

SCIEX LC-MS/MS系统对血清中6种维生素D及代谢产物检测

Serum levels of 6 vitamin D and its metabolites were detected by SCIEX LC-MS/MS system

王冬, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Wang Dong, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

Key Words: SCIEX 6500; 24,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂D₃; 25(OH) D₃; 3-epi-25-OHD₃; 25(OH) D₂; 3-epi-25-OHD₂; serum

引言

维生素D的含量与多种疾病存在联系,包括骨质疏松症、癌症、多发性硬化症、糖尿病、心血管疾病和微生物感染等。维生素D在钙稳态和骨骼发育中也起着重要的作用。维生素D经历了两个连续的羟基化反应:第一次在肝脏中,在维生素D-25羟化酶作用下,碳25上添加一个羟基,形成25-羟基维生素D(25OHD);第二次在肾脏中,在25OHD-1 α 羟化酶作用下,碳1上添加一个羟基,形成1 α ,25-双羟基维生素D[1,25(OH)₂D],如图1。在血液循环中,25OHD在25OHD-24-羟化酶(CYP24A1)作用下,碳24上添加一个羟基,形成24,25-二羟基维生素D[24,25(OH)₂D],其浓度可占总25-OHD的2%-20%。根据代谢通路,可知(1)1,25(OH)₂D的检测可以用于1 α 羟化酶缺乏症的判定。当机体1 α 羟化酶缺乏时,1,25(OH)₂D浓度水平降低;(2)1,25(OH)₂D的检测有助于判定低血磷综合征是否由FGF23介导:对于由FGF23介导的低血磷综合征患者,1,25(OH)₂D浓度水平降低,非FGF23介导的低血磷综合征患者,1,25(OH)₂D浓度水平升高。(3)非常高的1,25(OH)₂D浓度提示存在遗传抗维生素D佝偻病或存在由肉芽肿或淋巴增殖性疾病引起的肾外1位羟基化的过度表达。(4)CYP24A1酶分解过多的25(OH)D,将其转化为非活性的24,25(OH)₂D。

由于维生素D的主要代谢物在C3位置会发生差向异构,C3差向异构在婴儿体内含量很高。在检测的总25(OH)VD₃中包含3-epi-25(OH)D₃。免疫方法始终存在着无法区分D₂和D₃亚型,以及交叉干扰问题。液相色谱-串联质谱法测定维生素D可以分离C3差向异构体的干扰。血清25(OH)D水平是目前公认的评价人体内维生素D营养状态的指标,1,25(OH)₂D是维生素D发挥生物学活性的形式,可反映体内活性维生素D的含量。另外,随着24,25(OH)₂D

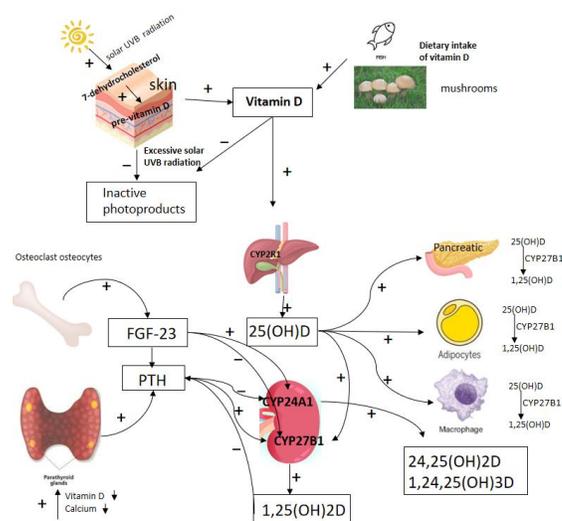


图1. 维生素D在肝脏、肾脏的代谢通路图

的研究逐渐增加,有研究认为25(OH)D/24,25(OH)₂D比值是表征CYP24A1活性和维生素D分解代谢的一项指标。这个比值可以鉴别一种罕见的遗传性疾病—特发性婴儿高钙血症(IIH)。不同维生素D代谢产物在人体内维生素D代谢过程中发挥了不同的作用,因此,有必要对维生素D的多种代谢产物进行准确定量,建立维生素D的人体内代谢谱,为临床中多种维生素D相关性疾病的治疗及科研工作提供技术性理论依据。目前LC-MS/MS方法检测25(OH)D广泛应用于临床实验室。但该方法无法测定1,25(OH)₂VD和24,25(OH)₂VD,同时也不能分离非活性的C3差向异构体。本文使用超高效液相色谱-串联质谱,开发出了一种高效、准确的定量测定血清中24,25(OH)₂D₃、1,25(OH)₂D₃、25(OH)D₃、3-epi-25-OHD₃、25(OH)D₂、3-epi-25-OHD₂的检测方案,对临床疾病的确认、机体内分泌状态的监控等具有重要意义。

实验部分

1. 样品前处理:

- 1) 移液器取200 μL 血清于2 mL离心管中, 加入20 μL 内标, 加入100 μL 甲醇, 涡旋混匀2 min;
- 2) 加入500 μL 0.1M ZnSO_4 溶液, 加入1mL(正己烷:乙酸乙酯=4:1); 涡旋5 min;
- 3) 15000 r/min离心10 min, 移液器移取900 μL 上清液;
- 4) 37°C氮气吹干;
- 5) 加入100 μL (甲醇:水=1:1) 复溶, LC-MS/MS分析。

2. 色谱质谱条件:

色谱柱: Kinetex®2.6 μm F5 100Å 2.1 \times 100mm, 流动相: A: 0.2mM醋酸锂水溶液, B: 0.2mM醋酸锂甲醇溶液, 柱温: 25°C, 进样量: 50 μL , 梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 色谱柱液相梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A(%) | B(%) |
|------------|------|------|
| 0.0 | 50 | 50 |
| 0.2 | 30 | 70 |
| 10.0 | 10 | 90 |
| 11.0 | 2 | 98 |
| 12.0 | 2 | 98 |
| 12.1 | 50 | 50 |
| 14.0 | 50 | 50 |

质谱条件:

ESI源
 气帘气 CUR : 30 psi 碰撞气 CAD : Medium
 雾化气 GS1 : 55 psi 辅助气 GS2 : 65 psi
 IS电压 : +5500V 源温度 TEM : 650°C
 质谱参数见表2

表2. 目标组分离子对信息

| 化合物名称 | 英文名称 | Q1 | Q3 | Dwell time | DP | CE |
|-----------------|-----------------------------|-------|--------|------------|-----|----|
| 24,25-二羟基维生素D3 | 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | 423.4 | 405.4* | 70 | 150 | 21 |
| 1,25-二羟基维生素D3 | 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | 423.3 | 405.3 | 70 | 150 | 30 |
| | | 423.3 | 369.4* | 70 | 150 | 34 |
| 3-差向-25-羟基维生素D2 | 3-epi-25-Hydroxyvitamin D2 | 419.4 | 401.4* | 70 | 138 | 38 |
| | | 419.4 | 361.4 | 70 | 138 | 35 |
| 3-表-25-羟基维生素D3 | 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | 407.4 | 389.5* | 70 | 160 | 37 |
| | | 419.4 | 401.4* | 70 | 200 | 38 |
| 25羟基维生素D2 | 25-Hydroxyvitamin D2 | 419.4 | 361.4 | 70 | 138 | 35 |
| | | 407.3 | 389.4* | 70 | 170 | 35 |
| 25羟基维生素D3 | 25-Hydroxyvitamin D3 | 407.3 | 371.3 | 70 | 170 | 38 |
| | | 407.3 | 371.3 | 70 | 170 | 38 |
| 钙三醇-D6 | Calcitriol-d6 | 429.3 | 375.4 | 70 | 160 | 34 |
| 25羟基维生素D2-d6 | 25-Hydroxyvitamin D2-d6 | 425.3 | 406.4 | 70 | 170 | 38 |
| 25羟基维生素D3-d6 | 25-Hydroxyvitamin D3-d6 | 413.4 | 395.4 | 70 | 180 | 37 |

* 定量离子

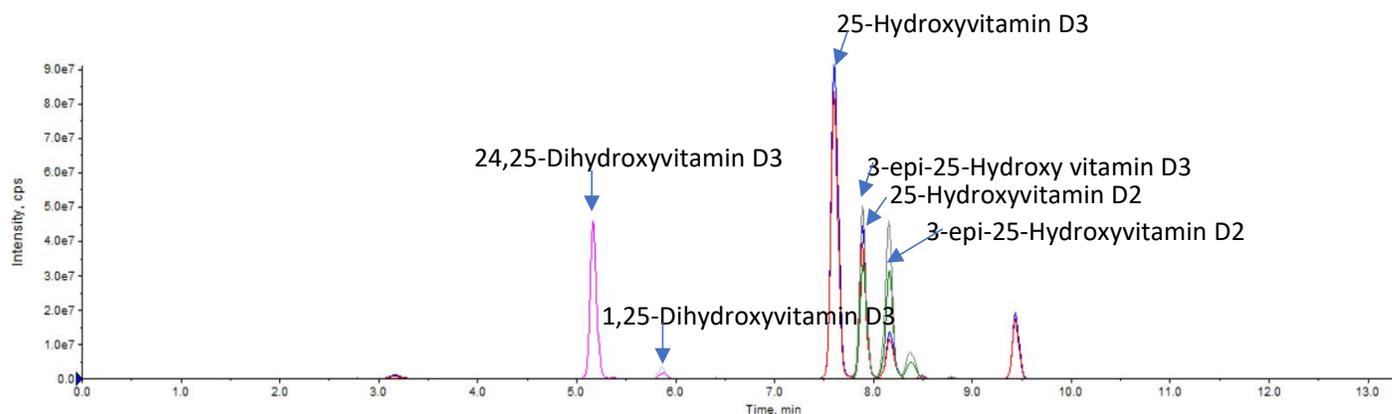


图2. 6种维生素D典型色谱图

表3. 6种维生素D标准曲线及线性范围

| 化合物名称 | 英文名称 | 线性范围 | 线性方程 | 相关系数 |
|-----------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|--------|
| 24,25-二羟基维生素D3 | 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | 9.6~60000(pg/mL) | $Y=0.00021x-0.000635$ | 0.9962 |
| 1,25-二羟基维生素D3 | 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | 1.6~10000(pg/mL) | $Y=0.00596x+0.01760$ | 0.9986 |
| 3-差向-25-羟基维生素D2 | 3-epi-25-Hydroxyvitamin D2 | 9.6~60000(pg/mL) | $Y=0.00025x+0.01994$ | 0.9984 |
| 3-表-25-羟基维生素D3 | 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | 9.6~60000(pg/mL) | $Y=0.00010x+0.00077$ | 0.9975 |
| 25羟基维生素D2 | 25-Hydroxyvitamin D2 | 16~100000(pg/mL) | $Y=0.10113x-0.000625$ | 0.9979 |
| 25羟基维生素D3 | 25-Hydroxyvitamin D3 | 32~200000(pg/mL) | $Y=7.32715x-0.00735$ | 0.9960 |

结果与讨论

1. 灵敏度

使用5%BSA作为替代基质，考察24,25(OH)₂D₃、1,25(OH)₂D₃、25(OH)D₃、3-epi- 25-OHD₃、25(OH)D₂、3-epi- 25-OHD₂的线性范围最低点灵敏度和峰形情况，结果表明化合物灵敏度高、峰形良好，24,25(OH)₂D₃、1,25(OH)₂D₃、25(OH)D₃、3-epi- 25-OHD₃、25(OH)D₂、3-epi- 25-OHD₂的特征图谱见图2。

2. 线性

在本实验条件下，以5%BSA为替代基质，结合各维生素D的生理浓度范围制作标准工作曲线。各待测物标准曲线及线性范围结果如下表3，各化合物在其线性范围内线性良好，r值大于0.995。

3. 加标回收率

评价检测方法的准确性，取6份不同来源的实际人群样本，每份基质分为3组，取其中两组加入不同浓度的待测物溶液，制备低、高两组基质加标样本，按样本前处理方法处理，进样分析，计算加标回收率。如表4所示，不同浓度水平的加标回收率在86.76%~114.55%之间，满足方法学要求。

表4. 6种维生素D加标回收率

| 化合物名称 | 浓度 | 加标回收率 |
|-----------------------------|-----------------|---------|
| 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | R-L(600pg/mL) | 88.38% |
| | R-H(15000pg/mL) | 114.55% |
| 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | R-L(100pg/mL) | 92.36% |
| | R-H(2500pg/mL) | 95.51% |
| 3-epi-25-Hydroxyvitamin D2 | R-L(600pg/mL) | 99.00% |
| | R-H(15000pg/mL) | 88.93% |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | R-L(600pg/mL) | 100.00% |
| | R-H(15000pg/mL) | 86.76% |
| 25-Hydroxyvitamin D2 | R-L(1000pg/mL) | 91.33% |
| | R-H(25000pg/mL) | 93.24% |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | R-L(2000pg/mL) | 111.35% |
| | R-H(50000pg/mL) | 87.68% |

4. 精密度

考察精密度，向血清中添加定量下线（LLOQ）、低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)四个质控浓度水平的工作溶液进行精密度方法验证，如表5所示，不同浓度水平的变异系数（CV%）范围为0.24%~12.18%，满足 $CV\% \leq \pm 15\%$ 的方法学要求。

5. 基质效应

考察由基质效应引入的灵敏度影响，取6个不同来源的人血清样本，按照样本前处理方法提取，向提取后基质样本中加入对应浓度内标及不同浓度标准品溶液，配置成低、中、高三个水平的基质提取后加标样本；以相同进样试剂配制对应低、中、高三个水平的标准溶液，计算基质提取后添加标准品的响应与标准溶液响应的比值。结果如下表6所示。不同浓度水平基质效应的变异系数（CV%）范围为0.00%~8.40%，满足 $CV\% \leq \pm 15\%$ 的方法学要求。

表5. 6种维生素D精密度实验结果

| 化合物名称 | 质控 | 浓度 | CV% |
|-----------------------------|------|-------------|-------|
| 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | LLOQ | 9.6pg/mL | 12.18 |
| | LQC | 120pg/mL | 3.56 |
| | MQC | 2400pg/mL | 7.99 |
| 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | HQC | 30000pg/mL | 6.14 |
| | LLOQ | 9.6pg/mL | 6.59 |
| | LQC | 120pg/mL | 3.63 |
| 3-epi-25-Hydroxyvitamin D2 | MQC | 2400pg/mL | 0.75 |
| | HQC | 30000pg/mL | 0.93 |
| | LLOQ | 9.6pg/mL | 0.58 |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | LQC | 120pg/mL | 10.00 |
| | MQC | 2400pg/mL | 2.84 |
| | HQC | 30000pg/mL | 2.97 |
| 25-Hydroxyvitamin D2 | LLOQ | 1.6pg/mL | 3.77 |
| | LQC | 20pg/mL | 6.07 |
| | MQC | 400pg/mL | 4.26 |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | HQC | 5000pg/mL | 0.61 |
| | LLOQ | 16pg/mL | 9.16 |
| | LQC | 200pg/mL | 2.19 |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | MQC | 4000pg/mL | 5.03 |
| | HQC | 50000pg/mL | 0.24 |
| | LLOQ | 32pg/mL | 3.29 |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | LQC | 400pg/mL | 0.89 |
| | MQC | 8000pg/mL | 3.44 |
| | HQC | 100000pg/mL | 3.45 |

表6. 6种维生素D基质效应实验结果

| 化合物名称 | 质控 | 浓度 | CV% |
|-----------------------------|-----|-----------|------|
| 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | LQC | 0.12ng/mL | 6.93 |
| | MQC | 1.2ng/mL | 7.88 |
| | HQC | 30ng/mL | 5.87 |
| 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | LQC | 0.02ng/mL | 3.84 |
| | MQC | 0.2ng/mL | 3.53 |
| | HQC | 5ng/mL | 2.92 |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D2 | LQC | 0.12ng/mL | 3.84 |
| | MQC | 1.2ng/mL | 4.09 |
| | HQC | 30ng/mL | 1.42 |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | LQC | 0.12ng/mL | 8.40 |
| | MQC | 1.2ng/mL | 1.67 |
| | HQC | 30ng/mL | 1.05 |
| 25-Hydroxyvitamin D2 | LQC | 0.2ng/mL | 5.10 |
| | MQC | 2ng/mL | 0.93 |
| | HQC | 50ng/mL | 1.64 |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | LQC | 0.4ng/mL | 3.10 |
| | MQC | 4ng/mL | 0.00 |
| | HQC | 100ng/mL | 5.00 |

6. 前处理回收率

考察前处理过程中的待测物和内标的提取效率，评价提取过程的灵敏度损失。使用替代基质配置低、高浓度水平的样本，每个浓度平行制备3份。按样本前处理流程，处理替代基质。向处理后的替代基质中加入一定浓度的待测物和内标溶液，配置低、高浓度水平的样本，每个浓度平行制备3份。以待测物和内标的峰面积比为指标进行计算，评价内标和待测物在前处理过程中行为的一致性。结果如表7、表8所示。不同浓度下提取回收率总变异系数（CV%）≤15.0%；内标回收率精密度（CV%）≤15.0%。

7. 血清样本

实际人血清样本中6种化合物的色谱图如下图3。

表7. 6种维生素D提取回收率

| 化合物名称 | 质控 | 回收率 % | 总回收率 % | 总变异系数 CV% |
|-----------------------------|-----|--------|--------|-----------|
| 24,25-Dihydroxyvitamin D3 | LQC | 113.27 | 113.75 | 0.59 |
| | HQC | 114.22 | | |
| 1,25-Dihydroxyvitamin D3 | LQC | 97.99 | 99.65 | 2.36 |
| | HQC | 101.32 | | |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D2 | LQC | 86.93 | 88.97 | 3.24 |
| | HQC | 91.01 | | |
| 3-epi-25-Hydroxy vitamin D3 | LQC | 91.98 | 90.79 | 1.85 |
| | HQC | 89.61 | | |
| 25-Hydroxyvitamin D2 | LQC | 102.56 | 100.75 | 2.53 |
| | HQC | 98.95 | | |
| 25-Hydroxyvitamin D3 | LQC | 113.61 | 113.30 | 0.39 |
| | HQC | 112.98 | | |

表8. 3种维生素D内标的回收率

| 内标名称 | 25-Hydroxyvitamin D2-d6 | 25-Hydroxyvitamin D2-d6 | 1,25-Dihydroxyvitamin D3-d6 |
|------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| CV% | 0.93 | 1.05 | 4.04 |

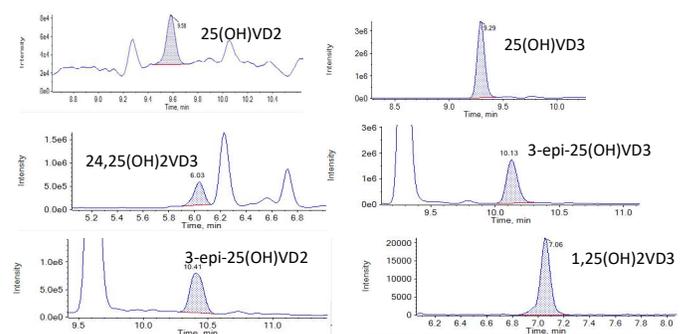


图3. 人血清样品中分析物色谱图

总结

本文基于SCIEX液相色谱串联质谱系统建立了同时检测血清基质中的6种维生素D相关代谢产物的方法。针对6种维生素D代谢产物详细优化了前处理方法，同时优化了色谱条件和质谱参数，比如使用加锂离子作为物质的加合方式，并且色谱条件能够有效分离维生素D代谢物和C3的差向异构体。该方法具有线性好、准确性高等优点满足临床的相关需求。

参考文献

- [1] Izabela Szymczak-Pajor, Agnieszka Śliwińska. Analysis of association between Vitamin D deficiency and insulin resistance. *Nutrients*. 2019;11(2)794.
- [2] Thomas Edouard, Abdallah Hussein, Francis H. Glorieux et al. Serum 24,25-Dihydroxyvitamin D Concentrations in Osteogenesis Imperfecta: Relationship to Bone Parameters. 2012, 97(4):1243-1249.
- [3] Dennis Wagner, Heather E. Hanwell, Kareena Schnabl et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 is predictive of 25-hydroxyvitamin D3 response to vitamin D3 supplementation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 126 (2011) 72-77.
- [4] Anders H. Berg, Camille E. Powe, Michele K. Evans et al. 24,25-Dihydroxyvitamin D3 and Vitamin D Status of Community-Dwelling Black and White Americans. *Clinical Chemistry* 61:6 (2015).
- [5] G.D. Cartera, J.C. Jonesa, J. Shannon et al. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 4598 (2015) 1-5.
- [6] Danchen Wang, Songlin Yu, Qi Zhang et al. A robust method for simultaneous measurement of serum 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, and 24,25(OH)₂D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with efficient separation of 3-epi analogs, 23R,25(OH)₂D3, and 4β,25(OH)₂D3. *J Mass Spectrom*. 2022 Jan;57:e4792.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15566-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)