



# 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 分析生物样品中的维生素 D 代谢物

## 应用简报

临床研究

### 作者

Derick Lucas 和 Limian Zhao  
安捷伦科技公司

### 摘要

生物样品中的脂类会对 25-羟基维生素 D2 和 D3 代谢物的分析产生不利影响。传统的样品前处理技术（如蛋白质沉淀）无法去除脂质干扰，而固相萃取则需要多个步骤以及方法开发。一种稳定可靠的样品前处理方法使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 进行基于 96 孔板的原位蛋白质沉淀和通过型脂质净化。创新的化学吸附剂能够选择性去除脂类，不会影响目标分析物。日内准确度和日间准确度范围为 90%-110%，且所有 QC 浓度下的精密度均 < 10% RSD。由于可实现高效脂质去除，因此该方法与蛋白质沉淀相比，其分析灵敏度和稳定性均得到显著改善，而这一改善也通过柱后注射、基质效应和磷脂分析实验得到了证实。



Agilent Technologies

## 前言

通过监测血浆和血清等生物样品中的 25-羟基维生素 D2 和 D3 (25-OH D2 和 D3) 代谢物, 对维生素 D 进行常规分析。LC/MS/MS 作为维生素 D 代谢物的分离和准确定量分析技术被业界广泛接受。虽然质谱法为目标分析物提供了高分析灵敏度和选择性, 但生物样品中含有干扰物质 (即磷脂), 如果这些物质不经去除, 可能会对分析性能产生影响。这是与蛋白质沉淀 (PPT) 等标准样品前处理方案相关的一个常见问题。固相萃取可有效去除基质干扰, 但需要多个步骤以及方法开发。

Agilent Captiva EMR-Lipid 有助于对血浆、血清和血液等杂质多的生物样品进行 PPT 和脂质净化。使用 96 孔板和 1 mL 小柱, 并包含支持原位 PPT 的溶剂保留滤芯。当洗脱液通过 EMR-Lipid 吸附剂进行净化时, 沉淀的蛋白质将被滤除。与市售脂质去除产品不同, Captiva EMR-Lipid 具有较高的抗堵塞性, 且包含一种创新的选择性化学吸附剂<sup>1</sup>。通过体积排阻和疏水相互作用的组合机制去除脂质, 提供直接用于分析的纯化洗脱液。

本应用简报介绍了如何利用 LC/MS/MS 对血清中 25-OH D2 和 D3 进行验证<sup>2</sup>。对日内及日间准确度和精密度进行评估, 确保获得稳定的方法性能。Captiva EMR-Lipid 提供了有效的原位蛋白质沉淀和洁净的萃取物, 通过基质效应、柱后注射和磷脂实验得到证实, 获得了更高的方法可靠性和稳定性。

## 液相色谱配置和参数

### 配置

|  |   |
|--|---|
| Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)          |   |
| Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) |   |
| Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)       |   |
| 分析柱  | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 液相色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (699775-902)<br>Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 保护柱, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm (821725-911) |
| 柱温   | 30 °C   |
| 进样量  | 20 μL   |
| 流动相 A  | H <sub>2</sub> O + 0.1% 甲酸  |
| 流动相 B  | 甲醇 + 0.1% 甲酸  |
| 流速   | 0.5 mL/min  |
| 梯度   | 75% B 保持 0.5 分钟,<br>在 4 分钟内升至 98% B,<br>98% B 保持 5 分钟   |
| 后运行时间  | 2 分钟  |

## MS/MS 配置和参数

### 配置

采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统

|          |          |
|----------|----------|
| MS/MS 模式 | 动态 MRM   |
| 离子模式     | 正离子      |
| 干燥气温度    | 250 °C   |
| 干燥气流速    | 5 L/min  |
| 雾化器压力    | 45 psi   |
| 鞘气温度     | 325 °C   |
| 鞘气流速     | 11 L/min |
| 毛细管电压    | 5000 V   |
| EMV      | 200 V    |
| 喷嘴电压     | 1500 V   |

| 化合物                     | 母离子   | 定量离子  | 定性离子  | 碰撞能量 (V) | 碎裂电压 (V) |
|-------------------------|-------|-------|-------|----------|----------|
| 25-OH D2                | 413.3 | 395.3 | 355.3 | 4        | 115      |
| 25-OH D2-d <sub>3</sub> | 416.3 | 398.3 | -     | 4        | 115      |
| 25-OH D3                | 401.3 | 365.3 | 383.3 | 4        | 115      |
| 25-OH D3-d <sub>3</sub> | 404.3 | 386.3 | -     | 4        | 115      |

## 实验部分

### 样品前处理

- Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔板 (5190-1000); (5190-1001, 5/包)
- Captiva 96 深孔收集盘, 1 mL (A696001000)
- Agilent CaptiVac 真空夹 (A796) 和垫圈套件 (A796G)
- Agilent Captiva 96 孔板盖, 10/包 (A8961007)
- DuoSeal 96 孔板密封垫, 10/包 (A8961008)

### 准确度和精密度验证实验

#### 化学品与试剂

人血浆、去除维生素 D 的血浆和人血清得自 Golden West Biologicals Inc。采用人血清进行方法定量研究，并采用血浆进行基质去除评估。标样和内标为 100 µg/mL 溶液的形式，购自 Sigma-Aldrich。样品前处理和液相色谱溶剂购自 Honeywell。

### 验证研究

在三个不同日期内，在一个批次中对用于维生素 D 代谢物的 Captiva EMR-Lipid 方案进行测试。批次包括两个双空白、八个空白、七个校准品和六个每种浓度下的质控 (QC) 样品 (表 1)。在两组校准曲线之间加入 QC，另外 25-OH D3 的配制浓度为 10、20、50、100、250、500 和 750 ng/mL，25-OH D2 的配制浓度为 20、30、50、100、250、500 和 750 ng/mL。加入 250 ng/mL 同位素标记的内标 25-OH D3-d<sub>3</sub> 和 25-OH D2-d<sub>3</sub>。

### 样品前处理

#### 校准品和 QC 样品配制

预加标适当浓度的校准品和 QC 样品，并充分混合。然后，将 100 µL 血清样品转移至 96 孔样品板中，并加入 10 µL 内标。用密封垫覆盖样品板，并涡旋混合。采用 96 孔板移液器进行后续的转移和吸取混合。

### Agilent Captiva EMR-Lipid 流程

1. 向 Captiva EMR-Lipid 板孔中加入 400 µL 含 1% 甲酸的乙腈
2. 将 100 µL 血清从样品板转移至用于 PPT 的 EMR-Lipid 板孔中
3. 对溶剂/血清混合物吸取和分配五次，以进行混合
4. 等待 1 分钟，使沉淀完全
5. 将 CaptiVac 真空夹插入 EMR-Lipid 板和收集盘之间，并在 1-2 英寸汞柱的真空度下启动液流。收集 96 孔收集盘中的滤液
6. 保持 1 滴/5 秒的速率，根据需要提高真空度
7. 施加 10 英寸汞柱的真空度 1 分钟，完成洗脱
8. 用板密封垫盖住收集盘，样品可直接用于分析

表 1. 样品鉴定与 QC 浓度

| 样品 ID | 定义   | 25-OH D2   | 25-OH D3   |
|-------|------|------------|------------|
|       |      | 浓度 (ng/mL) | 浓度 (ng/mL) |
| LLOQ  | 定量下限 | 10         | 20         |
| LQ    | 低 QC | 20         | 30         |
| MQ    | 中 QC | 250        | 250        |
| HQ    | 高 QC | 500        | 500        |
| ULOQ  | 定量上限 | 750        | 750        |

## 结果与讨论

### 线性

利用 MassHunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和  $1/x^2$  加权，获得的 10-750 ng/mL 范围内的 25-OH D2 和 D3 的校准曲线的  $R^2$  值介于 0.992 和 0.997 之间 (图 S1)。所有校准品的准确度均处于预期值的  $\pm 10\%$  以内。

### 准确度和精密度结果

本研究得出了出色的结果，日内汇总结果如表 2 所示，日间汇总结果如表 3 所示。所有 QC 的准确度为 90%-110%，且  $\%RSD < 10$ 。为证明 Captiva EMR-Lipid 不保留 25-OH 维生素 D，使用后加标校准曲线和预加标血清样品（不经内标校正）测定 QC 的绝对回收率。所有浓度下的绝对回收率介于 89%-106% 之间，且  $\%RSD < 15$  (表 S1)。在任何空白或双空白样品中均未检出交叉污染。

### 基质去除

在血浆等生物基质中，蛋白质和磷脂通常为最棘手的干扰物质。如前文所述，使用 1:4 含量比的样品/乙腈（含 1% 甲酸）通过原位 PPT 可有效去除蛋白质。利用多项技术对磷脂去除和离子抑制进行评估。

表 2. 对人血清中 25-OH D2 和 D3 进行方法验证得到的日内准确度和精密度 (每种 QC 浓度下  $n = 6$ )

|       | 25-OH D2 |      | 25-OH D3 |      |
|-------|----------|------|----------|------|
|       | 准确度 (%)  | %RSD | 准确度 (%)  | %RSD |
| 第 1 天 |          |      |          |      |
| LLOQ  | 97.2     | 4.7  | 106.8    | 9.9  |
| LQ    | 97.8     | 5.8  | 104.1    | 5.9  |
| MQ    | 96.0     | 5.3  | 93.4     | 2.8  |
| HQ    | 107.3    | 4.9  | 105.1    | 2.7  |
| ULOQ  | 101.9    | 2.7  | 101.5    | 3.1  |
| 第 2 天 |          |      |          |      |
| LLOQ  | 108.4    | 5.8  | 108.3    | 6.6  |
| LQ    | 101.2    | 4.8  | 99.3     | 7.4  |
| MQ    | 108.7    | 5.6  | 108.1    | 4.7  |
| HQ    | 105.4    | 3.6  | 108.7    | 2.7  |
| ULOQ  | 104.3    | 2.9  | 109.1    | 1.5  |
| 第 3 天 |          |      |          |      |
| LLOQ  | 99.1     | 5.6  | 109.4    | 8.1  |
| LQ    | 92.9     | 4.8  | 99.2     | 5.4  |
| MQ    | 105.0    | 4.6  | 104.0    | 4.0  |
| HQ    | 106.0    | 3.1  | 105.8    | 3.0  |
| ULOQ  | 105.6    | 2.7  | 109.1    | 3.7  |

表 3. 日间 QC 样品的准确度和精密度结果 ( $n = 18$ )

|      | 25-OH D2 |      | 25-OH D3 |      |
|------|----------|------|----------|------|
|      | 准确度 (%)  | %RSD | 准确度 (%)  | %RSD |
| LLOQ | 101.6    | 5.4  | 108.2    | 8.2  |
| LQ   | 97.3     | 5.1  | 100.9    | 6.2  |
| MQ   | 103.2    | 5.2  | 101.9    | 3.8  |
| HQ   | 106.2    | 3.9  | 106.5    | 2.8  |
| ULOQ | 103.9    | 2.8  | 106.6    | 2.8  |

## 利用 LC/MS/MS 监测磷脂去除

磷脂去除分析使用 MS/MS 母离子 ( $m/z = 184$ ) 扫描, 如图 1 所示。高丰度蓝色迹线为仅采用 PPT 无法去除的血浆磷脂。丰度较低的颜色为经过 Captiva EMR-Lipid 净化后的三个样品重复运行三次所得的结果。使用公式 1 计算得到 Captiva EMR-Lipid 的基质去除率为 99.53%。

$$\text{PLR}\% = \frac{(\text{峰面积}_{\text{空白, 未净化}} - \text{峰面积}_{\text{空白, 经 Captiva 净化}})}{(\text{峰面积}_{\text{空白, 未净化}} - \text{峰面积}_{\text{试剂空白}})} \times 100$$

公式 1. 使用总峰面积计算磷脂去除率百分比 (%PLR)

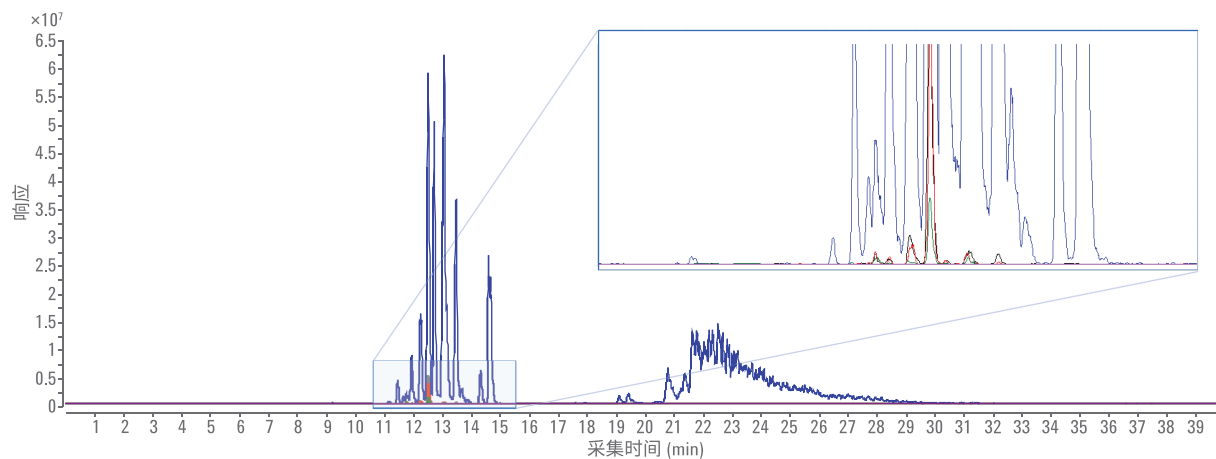


图 1. 磷脂分析子离子 ( $m/z = 184$ ) 扫描叠加图。蓝色迹线 = PPT。绿色、红色和黑色迹线 = Agilent Captiva EMR-Lipid (n = 3)

## 基质效应

在 Captiva EMR-Lipid 工作流程 (A) 之后以及 PPT (B) 之后，向血浆样品后加标 50 ng/mL 的 25-OH D2 和 D3，对响应重现性和相对峰面积进行比较。图 2 表明 Captiva EMR-Lipid 净化得到了高度一致的峰面积，其 %RSD < 3。PPT 样品的分析物响应比经 Captiva EMR-Lipid 处理的样品低 80%，可变峰面积的 %RSD > 25。

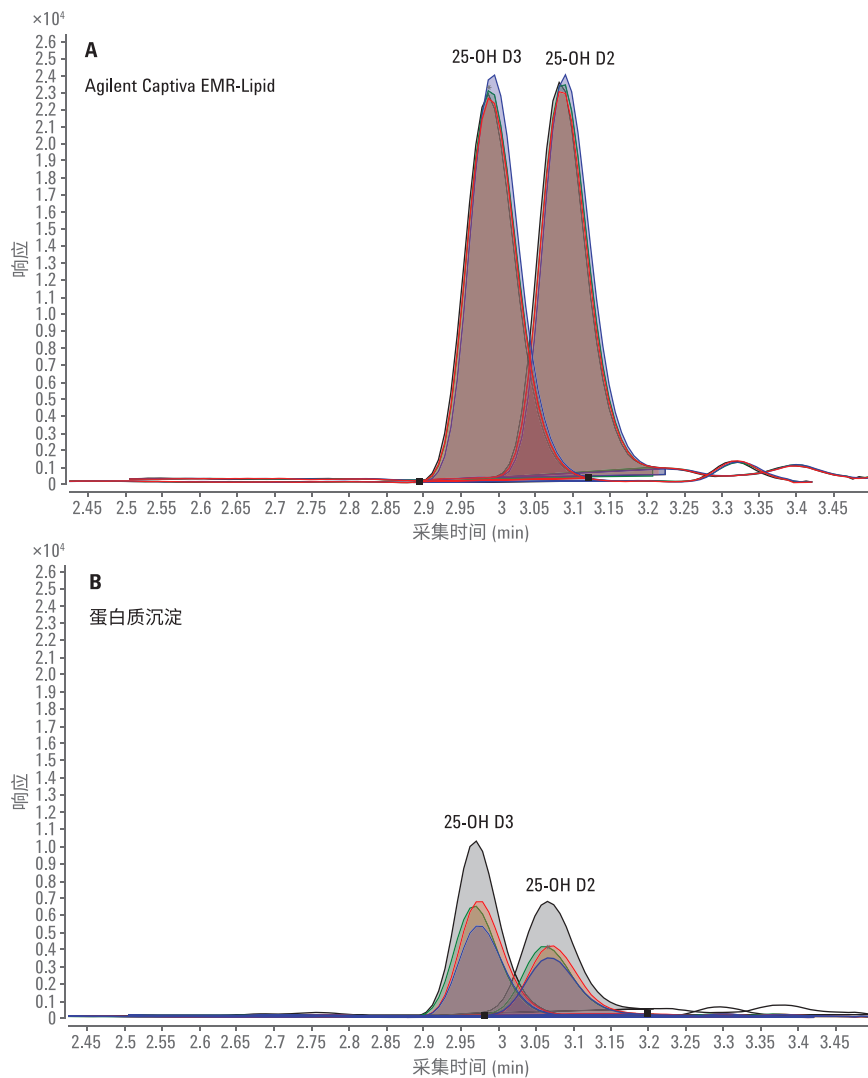


图 2. 50 ng/mL 人血浆经 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化 (A) 和 PPT (B) 处理后得到的 1) 25-OH D2 ( $m/z$  313.3 > 295.3) 和 2) 25-OH D3 ( $m/z$  303.3 > 265.3) 的 MRM 叠加图 (n = 4)

## 标样柱后注射

利用标样柱后注射作为定性分析方法，评估对目标 25-OH 维生素 D 化合物的基质效应。使用注射泵在液相色谱方法运行的同时，将 50 ng/mL 25-OH D2 和 D3 的溶液以 90  $\mu\text{L}/\text{h}$  的速度泵入液相色谱柱后 T-in。然后注入空白血浆样品，产生用于基质/脂类洗脱的抑制区。图 3 显示出在图 3B 的叠加色谱图中与抑制区共流出的 25-OH D2 和 D3。图 3A 叠加图显示出通过采用 Captiva EMR-Lipid 除去抑制信号显著提高分析物响应。

## 利用 Agilent Captiva EMR-Lipid 进行的样品前处理

EMR-Lipid 板提供了简便易用的高效净化方法，使维生素 D 代谢物获得了较高的分析物回收率和精密度。在单独的样品板中对血浆 QC 和校准品进行前处理，确保实现充分混合、均匀转移和完全 PPT。溶剂保留滤芯可保留碰撞溶剂，并在 PPT 之后轻松实现真空作用下的流动。可高效滤除蛋白质而不发生堵塞，始终如一地提供用于进样的洁净洗脱液。方法开发表明，通过洗脱液蒸发和复溶可以提高分析灵敏度，但这种方法并不可取，因为不经浓缩以及优先选择快速直接的进样工作流程，便无法获得足够高的灵敏度。仔细控制流量，使真空度从 1 英寸汞柱开始，并升高至 3 英寸汞柱，以保持 1 滴/5 秒的速率。对于各种样品类型，所有主要脂类的基质去除率始终较高，其中一些超出了本研究的范围<sup>1,3</sup>。

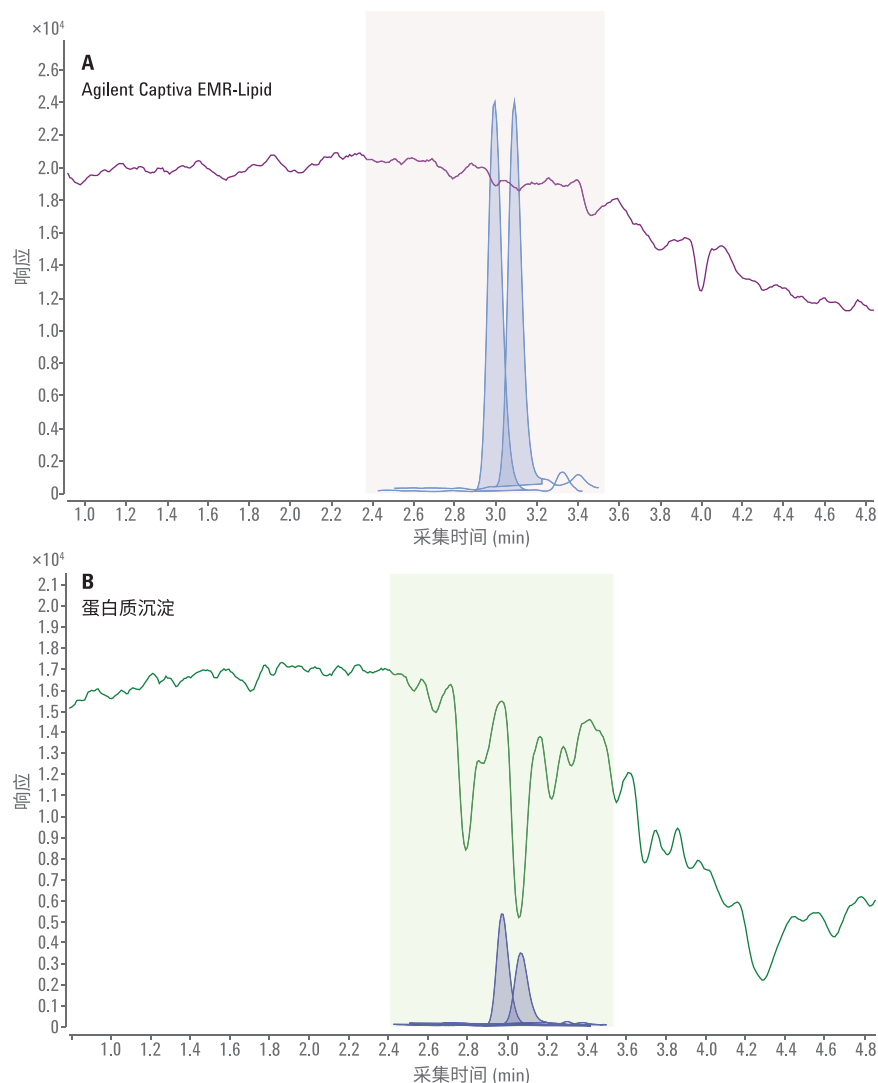


图 3. 50 ng/mL 柱后注射迹线的叠加色谱图。仅 PPT (B), Agilent Captiva EMR-Lipid (A)

## 结论

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔板对维生素 D 代谢物进行多日方法验证, 获得了优异的准确度 (90%-110%)、精密度 (< 10 %RSD) 和净化结果 (磷脂去除率 > 99%)。使用原位蛋白质沉淀可有效滤除血浆和血清样品中的蛋白质, 不发生堵塞, 同时可采用新开发的 EMR-Lipid 吸附剂采集脂类。该方法易于执行、快速, 并可实现优异的基质去除, 可确保获得最高的分析灵敏度、最小的交叉污染和高重现性。吸附剂对脂类的选择性支持进行多种类药物分析<sup>3</sup>, 未来的工作会将应用扩展至迫切需要多种类、多残留分析的其他复杂样品 (如食品) 领域。

## 参考文献

1. L. Zhao, D. Lucas, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-8006EN
2. U.S. Department of Health and Human Services (HHS), Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001
3. L. Zhao, D. Lucas, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-8007EN

表 S1. 25-OH D2 和 25-OH D3 的绝对回收率和 %RSD 值 (n = 6)

|           | 25-OH D2  |      | 25-OH D3  |      |
|-----------|-----------|------|-----------|------|
|           | 绝对回收率 (%) | %RSD | 绝对回收率 (%) | %RSD |
| 10 ng/mL  | 106.4     | 4.8  | 106.3     | 10.2 |
| 20 ng/mL  | 88.8      | 9.5  | 94.2      | 9.2  |
| 30 ng/mL  | 90.8      | 5.0  | 94.7      | 6.3  |
| 250 ng/mL | 96.9      | 14.6 | 96.6      | 4.2  |
| 500 ng/mL | 97.1      | 11.5 | 100.1     | 9.5  |
| 750 ng/mL | 96.9      | 6.4  | 100.3     | 5.0  |

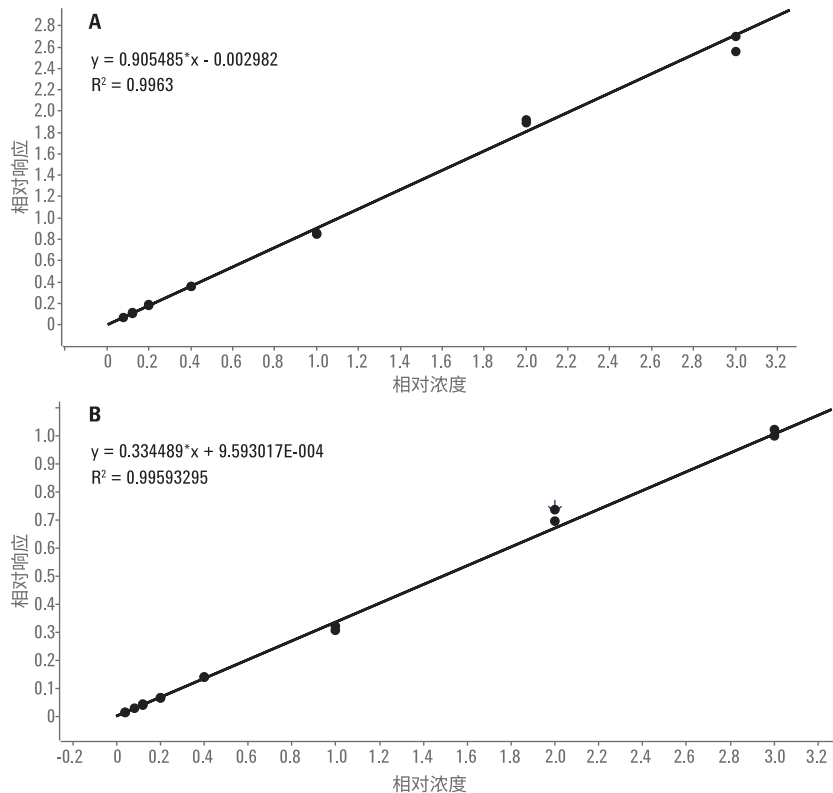


图 S1. 20-750 ng/mL 25-OH D2 (A) 和 10-750 ng/mL 25-OH D3 (B) 的选定校准曲线

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017  
2017 年 7 月 11 日, 中国出版  
5991-7956CHCN