе	45 psi
Температура газа периферийного слоя	325 °С
Расход газа периферийного слоя	11 л/мин
Напряжение на входе в капилляр	5 000 В
Напряжение умножителя	200 В
Напряжение на сопле распылителя	1 500 В

MRM-переходы					
Соединение	Ион-пред-шественик	Продукт	Фрагм. (В)	Время регистрации 1 перехода (мс)	Эн. соудар. (В)
25-ОН витамин D3	401,3	383,2	106	50	4
25-ОН витамин D3	401,3	365,3	106	50	4
25-ОН витамин D2	413,3	395,3	106	50	4
25-ОН витамин D2	413,3	355,2	106	50	4
25-ОН витамин D3-d3	404,3	386,3	106	50	4
25-ОН витамин D2-d3	416,4	398,3	106	50	4

## Пробоподготовка

Пробы плазмы подготавливали с помощью простой жидкость-жидкостной экстракции.

1. Соединили 15 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 1 000 нг/мл, 150 мкл плазмы и 150 мкл ацетонитрила.
2. Перемешивали на вортексе в течение 30 секунд и оставили на 15 минут при комнатной температуре.
3. Добавили 750 мкл гептана и перемешивали в течение 30 секунд.
4. Центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 минут.
5. Перенесли органический (верхний) слой в чистую пробирку.
6. Выпарили при комнатной температуре до сухого остатка в атмосфере азота.
7. Сухой остаток развели в 200 мкл смеси метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты (в соотношении 75:25).

## Результаты и обсуждение

Экспресс-анализ 25-ОН D2 и D3 выполняется за менее чем 5 минут (рис. 2). Калибровочные кривые были построены для 25-гидроксивитамина D2 и D3 с использованием концентраций 1, 25, 75, 125 и 250 нг/мл. Рис. 3 иллюстрирует превосходную линейность, полученную для этих определяемых веществ, при этом значения  $R^2$  составляют не меньше 0,995. Коэффициент вариации результатов, полученных в разные дни, при количественном анализе этих метаболитов витамина D в стандартных эталонных образцах также является превосходным и не превышает 10% (табл. 3).

Таблица 3. Коэффициенты вариации для различных концентраций 25-ОН витамина D2 и D3

нг/мл	D2	D3
10	2,8	3,3
30	2,7	2,7
70	8,0	7,8

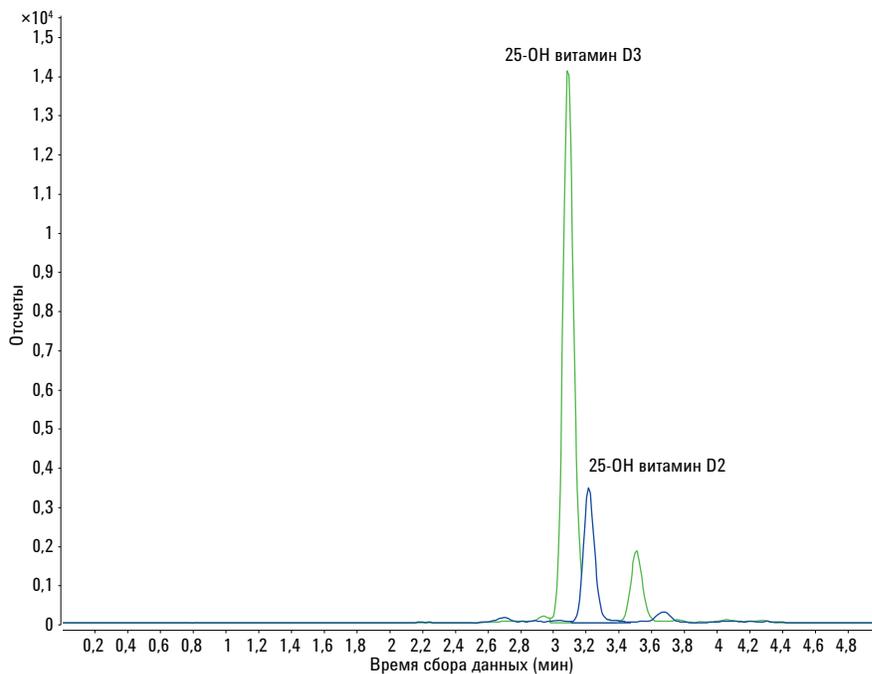


Рис. 2. Хроматограмма 25-ОН витамина D2 и D3

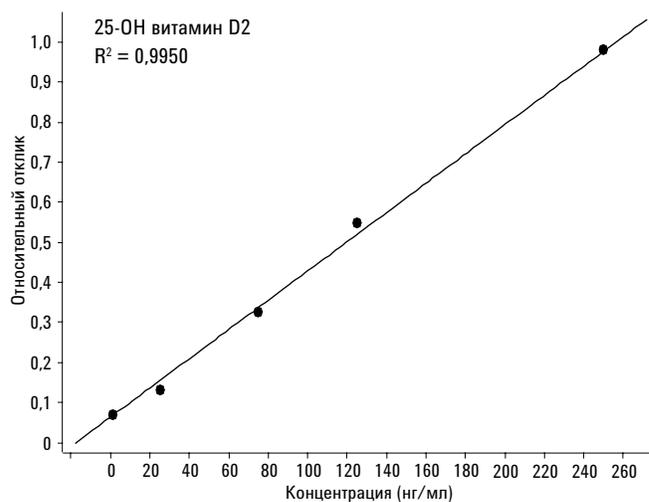
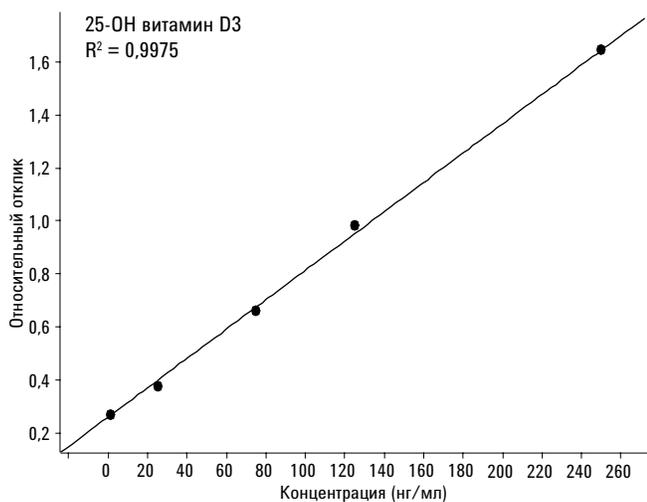


Рис. 3. Калибровочные кривые 25-ОН витамина D2 и D3 при концентрации от 1 до 250 нг/мл

## **Выводы**

Разработан быстрый и надежный метод точного, чувствительного и воспроизводимого анализа 25-гидроксивитамина D2 и D3 в плазме с использованием трехквартупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent 6460. Отличная линейность продемонстрирована при концентрации от 1 до 250 нг/мл. Простая жидкость-жидкостная экстракция, а затем автоматическая онлайн-очистка проб снижают до минимума воздействие посторонних компонентов пробы и ионную супрессию, вызванных наличием в плазме липидов и прочих биологических соединений. Для выполнения анализа требуется менее 5 минут.

[www.agilent.com/chem/QQQ](http://www.agilent.com/chem/QQQ)

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

Только для ознакомительных целей. Не для использования при диагностических процедурах.

© Agilent Technologies, Inc., 2013  
Напечатано в США 8 марта 2013 г.  
5991-2035RU



**Agilent Technologies**