

应用纪要

在临床研究中利用UPLC-MS/MS对六种低浓度维生素D代谢物进行定量分析

Robert Wardle, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本应用纪要展示了一种专为分析血清中的六种维生素D代谢物而开发的临床研究方法，该方法具有良好的分析灵敏度。该方法使用相对简单的样品萃取程序，样品用量仅为200 μ L血清，能够定量分析5 pg/mL的1,25diOHD₃，并且可以区分空白的处理血清样品与相同基质中加标1.25 pg/mL 1,25diOHD₃的样品。

优势

- 利用PTAD衍生简化蛋白沉淀和SPE样品萃取程序
- 优异的分析灵敏度，能够区分空白样品与添加1.25 pg/mL 1,25-二羟基维生素D₃的处理血清样品
- 所需样品量仅为200 μ L

简介

虽然维生素D在骨代谢中的作用已得到充分确认，而最近有研究表明维生素D缺乏与多种疾病之间可能存在联系，但其在其他疾病中的作用尚不明确。液相色谱-质谱联用系统(LC-MS)可以提供所需的分析灵敏度和选择性，并且能够在单次运行中定量检测多种分析物。然而，已有描述的方法通常具有复杂的工作流程，包括蒸发步骤或流动相添加剂，这可能使该系统难以用于其他研究。

因此，我们开发出一种从人血清中萃取和分析六种维生素D代谢物的半自动化临床研究方法。该方法使用CORTECS™苯基柱和Waters™ ACQUITY™ UPLC™ I-Class系统对萃取后的样品进行色谱分离，然后使用Xevo™ TQ-XS串联四极杆质谱仪（图1）进行质谱检测。该系统提供了所需的分析灵敏度。利用Hamilton STAR液体处理机器人实现萃取工作流程的自动化和简化，使得样品从最初的样品管到最终处理结果的每一个环节均可追踪。



图1. Waters ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ-XS质谱仪。

实验

UPLC条件

系统:	配备色谱柱管理器的ACQUITY UPLC I-Class (FTN)系统
进样针:	30 μ L
色谱柱:	CORTECS苯基柱2.1 \times 100 mm, 1.6 μ m (部件号 : 186008381)
流动相A:	LC-MS级水 + 氟化铵
流动相B:	LC-MS级甲醇/乙腈 + 氟化铵
洗针液:	LC-MS级甲醇/乙腈/ LC-MS级 水/2-丙醇 + 甲酸
清除溶剂:	LC-MS级甲醇/LC-MS级水
柱温:	40 $^{\circ}$ C
进样体积:	25 μ L
梯度:	见表1
运行时间:	9.5 分钟

方法条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.45	50	50	初始
6.00	0.45	45	55	6
8.00	0.45	30	70	6
8.60	0.50	2	98	11
9.20	0.50	50	50	11
9.40	0.45	50	50	11

表1.用于分离维生素D代谢物的梯度表。

质谱条件

系统:	Xevo TQ-XS
分辨率:	MS1 (0.7 FWHM) MS2 (0.7 FWHM)
采集模式:	多重反应监测(MRM) (详见表2)
极性:	ESI+
毛细管电压:	3.0 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (kV)
24,25diOHD3	574.4	298.2 (161.2)	30	16 (36)
24,25diOHD2*	586.4	298.2 (280.2)	30	16 (28)
[² H ₆]-24,25diOHD3	580.4	298.2 (161.2)	30	16 (36)
1,25diOHD3	574.4	314.2 (268.2)	30	14 (30)
1,25diOHD2*	586.4	314.2 (268.2)	30	18 (30)
[² H ₃]-1,25diOHD3	577.4	317.2 (271.2)	30	14 (30)
25OHD3	558.3	298.2 (161.2)	30	18 (36)
[² H ₃]-25OHD3	561.3	301.2 (164.2)	30	18 (36)
25OHD2	570.3	298.2 (280.2)	30	18 (28)
[² H ₃]-25OHD2	573.3	301.2 (283.2)	30	18 (28)

表2. 维生素D代谢物定量离子、定性离子（括号内）及其内标的MRM参数（*监测二羟基维生素D2代谢物，但未定量）

C3-*epi*-25OHD3和C3-*epi*-25OHD2分别与25OHD3和25OHD2具有相同的MRM参数

C3-*epi*-25OHD3使用其自身标记的[²H₃]-C3-*epi*-25OHD3作为内标，C3-*epi*-25OHD2则使用[²H₃]-25OHD2作为内标

数据管理

MassLynx软件4.2版自带的TargetLynx XS应用管理软件

样品制备

25-羟基维生素D2 (25OHD2)、25-羟基维生素D3 (25OHD3)、C3-*epi*-25-羟基维生素D2 (C3-*epi*-25OHD2)、C3-*epi*-25-羟基维生素D3 (C3-*epi*-25OHD3)、24,25-二羟基维生素D3 (24,25diOHD3)、1,25-二羟基维生素D2 (1,25diOHD2)和1,25-二羟基维生素D3 (1,25diOHD3)认证参比溶液购自Merck Life Sciences (Gillingham, UK)。24,25-二羟基维生素D2 (24,25diOHD2)认证参比溶液以及[²H₃]-25OHD2、[²H₃]-25OHD3、[²H₃]-C3-*epi*-

25OHD3、 $[^2\text{H}_6]$ -24,25diOHD3和 $[^2\text{H}_3]$ -1,25diOHD3认证的标记内标溶液购自IsoSciences (Ambler, PA)。

校准品和QC样品均使用购自Golden West Biologicals (Temecula, CA)的MSG2000处理血清在替代基质中制备，涵盖以下浓度范围（表3），QC浓度显示在括号中。

分析物	浓度 (ng/mL)	分析物	浓度 (ng/mL)
25OHD3	1.3-151 (1.8, 16.6, 85.3)	24,25diOHD3	50-30,000 (160, 1,840, 15,800)
25OHD2	0.43-150 (0.99, 30.1, 84.7)	1,25diOHD3	2.5-1000 (8.7, 54.7, 715)
C3-epi-25OHD3	0.12-30.1 (0.24, 2.4, 16.2)		
C3-epi-25OHD2	0.050-30.0 (0.17, 2.0, 15.3)		

表3.用于维生素D代谢物的校准品范围和QC浓度。

LC-MS级水和甲醇购自Honeywell (Bracknell, UK)。乙腈和甲酸购自Greyhound (Birkenhead, UK)。氟化铵和硫酸锌购自Sigma-Aldrich (Gillingham, UK)。

样品萃取

样品萃取采用Hamilton STAR液体处理机器人。

向200 μL 样品中加入20 μL 内标并混合。依次加入硫酸锌水溶液和甲醇，进行蛋白沉淀，每次添加后将样品充分混合。将样品离心，随后将上清液转移到Oasis PRiME HLB $\mu\text{Elution}$ 板（部件号：[186008052 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186008052-oasis-prime-hlb-96-well--elution-plate-3-mg-sorbent-per-well-1-p.html >](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186008052-oasis-prime-hlb-96-well--elution-plate-3-mg-sorbent-per-well-1-p.html)）。使用甲醇/水溶液清洗样品并保持真空以使萃取吸附剂干燥。然后使用乙腈洗脱样品并使用PTAD试剂进行衍生化。在衍生化后，加入蒸馏水以淬灭反应，并将样品直接进样至UPLC-MS/MS系统。在衍生化之前无需进行蒸发，由此简化萃取工作流程。

结果与讨论

以下所示为人血清样品中维生素D代谢物的示例色谱图（图2）。

注：补充1,25diOHD2和24,25diOHD2仅用于监测目的，以在低浓度下获得可检测的峰。

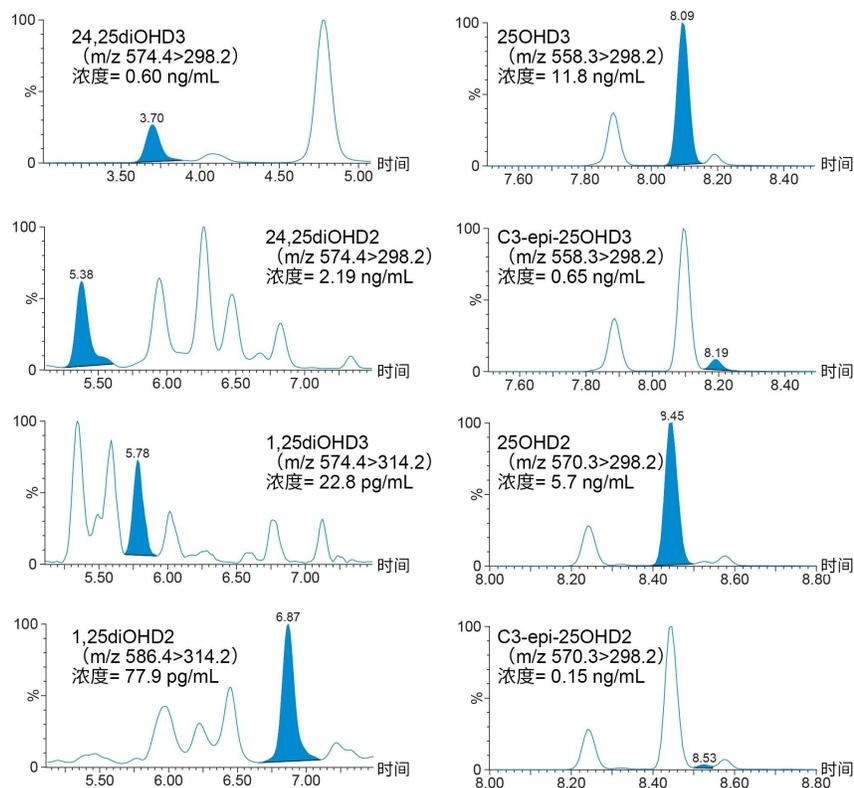


图2.检测人血清中维生素D代谢物所得到的典型色谱图。

在五天内萃取并测定QC L、QC M和QC H的五个重复样品以评估精密度。所有维生素D代谢物在所有浓度下的运行内精密度和总精密度均 $\leq 7.2\%CV$ ，如表4所示。

分析物	QC L 精密度			QC M 精密度			QC H 精密度		
	浓度 (ng/mL)	运行内 (%CV)	合计 (%CV)	浓度 (ng/mL)	运行内 (%CV)	合计 (%CV)	浓度 (ng/mL)	运行内 (%CV)	合计 (%CV)
24,25diOHD3	0.17	3.6	3.6	1.9	3.4	4.2	15.8	3.6	3.7
1,25diOHD3*	9.0	5.8	7.2	50.3	4.6	6.2	697	3.7	3.7
25OHD3	1.9	1.5	1.5	16.5	3.0	3.3	85.9	3.5	4.6
C3-epi-25OHD3	0.24	2.2	2.2	2.3	3.1	3.5	16.3	2.5	3.7
25OHD2	0.98	3.7	3.7	29.2	3.9	4.1	83.1	3.8	3.8
C3-epi-25OHD2	0.17	5.9	5.9	2.0	4.9	5.9	15.9	3.3	5.0

*pg/mL

表4. 维生素D代谢物的精密度性能汇总。

在四天内萃取并定量分析使用处理血清制备的十个含低浓度维生素D代谢物的重复样品，以此评估分析灵敏度。将LLOQ确定为精密度 $\leq 20\%$ CV且信噪比(S:N(ptp)) $\geq 10:1$ 的最低浓度。维生素D代谢物的LLOQ如表5所示。对于25OHD3、C3-epi-25OHD3和25OHD2，MSG2000处理的人血清中包含的内源性物质限制了LLOQ的进一步降低。

分析物	浓度 (ng/mL)	精密度 (%CV)	信噪比 (ptp)
24,25diOHD3	0.028	13.9	18.1
1,25diOHD3*	5.1	11.7	24.4
25OHD3	1.04	3.5	400
C3-epi-25OHD3	0.086	5.7	35.9
25OHD2	0.24	9.2	81.3
C3-epi-25OHD2	0.057	10.3	11.8

*pg/mL

表5. 维生素D代谢物的分析灵敏度汇总。

图3显示了空白和加标1,25diOHD3的MSG2000处理人血清的低浓度样品的典型色谱图。虽然在 $\%CV \leq 20\%$ 且平

均 $S:N(ptp) \geq 10:1$ 的条件下实现了 2.5 pg/mL 的LLOQ，但一些重复样品不满足信噪比要求，因此，认为 $1,25\text{ diOHD}_3$ 的LLOQ为 5.1 pg/mL 。此外，可以区分空白处理血清样品与加标 1.25 pg/mL $1,25\text{ diOHD}_3$ 的相同血清样品。

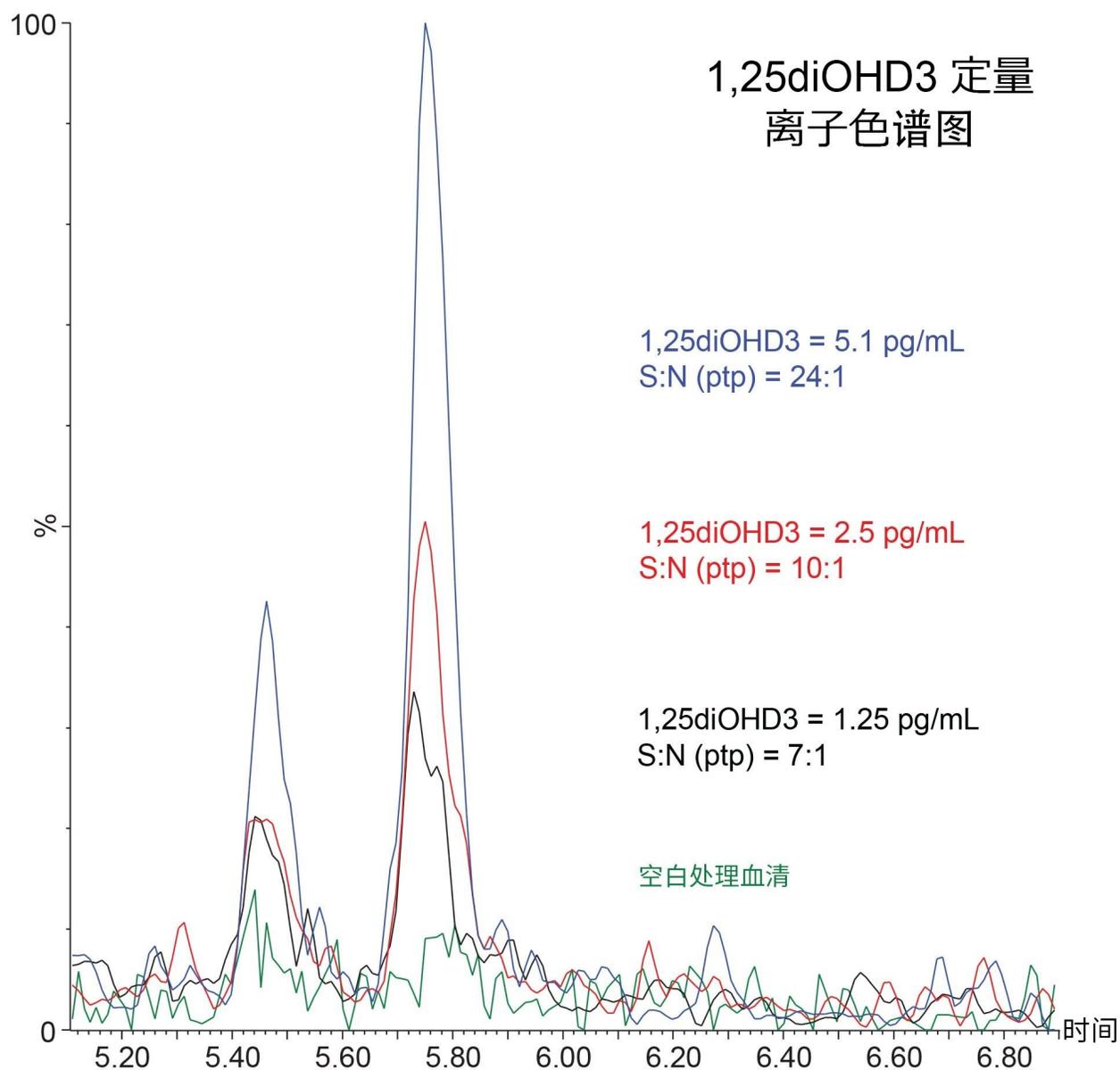


图3.空白处理血清样品以及含低浓度 $1,25\text{ diOHD}_3$ 的处理血清样品的色谱图。

此方法在表3所示的范围内对所有维生素D代谢物均呈线性关系，该结果是通过将低浓度和高浓度混合样品以已知比例混合，得到上述浓度范围内的多达10个样品之后测定而得。加标处理血清样品得到的所有校准线都是线性的，测定十个不同样品中维生素D代谢物时的决定系数(r^2) > 0.99。

通过分析所有维生素D代谢物的一系列空白和高浓度（校准品7的3倍）样品，对分析残留进行评估。未观察到明显残留，所有响应均小于低浓度校准品样品的20%。开发出按照样品对校准品0为1:1和1:4的比例稀释样品的方案，且已证明该方案能够提供85%~115%范围内的回收率，可以稀释超出所定量的所有维生素D的代谢物校准范围的样品。

本研究测定了典型的内源性干扰物（胆红素、胆固醇、脂肪乳剂、甘油三酯和尿酸），与对照相比得到的测试样品百分比回收率都在±15%以内。使用来自六个供体的血清样品研究基质效应。虽然在单独评估分析物峰面积时观察到离子抑制（回收率小于1.0），但这一效应已经通过内标得到补偿，如归一化基质因子结果所示。基于分析物:内标响应比率的所有归一化基质因子计算结果均在0.85~1.15的范围内（表6）。由于所得样品中存在高浓度内源性25OHD3和C3-epi-25OHD3，因此无法评估低浓度加标。

分析物	样品	基质因子 分析物峰面积（范围）	基质因子 响应比率（范围）
24,25diOHD3	低	0.553 (0.224-0.845)	0.964 (0.902-1.017)
	高	0.589 (0.473-0.719)	0.901 (0.858-0.948)
1,25diOHD3	低	0.495 (0.303-0.606)	0.991 (0.892-1.137)
	高	0.583 (0.449-0.698)	1.008 (0.925-1.122)
25OHD3	高	0.756 (0.676-0.851)	0.986 (0.926-1.026)
C3-epi-25OHD3	高	0.754 (0.687-0.846)	0.976 (0.907-1.051)
25OHD2	低	0.889 (0.825-0.991)	1.027 (0.929-1.110)
	高	0.856 (0.810-0.927)	0.994 (0.920-1.062)
C3-epi-25OHD2	低	0.886 (0.842-0.981)	0.991 (0.908-1.092)
	高	0.888 (0.842-0.981)	1.031 (0.971-1.122)

表6. 维生素D代谢物的基质效应汇总。

通过分析40个DEQAS样品(Charing Cross Hospital, UK)中的代谢物25OHD3和1,25diOHD3, 对计算得出的浓度分别与NIST认定值或LC-MS截尾均值(LC-MS TM)进行比较, 以评估准确度。针对25OHD3和1,25diOHD3评估的准确度可参见表7和图4。观察到25OHD3的结果与DEQAS NIST认定值相比一致性良好, 仅有极小偏差, 但是观察到1,25diOHD3的结果与DEQAS LC-MS截尾均值相比一致性良好, 有负偏差。产生负偏差的原因之一可能是该代谢物可能受到其他二羟基维生素D代谢物的干扰, 这些代谢物在使用该方法时发生色谱分离, 如图2所示。

分析物	方程	Deming 回归分析		线性拟合(r)	Altman Bland 偏差
		比例偏差?	常值偏差?		
25OHD3	$y=0.96x+0.54$	N (p=0.0397)	N (p=0.1674)	0.993	1.4%
1,25diOHD3	$Y=0.66x+2.81$	Y (p<0.0001)	N (p=0.0160)	0.961	-30.0%

表7.25OHD3和1,25diOHD3的准确度汇总。

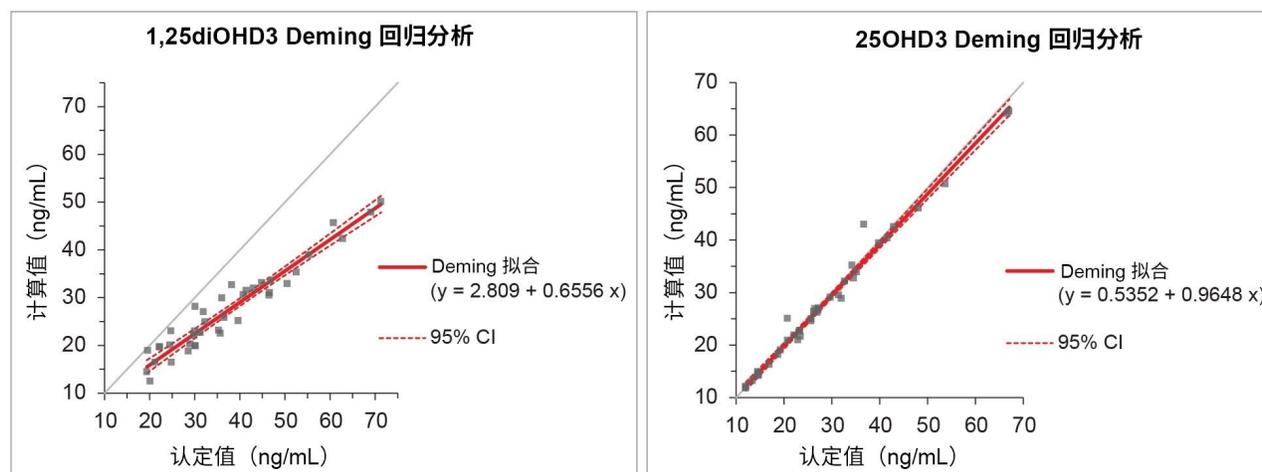


图4.比较DEQAS NIST认定值(25OHD3)或LC-MS TM (1,25diOHD3)值(认定值)与沃特世UPLC-MS/MS方法(计算值)的Deming回归曲线。

结论

我们已开发出一种分析血清中的六种维生素D代谢物的临床研究方法，该方法具有良好的分析灵敏度。该方法使用相对简单的样品萃取程序，样品用量仅为200 μ L血清，可以区分空白的处理血清样品与相同基质中加标1.25 pg/mL 1,25diOHD3的样品，并能够定量分析5 pg/mL的1,25diOHD3。在样品萃取时，也可以利用Hamilton STAR液体处理机器人实现半自动化，使得样品从样品管条形码到处理结果的每一个环节均可追踪。

本文介绍的分析方法表现出优异的五天内精密度、准确度以及整个测量范围内的线性。本研究所测试的内源性化合物无明显残留或干扰，基质效应已通过使用内标得到补偿，并且可以进行高达1:4的稀释。

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007589ZH, 2022年4月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号