

# 使用安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/ K6460 液相色谱串联质谱系统分析血 清中的 25-羟基维生素 D

## 作者

胡楠，徐聪，王少珍，张雅萍  
安捷伦科技（中国）有限公司

## 摘要

采用安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统定量分析血清中的 25-羟基维生素 D2 与 D3。通过方法验证及临床样品检测，证明 K6460 系统可以稳定地提供高准确度的定量结果。

## 前言

质谱仪，尤其是三重四极杆质谱仪，是痕量检测和定量分析的首选仪器，具有灵敏度高、稳定性出色和抗干扰能力强等优点，可同时分析多种目标物。三重四极杆质谱在药物检测、内分泌与生物标志物、诊断指示物、治疗监控化合物等方面都有广泛的应用。

维生素 D，俗称“阳光维生素”，对于维持钙的代谢和骨骼健康至关重要。维生素 D3 和维生素 D2 在酶的作用下，在肝脏内代谢为 25-羟基维生素 D3 和 25-羟基维生素 D2。这些代谢产物的定量广泛用于测定人体内维生素 D 的状况，如低血钙代谢性骨疾病和高血钙代谢性骨疾病的鉴别诊断。本应用简报采用安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统分别定量检测人血清中 25-羟基维生素 D3 和 25-羟基维生素 D2，方法验证及临床样品检测结果表明，该方法具有良好的准确度和稳定性，适用于 25-羟基维生素 D2 和 D3 的日常定量分析。



图 1. 安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统

## 实验部分

### 仪器和设备

安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统，液相色谱仪配备如下：二元泵（部件号 K1312B）、真空脱气机（部件号 K4225A）、自动进样器（部件号 K1367E）、恒温器（部件号 K1330B）、柱温箱（部件号 K1316C）；质谱系统为三重四极杆质谱仪；并配备相关采集、定性和定量软件。

### 样品前处理

样品前处理参考通用的液液萃取方法，氮气吹干后以初始流动相复溶，供色谱进样分析。标准品、质控品及样品采用相同的前处理方法。

实验采用标准曲线定量分析，以氘代 25-羟基维生素 D3 作为内标，设置高、低两个浓度的质控品。

### 液相色谱条件

色谱柱：2.1 × 100 mm C18 分析柱

流速：0.35 mL/min

柱温：25 °C

流动相：A 为水相（加酸），B 为甲醇

梯度程序：时间 (min)	B (%)
0.00	70.00
2.00	100.00
3.30	100.00
3.31	70.00
6.00	70.00

### 质谱条件

离子源：喷射流技术离子源 (AJS)

雾化气、干燥气及碰撞气均为氮气

毛细管电压：3500 V

雾化气压力：45.0 psi

干燥气温度：275 °C

干燥气流速：8 L/min

鞘气温度：350 °C

鞘气流速：11 L/min

检测模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：如表 1 所示

表 1. 25-OH 维生素 D2 与 D3 及其氘代内标 (ISTD) 的 MRM 参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞电压 (V)	极性
25-OH VD2	413.3	395.5	120	4	正
25-OH VD3	401.3	383.2	100	4	正
ISTD	407.3	389.4	110	4	正

## 结果与讨论

### 方法学验证

本文所述方法采用通用的液液萃取法进行样品前处理和反相色谱梯度洗脱，分析结果良好。在该分析条件下，25-OH 维生素 D2 与 D3 峰形良好，但因为无其它干扰且需要利用同一内标物定量分析，本实验中两个化合物并未完全分离，如图 2 所示。如果采用其它柱效更高的色谱柱以及更合适的梯度，两种目标物可在短时间内实现基线分离。

根据 2011 年医学研究所报告的临床决策值，将最低定量点设置为约 10 ng/mL，信号如图 2 所示，体现仪器良好的灵敏度。另外，参考实际样品检测结果，中国人群中 25-OH VD2 含量普遍偏低，结合 K6460 实际优异的响应，可以进一步优化前处理，将 25-OH VD2 做到低于 ng/mL 的检测下限，以期更好地适应临床实际定量的需求。

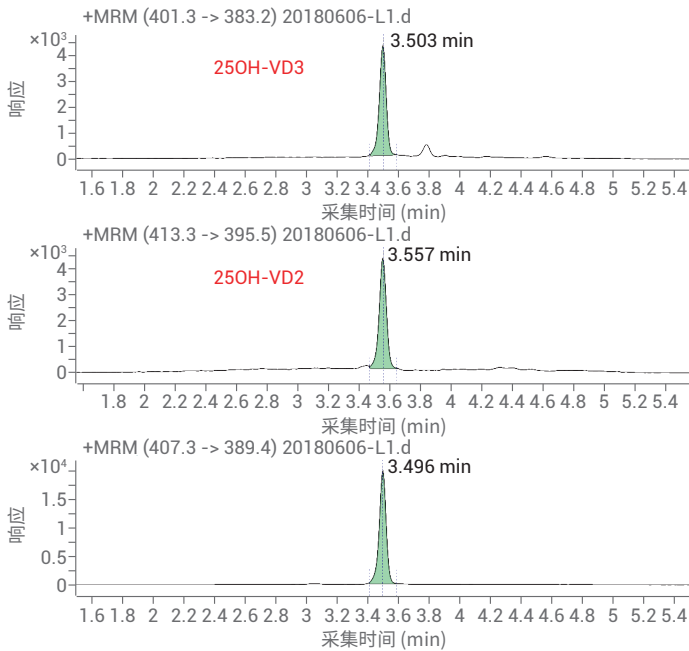


图 2. 最低浓度点 (约 10 ng/mL) 及内标的色谱图

### 优异的线性及稳定性

经过连续两周的临床样品测试得到，方法线性及系统稳定性良好。将同一医院的数据整合分析，标准曲线线性良好， $R^2 > 0.997$  (图 3)。所有批次的 QC (包括日内和日间检测结果) 平均准确度为 102.9%，RSD < 10% (见表 2)。其中，因为本次实验只有 25-OH VD3-d6 一种内标，所以 25-OH VD2 的测试结果偏差大一些。

表 2. 所有批次 QC 统计结果

		QC1	QC2
25-OH VD3	均值	20.23	50.62
	RSD (%)	1.42	1.96
25-OH VD2	均值	23.77	53.45
	RSD (%)	6.04	6.26

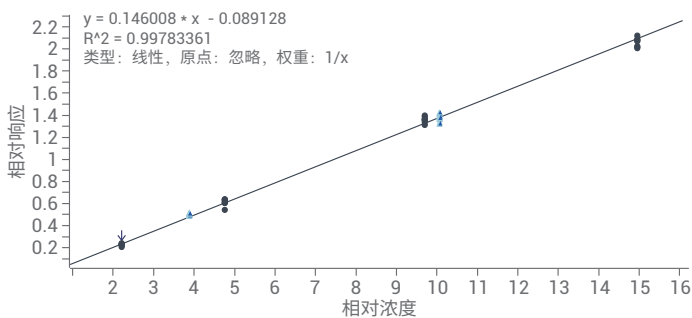


图 3. 同一医院两周的标准品 (黑色圆点) 线性良好，质控品 QC (蓝色三角点) 结果准确 (共 4 个校正浓度，32 个校正点；36 个 QC)

### 临床样品检测结果

基于 2011 年医学研究所报告的临床决策值，健康人群 25-OH VD (VD2 与 VD3 之和) 的最佳水平为 20–50 ng/mL，范围外提示健康风险。临床试验选取了两个地区一百多例病人血清样本进行检测，浓度分布为 12.71–111.19 ng/mL，均值约 30 ng/mL，仅有一半人群符合健康标准。另外，人群中 25-OH VD2 检测结果普遍很低，仅有 10 例样本达到 10 ng/mL 的定量下限，这一结果极可能与人群、地域和生活习惯相关。同时，普遍偏低的 25-OH VD2 检测结果，也提示我们可能需要改进前处理方法，比如适度浓缩或采用衍生化等方式，保证低浓度 25-OH VD2 定量的准确度。

### 结论

本研究表明，安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统可以提供高准确度、高稳定性的定量结果。同时，针对实际临床样本中 25-OH VD，尤其是 25-OH VD2 检测结果普遍偏低的问题，建议改进前处理方法，以期更适合真实样品的定量分析。

### 声明

此材料中所涉及的试验结果是安捷伦公司在一定条件下进行并得出的。此材料仅为一个技术参考以证明我们的仪器在一定条件下可以对目标检测物进行测试和分析。在临床上对患者的实际检测应遵守相关法规同时实验方法和条件也应根据实际情况进行优化。如果您有任何疑问，也可以咨询安捷伦客户服务中心。

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

安捷伦视界

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

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020  
2020年6月16日, 中国出版  
5994-2167ZHCN

