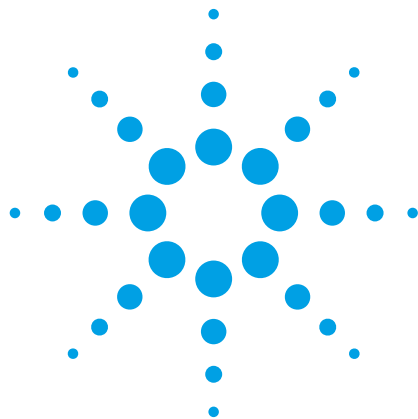




使用三重串联四极杆液-质联用仪快速检测血清中的维生素 D

应用指南

作者

M.P. George
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA USA

Andre Szczesniewski
安捷伦科技有限公司
Schaumburg, Illinois USA

摘要

基于安捷伦 1200 高分离快速液相色谱(RRLC)/组合离子源的 6430A 三重串联四极杆液质联用系统开发了血清中 25-OH D₂ 和 25-OH D₃ 的快速定量分析法。固相萃取最大限度降低了基质干扰和离子抑制，同时还能自动化运行。

在 5 至 100 ng / mL 的浓度范围内具有优异的定量线性度响应($R^2 > 0.99$)，而且分析时间只有五分钟，日间精密度的远远低于 10%。血清中的检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别是 2 ng/mL 和 3 ng/mL。

前言

维生素 D 通过促进食物中钙、磷在肠道中的吸收和肾脏中钙、磷的重吸收来调节血液中的钙、磷水平，维持骨骼的正常矿化。这对骨骼的生长重塑是非常必要的。近年研究发现维生素 D 对癌症和心血管病能够起到预防作用，促使人们重新开始关注血清中维生素 D 水平的监测。已有研究表明维生素 D 能够于体内 (in vivo) 和体外 (in vitro) 诱导肿瘤细胞死亡。流行病学研究的荟萃分析 (Meta-analysis) 表明，维生素 D 的摄入和癌症的预防呈正相关，每天多摄入 1000 国际单位 (25 毫克) 维生素 D，可以使结肠癌的风险降低 50%，乳腺癌和卵巢癌的风险降低 30% [1]。有证据表明，维生素 D 缺乏与高血压和增加心血管疾病风险之间具有相关性，最近的一项研究表明，血清低水平维生素 D (<17.8 ng/mL) 与较高的外周动脉疾病 (PAD) 发病率存在关联 (2)。

维生素 D 在皮肤里以 D₃ 的形式生成，植物中生成的是 D₂，这也是许多营养性补品中维生素 D 的存在形式。上述形式的维生素 D 经肝脏代谢生成其活化形式 25-羟基衍生物。通常研究中检测的血清维生素 D 水平实际上就是血清中 25-羟基维生素 D₂ 或 25-羟基维生素 D₃ 的水平。能否检测出循环中总的维生素 D (D₂ 和 D₃) 对检测方法来说是至关重要的。传统方法采用竞争结合试验和免疫测定法来检测维生素 D。但这些方法中抗体的交叉反应性通常不到 100%，因此其结果可能无法反映总的 D₂ 和 D₃。最新的液-质分析技术由于能可靠地定量检测两种维生素 D 而得到广泛应用。



Agilent Technologies

本应用指南介绍了安捷伦三重串联四极杆液质联用系统使用组合离子源在同时离子化模式下快速、敏感、准确地检测血清中的维生素 D 的方法。固相萃取样品制备方法的使用减少了基质效应和离子抑制，在大量血清样品分析中均未检测到干扰，而组合离子源的使用也使分析过程中样品的降解减至最低。

实验部分

试剂和标准品

用甲醇 (Fisher Scientific) 配制 10 µg/mL 的 25-OH D₂、25-OH D₃ 和氘代 25-OH D₃ (Sigma and Medical Isotopes) 贮存液并储存在 15°C 以下的环境中。用含 5% 牛血清蛋白的溶液制备 5, 10, 25, 50 和 100 ng/mL 的不同浓度的标准溶液，用去离子水制备 400 ng/mL 的氘代 25-OH D₃ 溶液作为内标。

仪器

本方法使用安捷伦 1200 高分离快速液相色谱仪和安捷伦 6430 三重串联四极杆液质联用仪。仪器参数详见表 1。

样品前处理

用 Biochemical Diagnostics GV-65C 固相萃取柱处理血清样品，具体的步骤如下：

1. 在 250 µL 血清样品中加入 1 mL 含 2% 甲酸的乙腈 (Fisher Scientific)，静置 15 min
2. 将固相萃取柱安装在固相萃取用的真空架上
3. 3,000 RPM 离心 10 min
4. 顺序用 1 x 1 mL 甲醇, 1 x 1 mL 甲醇:去离子水(50:50)淋洗固相萃取柱, 自然重力流出

表 1. 液相色谱和质谱的参数

液相色谱运行参数	
色谱柱	Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm (P/N)
柱温	50°C
进样体积	5 µL
自动进样器温度	6°C
进样针洗针	洗针座 (50:25:25 H ₂ O, IPA:MeOH:H ₂ O, 5 sec)
流动相	A = 0.1% 甲酸水溶液 B = 0.1% 甲酸的甲醇溶液
流速	0.5 mL/min
梯度分析	A=13%; B=87%
分析时间	3.0 min
质谱参数	
离子化模式	正离子模式, ESI+APCI 组合离子源
干燥气温度	250°C
雾化器温度	170°C
干燥气流速	5 L/min
喷雾器压力	60 psi
毛细管电压	4000 V
电晕电流	2 µA
放电电压	2000 V
MRM 采集	Q1 峰和 Q2 峰 宽度= 0.70 m/z
Delta EMV	200 V

5. 将离心管的上清液转移至预活化的固相萃取柱上
6. 顺序用 1x1 mL 甲醇:水(50:50), 1x1 mL 甲醇:水(75:25)淋洗固相萃取柱, 自然重力流出
7. 开启真空 30 sec, 然后每个柱子加 200 µL 正庚烷 (Scientific Products), 静置 2 min, 然后将真空开至最大 5-7 min
8. 在自然重力的条件下, 用 250 µL 甲醇洗脱 2 min, 然后加 250 µL 去离子水洗脱

分析参数

维生素 D₂ 和 D₃, 以及氘代内标的分析条件和参数见表 2。

表 2. 分析参数

化合物	保留时间 (min)	MRM Transition	碰撞电压	离子驻留时间 (msec)	碰撞能量 (eV)
25-羟基维生素 D ₃	0.99	401.3 > 383.3	100	150	3
25-羟基维生素 D ₂	1.12	413.3 > 395.3	100	150	3
内标-25-羟基维生素 D ₃ -d6	0.98	407.3 > 389.3	100	150	3

结果与讨论

固相萃取

几种样品制备方法可用于血浆和血清中维生素 D 的分析。然而，液-液萃取方法需要干燥和再溶解的步骤以适于液相色谱分析。多路复用 (Multiplexed)，离线固相萃取方法更简单而且具有更高的通量。这里使用的方法降低了基质效应和离子抑制，得到的色谱图只有维生素 D₂ 和 D₃ 两个主要的峰 (图 1)。

准确、重复性好的定量方法

使用浓度分别为 5, 10, 25, 50 和 100 ng/mL 的 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 的溶液获得标准曲线。图 2 显示出这两种的维生素 D 的标准曲线的线性很好，相关系数接近 1.000。根据不同批次试验标准曲线定量得到的结果，日间变异系数 (标准偏差) 可以低至 1.7%，并且都在 10% 以内 (见表 3)。

对于真实的样品也具有高灵敏度

我们采用预先经另一种液质分析法进行定量的 66 个新鲜血清样品对该方法进行了验证。定量的结果与先前方法结果的相关性相当不错，相关系数为 0.979。两种维生素 D 的检测限和定量限分别为 2 ng / mL 和 3 ng / mL，并且所有的样品都未发现明显的干扰峰。应当指出，本文中介绍的这种方法目前还没有成为维生素 D 的诊断学检测方案。对新鲜血清样品的检测，证明了这种方法在维生素 D 检测和定量分析中的卓越能力。

具有最低干扰和基质效应的
维生素 D₂ and D₃ 解析

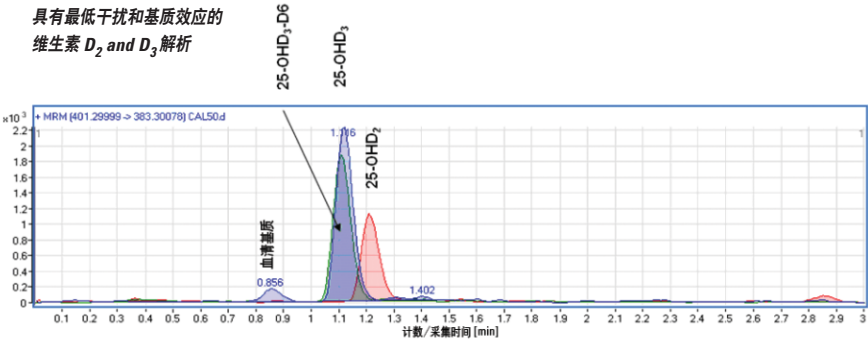


图 1. 含有维生素 D2 和 D3 以及内标物的典型血清样本的总离子流图谱

5 至 100 ng/mL 范围维生素 D₂ 和 D₃ 的准确定量分析

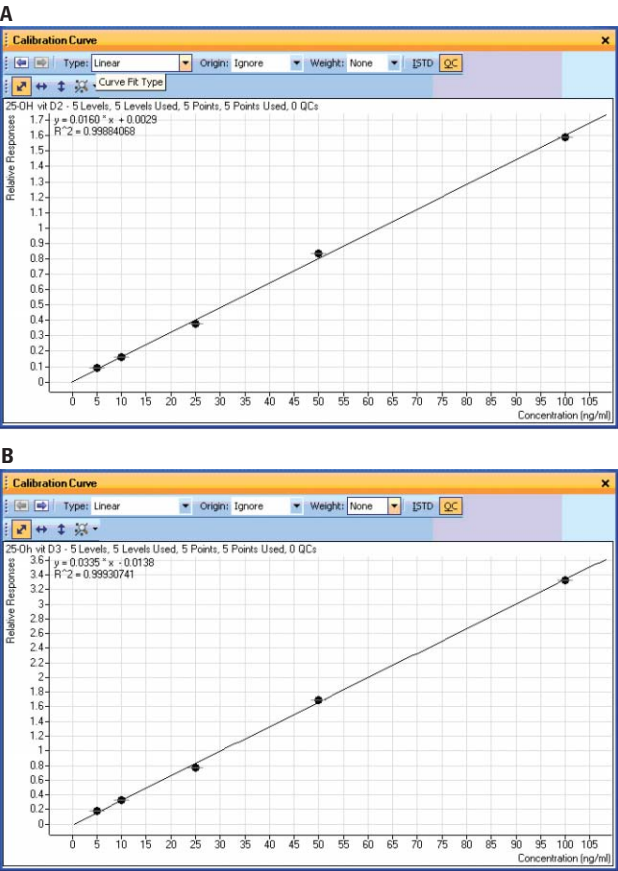


图 2. 含 5% 牛血清溶液中的 25-羟基 D₂ (A) 和 25-羟基 H-D₃ (B) 的标准曲线

表 3. 正交试验定量分析结果的准确度 (变异系数)

浓度 (ng/mL)	25-羟基 D ₂ (%)	25-羟基 D ₃ (%)
5	7.03	6.74
10	5.73	3.18
25	4.46	3.53
50	3.81	3.34
100	2.04	1.70

结论

本文阐释了应用三重串联四极杆液质联用仪检测血清中 25-羟基维生素 D₂ /D₃ 的准确、灵敏可重复的定量分析方法。检测限为 2 ng / mL 和定量限为 3ng/mL。固相萃取样品制备方法能够将基质效应和由脂类和血清中其他化合物导致的离子抑制效应降至最低。在同步 ESI-APCI 模式下使用组合离子源最大限度地减少了样本降解（25-羟基团断裂）。分析时间不到 5 分钟，而且可以使用标准的固相样品制备自动化系统实现自动操作。

致谢

作者衷心感谢 Biochemical Diagnostics（提供固相萃取柱），梅奥诊所（明尼苏达州罗彻斯特市）的 Frank Crow, David Barnidge, Ravinder Singh and James Bruton 提供用于方法验证的 66 个样品。

参考文献

1. E. D. Gorham, Garland F. C., C. F. Garland, W. B. Grant, S. B. Mohr, M. Lipkin, H. L. Newmark, E. Giovannucci, M. Wei, M. F. Holick. "Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis", *Am J Prev Med.* **32**, 210-216 (2007).
2. M. L. Melamed, P. Muntner, E. D. Michos, J. Uribarri, C. Weber, J. Sharma, P. Raggi. "Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Prevalence of Peripheral Arterial Disease. Results from NHANES 2001 to 2004". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1179-1185 (2008).

www.agilent.com/chem/qqq

本研究只适用于研究目的而不用于诊断。本文中的信息，描述和指标如有更改恕不另行通知。

安捷伦对本文中可能存在的错误或由于使用本文产生的间接损害不承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2009
2009 年 9 月 14 日 中国印刷
5990-4549 CHCN



Agilent Technologies