

SFC-LCMS8060 测定血清中的 25-OH 维生素 D3

SFC-004

摘要： 本文建立了一种使用岛津超临界色谱仪 Nexera UC 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用同时测定血清中 25-OH 维生素 D3 的含量，方法快速，安全。进样量低，使用内标法在 0.9 ng/mL~90.0 ng/mL 浓度范围内绘制标准曲线，线性良好，相关系数为 0.9993。对高中低三质控样品进行批次内以及批件监测，重现性低于 4.68%，重现性良好。

关键词： 超临界色谱 三重四极杆质谱仪 25-OH 维生素 D3

维生素 D(Vitamin D) 是儿童生长发育过程中必不可少的微量营养素，儿童处于生长发育的重要阶段，受到饮食习惯、饮食结构及生活方式等因素的影响，易出现维生素 D 水平异常，从而导致“隐性饥饿”。25-羟基维生素 D3 是维生素 D3 的一种活性形式，维生素 D3 是胆固醇的衍生物，其主要的活性形式是 1,25-二羟基维生素 D3。定量测定儿童维生素 D 浓度，动态监测血清维生素 D 水平变化，可用于儿童不同阶段体检时儿童维生素 D 营养状况监测，有助于儿童生长发育相关的影响因

素分析及营养指导方案制定。同时血清维生素 D 监测有助于相关疾病病程监测、病因和影响因素分析，可用于儿童佝偻病、呼吸道感染、支气管哮喘、肥胖、I 型糖尿病等疾病的病程监测、病因及影响因素分析，有助于临床治疗干预能方案的制定和疾病预防。目前多使用液相色谱质谱连用技术进行 25-羟基维生素 D3 的测定，使用 C8 色谱柱进行大体积进样分析。本文使用普通 C18 色谱柱，小体积进样即可实现分析检测，节省了样品消耗量，减少受检者采血损耗和痛苦。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超临界色谱仪 Nexera UC 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30ADSF 超临界 CO₂ 输液泵，LC-20ADXR 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，CTO-20A 柱温箱，SFC-30A 超临界色谱背压调节单元，CBM-20A 系统控制器，SIL-30AC 自动进样器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

超临界色谱条件

色谱柱：GL Science Inertsil® ODS-4 3.0×50 mm,

2 μm

改性剂：0.1%FA 甲醇 (Pump B)

流速：1.5 mL/min

出口压力：10 MPa

进样体积：1 μL

柱温：45.0°C

洗脱方式：梯度洗脱

时间程序：

Time	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	7
1.00	Pumps	Pump B Conc.	7
3.00	Pumps	Pump B Conc.	19
3.01	Pumps	Pump B Conc.	60
4.00	Pumps	Pump B Conc.	60
4.01	Pumps	Pump B Conc.	7
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：APCI(+)

离子源接口电压：+4.7 kV

雾化气：氮气 2.7 L/min

干燥气：氮气 4.8 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200℃

加热模块温度：300℃

接口温度：150℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100ms

延迟时间：10 ms

MRM 参数：见表 1

表1 化合物MRM参数

化合物名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
25-OH VitD3	19356 -17 -3	401.20	383.40	-29.0	-11.0	-15.0
			365.45*	-15.0	-12.0	-14.0
25-OH VitD3 -d3	—	404.20	386.35	-30.0	-10.0	-20.0

*为定量离子对

方法和结果

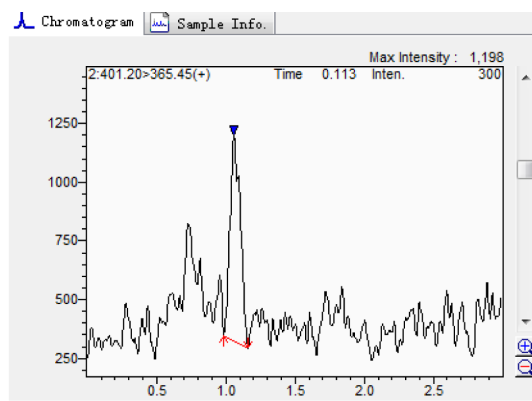
2.1 对照溶液与内标溶液的配制

以纯甲醇作为稀释剂，对 1.0 mg/mL 25-OH VitD3 及其 d3 内标化合物进行稀释，目标化合物稀释为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、及 100.0 ng/mL 储备液。内标化合物稀释为 200.0 ng/mL 储备液。取各系列浓度储备液 90 μL 及内标溶液 10 μL 混合，最终得到终浓度为 0.9、1.8、4.5、9.0、18.0、45.0、90 ng/mL 对照品溶液，内标浓度为 20 ng/mL。

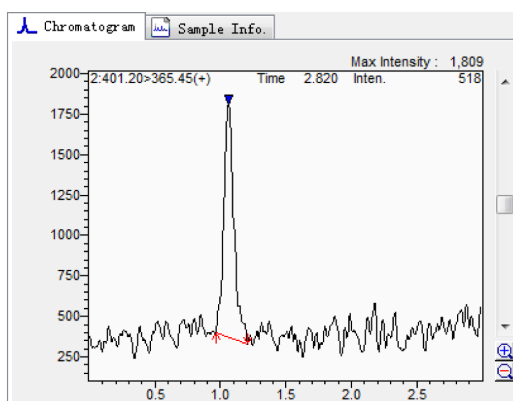
2.2 样品制备

样品前处理方法：取 100 μL 人血清，加入 10 μL 内标储备溶液，甲醇 200 μL，涡旋 1 min，加入正己烷 400 μL，涡旋 1 min。4℃下 12000 rpm 离心 10 min，回收上清液。室温 N₂ 吹干，100 μL 甲醇溶解残渣，直接上样分析。

2.3 25-OH VitD3 分析色谱图



(1)



(2)

图1 0.9 ng/mL(1)及1.8 ng/mL(2) 25-OH VitD3分析色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

按“2.1 对照溶液与内标溶液的配制”进行处理后进样。记录成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如下所示。较好的分离， $R_s > 1.5$ 。而乙醇做改性剂分析时间更短，效率更高。结果如下表 1 所示。

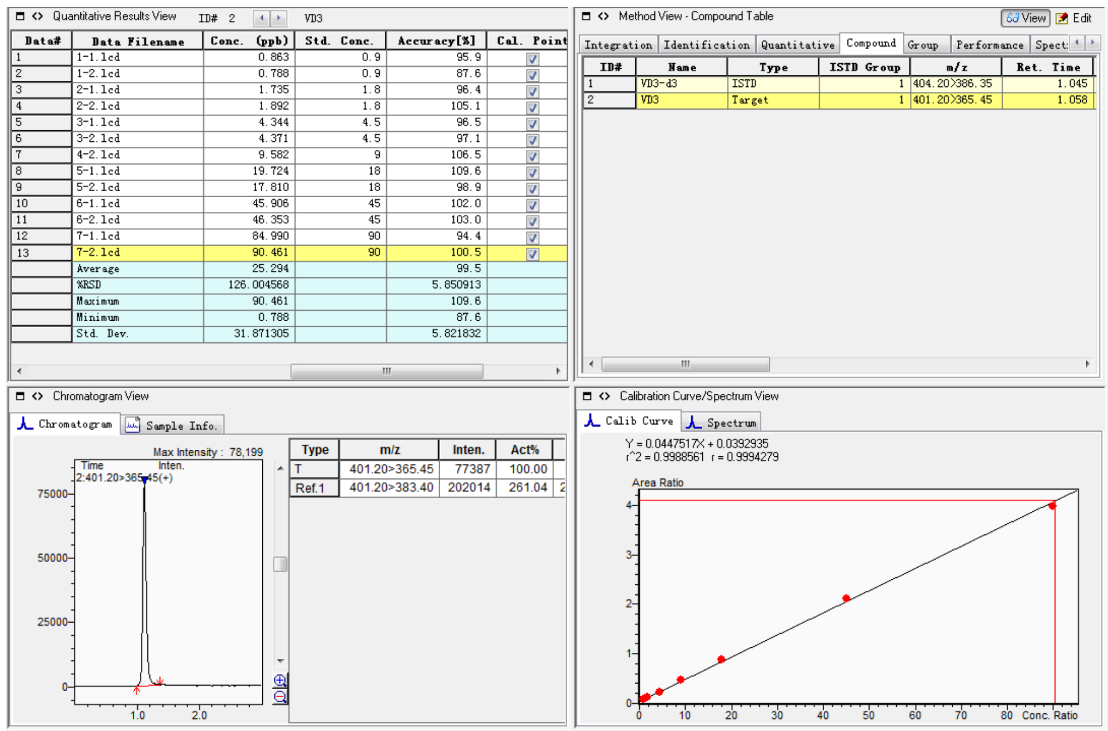


图2 25-OHvitD3线性关系及准确性

2.4.2 准确度及精密度

按“2.1 对照溶液与内标溶液的配制”配制 25-OH itaD3 高中低浓度 QC 样品，1.0、10.0、80.0 ng/mL。每个浓度进行 6 个样本分析，连续分析三批根据标准曲线，计算 QC 样品的测定浓度，与配制浓度做比，求得准确度及精密度，结果如表 3。

表3 精密度及准确度结果

基质	加入量 (ng/mL)	批内精密度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)	RSD (%)	批内精密度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)	RSD (%)	准确度 (%)
血清	1.0	1.092±0.043	4.13	1.040±0.049	4.68	95.5~115.0
	10.0	9.734±0.317	3.26	9.637±0.322	3.83	94.9~101.9
	80.0	80.964±1.746	2.70	81.059±0.802	2.62	98.5~101.8

2.5 样品测试结果

对 3 份来源不同的血清样品，按“2.2 样品制备”项下进行处理，进行双样本分析血清中 25-OHVitD3 的浓度，测定结果见表 4：

表4 样品测试结果

浓度 (ng/mL)	来源 A	来源 B	来源 C
样本 1	30.64	14.81	11.29
样本 2	31.34	14.67	11.06

■ 结论

采用岛津公司 Nexera UV 系统及 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪建立分析人血清中 25-OHVitD3 含量的方法。方法快速，简单，线性良好，重现性好，样品消耗量少。使用超临界色谱进行分离，分离速度快，溶剂消耗小，环境友好。方法能准确测定血清中 25-OH VitaD3 含量，所测数据可对临床检查及用药方案给予指导性意见。