

血清 25-羟基维生素 D₂ 和 D₃ 的检测
同位素稀释液相色谱串联质谱法

Measurement of serum 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ — Isotope dilution
liquid chromatography tandem mass spectrometry

2024 - 05 - 09 发布

2024 - 11 - 01 实施

前 言

本标准为您推荐性标准。

本标准代替WS/T 478—2015《血清25-羟基维生素D₃检测操作指南同位素稀释液相色谱串联质谱法》，与WS/T 478—2015相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了“范围”（见第1章，2015年版的第1章）；
- 更改了“术语和定义”（见第3章，2015年版的第3章）；
- 更改了“符号与缩略语”（见第4章，2015年版的第4章）；
- 更改了“检测原理和方法”（见第5章，2015年版的第5章）；
- 更改了“试剂和配制”（见第6章，2015年版的第6章）；
- 更改了“仪器”（见第7章，2015年版的第7章）；
- 更改了“样品”（见第8章，2015年版的第8章）；
- 更改了“检测系统和分析部分的准备”（见第9章，2015年版的第9章）；
- 更改了“方法的评价”（见第10章，2015年版的第10章）。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：首都医科大学附属北京世纪坛医院、中国医学科学院北京协和医院、上海市徐汇区中心医院、北京医院/国家卫生健康委临床检验中心、中南大学湘雅医院、北京大学人民医院、天津医科大学总医院、郑州大学第三附属医院。

本标准主要起草人：张曼、刘娜、邱玲、李水军、张江涛、易斌、岳志红、门剑龙、袁恩武、周慧。
本标准于2015年首次发布，本次为第一次修订。

血清 25-羟基维生素 D₂ 和 D₃ 的检测

同位素稀释液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了血清 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 检测的常规方法—同位素稀释液相色谱串联质谱法的技术要求，包括试剂配制、样品制备、仪器检测、数据分析等内容。

本标准适用于医疗机构临床实验室利用同位素稀释液相色谱串联质谱法检测血清 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

内标 internal standard

在定量分析时，加入到样品中作为参比物的已知量的化合物纯品。

3.2

检出限 limit of detection

检测方法在规定的实验条件下所能检出分析物的最低浓度。

3.3

定量检测下限 lower limit of measuring interval

在满足实验室对准确性和精密度要求的前提下，检测方法在规定的实验条件下所能准确定量检测分析物的最低可测量浓度或量。

3.4

线性 linearity

在给定的测量范围内，使测定结果与样品中分析物的量直接成比例的能力。此处的测定结果指最终的分析结果，而非仪器输出的原始信号。

[来源：WS/T 408—2012, 定义 2.2]

3.5

线性范围 linear range

使实验系统的最终分析结果为可接受的线性的浓度范围，此时非线性误差应低于允许误差。

[来源: WS/T 408—2012, 定义 2.3]

3.6

基质效应 matrix effect

标本中除分析物之外的样品性质对分析物测定结果的影响。

4 符号与缩略语

下列符号与缩略语适用于本标准。

25(OH)VD₂: 25-羟基维生素 D₂ (25-Hydroxyvitamin D₂)

25(OH)VD₃: 25-羟基维生素 D₃ (25-Hydroxyvitamin D₃)

BSA: 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)

CV: 变异系数 (coefficient of variation)

LOD: 检出限 (limit of detection)

LLMI: 定量检测下限 (lower limit of measuring interval)

MRM: 多反应监测 (multiple reaction monitor)

S/N: 信噪比 (signal to noise ratio)

5 检测原理和方法

本标准建立的 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 检测方法以同位素稀释液相色谱串联质谱法为检测原理。方法是以稳定同位素标记的 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 为内标添加至血清中, 内标与血清均匀混合后, 通过加入碳酸盐缓冲溶液释放出与蛋白结合的 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃, 加入正己烷-乙酸乙酯混合溶液将其从血清当中萃取出来, 将萃取液用氮气吹干, 用流动相初始比例溶液进行复溶。利用液相色谱串联质谱分离并检测血清 25(OH)VD₂、25(OH)VD₃ 和内标特异的离子对。通过建立的标准品工作曲线以 25(OH)VD₂、25(OH)VD₃ 与各自内标峰面积比计算血清 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 浓度。

6 试剂和配制

6.1 试剂

可选用的试剂如下:

- a) 水: 除非有特别说明, 应使用 GB/T 6682 定义的一级水;
- b) 甲醇: 色谱纯;
- c) 正己烷: 色谱纯;
- d) 甲酸: 色谱纯;
- e) 乙酸乙酯: 色谱纯;
- f) 磷酸氢二钠七水合物 (Na₂HPO₄·7H₂O): 分析纯, CAS 号: 7782-85-6;
- g) 磷酸二氢钠一水合物 (NaH₂PO₄·H₂O): 分析纯, CAS 号: 10049-21-5;
- h) 氯化钠: 分析纯, CAS 号: 7647-14-5;
- i) 碳酸钠: 分析纯, CAS 号: 497-19-8;
- j) 碳酸氢钠: 分析纯, CAS 号: 144-55-8;
- k) 牛血清白蛋白 (BSA): 纯度 ≥ 98%, M_r = 66 kDa, CAS 号: 9048-46-8;
- l) 氢氧化钠: 分析纯, CAS 号: 1310-73-2;
- m) 25(OH)VD₂ 标准品: 纯度 ≥ 98%, CAS 号: 21343-40-8;
- n) 25(OH)VD₃ 标准品: 纯度 ≥ 98%, CAS 号: 19356-17-3;
- o) 25(OH)VD₂-[²H₃]: 同位素标记纯度 ≥ 97%, CAS 号: 1217467-39-4
- p) 25(OH)VD₃-[²H₃]: 同位素标记纯度 ≥ 97%, CAS 号: 140710-94-7

6.2 配制溶液

6.2.1 空白基质溶液

模拟人血清基质的条件，选择适当离子强度、适当 pH 及蛋白成分的物质进行配制，尽量模拟人血清基质的环境。如获得人血清纯化后无 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 的空白基质为更佳。适用时，可采用下述方法进行：

- a) 称量 2.14 g Na₂HPO₄·7H₂O，0.268 g NaH₂PO₄·H₂O，0.9 g 氯化钠，5 g 牛血清白蛋白；
- b) 溶解于约 75 mL 水中；
- c) 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 到 7.4；
- d) 转移到 100 mL 容量瓶中；
- e) 加水定容至 100 mL。

该溶液 2℃~8℃ 稳定期为 1 个月，长期保存应加入防腐剂。

6.2.2 碳酸盐缓冲溶液配制

适用时，可采用下述方法进行配制：

分别配制浓度为 0.1 g/mL 的 NaHCO₃ 溶液 10 mL，0.1 g/mL Na₂CO₃ 溶液 40 mL，在不断搅拌的情况下向 NaHCO₃ 溶液中逐滴加入 Na₂CO₃ 溶液，同时测量混合溶液的 pH 值，直到混合溶液的 pH 值为 10.0，室温密封避光保存，稳定 3 个月。

6.2.3 正己烷-乙酸乙酯混合溶液

适用时，可采用下述方法进行配制：

将 200 mL 正己烷和 200 mL 乙酸乙酯混合得到体积比为 50:50 的正己烷-乙酸乙酯混合溶液，室温密封避光保存可稳定 3 个月。

6.2.4 内标溶液及标准溶液的制备

可根据生产厂商说明进行符合要求的相应调整，适用时，可采用下述方法进行配制。

6.2.4.1 内标工作液

配置方法如下：

分别取同位素标记的 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃，加入甲醇，配置浓度为 50 ng/mL 内标工作液。

6.2.4.2 标准品工作液

配制方法如下：

分别取 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 标准品，加入甲醇及空白基质溶液，配置浓度为 5 ng/mL，10 ng/mL，20 ng/mL，50 ng/mL，100 ng/mL，200 ng/mL 的标准品工作液。

6.2.5 流动相 A

适用时，可采用含 0.1% 甲酸的水溶液，配制方法为移取 300 mL 水，加入 0.3 mL 甲酸，混匀后超声排除液体中气泡。流动相宜根据每日使用量新鲜配制。

6.2.6 流动相 B

适用时，可采用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液，配制方法为移取 300 mL 甲醇，加入 0.3 mL 甲酸，混匀后超声排除液体中气泡。由于甲醇为易挥发溶剂，宜根据每日使用量进行配制。

6.2.7 质控品

质控品与待测样品应具有相似或相同的基质，具有较好的均匀性和稳定性。

7 仪器

7.1 液相色谱串联质谱检测系统

液相色谱串联质谱检测系统（以三重四极杆质谱仪为例）应满足以下使用要求：

- a) 高效液相色谱仪；
- b) 三重四极杆串联质谱仪，装配稳定的离子源，如大气压化学电离源 (APCI)、电喷雾电离源 (ESI) 等，各项参数指标符合正常工作的要求。

7.2 液相色谱柱

液相色谱柱应满足使用以下要求：

- a) 反相五氟苯基色谱柱或 C18 色谱柱等分离能力相当者，具有良好稳定性和重现性；
- b) 规格内径和理论塔板数满足使用要求。

7.3 天平

万分之一天平（最小分度 0.1 mg），应校准合格并在检定周期内。

十万分之一天平（最小分度 0.01 mg），应校准合格并在检定周期内。

7.4 离心机

水平转头离心机，离心力应满足 14000 *g*。

7.5 旋涡式混合器

适用于尖底离心管、圆底小玻璃瓶等的旋涡式混合装置。

7.6 吹干装置

可连接氮气源的吹干装置。

7.7 微量移液器

经校准合格的微量移液器，量程 200 μL ~1000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 移液器各一支。

7.8 通风设备

应配有必要的通风设备，如排风罩、通风橱等。

8 样品

8.1 通则

本方法适用于新鲜、冰冻或冻干血清样品的 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 浓度检测。

在处理样品时，应严格遵从对潜在生物传染性样品处理的相关规定，操作时遵循生物安全规则，并根据规定对废物进行处理。

8.2 样品用量

最小取样量不宜低于 0.1 mL。

8.3 样品的保存

新鲜血清样品若不立即检测，应于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，保存时间不超过 1 周。-20 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光可稳定保存 28 天，可根据试剂说明书进行符合要求的相应调整。使用前应在室温下避光将血清融化、充分混匀。冻干样品应按照说明书描述的使用期限和条件保存，临用前按照说明复融重组，充分混匀。

8.4 样品前处理（包括标准品工作液和待测血清样品）

可根据生产厂商说明进行符合要求的相应调整,适用时,可采用下述方法进行样品前处理:

- a) 移取血清样品或标准品工作液 0.1 mL, 分别加入 0.1 mL 内标工作液、0.1 mL 碳酸盐缓冲溶液, 充分混匀后静置 10 min;
- b) 加入正己烷-乙酸乙酯混合溶液 0.8 mL, 在涡旋混合仪上混匀 2 min;
- c) 3130 *g* 条件下离心 5 min;
- d) 充分吸取上清液转移至另一离心管中;
- e) 将离心管置于氮吹仪中, 适合的气流下氮气吹干;
- f) 加入流动相初始比例溶液 0.1 mL, 在涡旋混合仪上混匀 1 min;
- g) 14000 *g* 条件下离心 5 min;
- h) 取 0.08 mL 上清液至进样瓶中待测。

9 检测系统和分析部分的准备

9.1 液相色谱串联质谱检测系统的准备

9.1.1 液相系统部分准备

检测前应对液相系统进行准备, 包括:

- a) 流动相准备: 按照本标准第 6.2.5 条, 第 6.2.6 条准备流动相 A, 流动相 B, 超声除气 10 min~15 min;
- b) 色谱柱的平衡: 用合适的流动相比例(例如初始流动相比例)平衡色谱柱一定时间, 直至色谱柱压力达到平衡。

9.1.2 质谱系统部分的准备

检测前应对质谱系统进行性能检查, 包括:

- a) 最近 6 个月内进行过质量校准;
- b) 装配稳定的离子源, 如大气压化学电离源(APCI)、电喷雾电离源(ESI)等, 运行正常;
- c) 真空度达到正常工作要求的范围, 所需辅助气体纯度和压力(流量)符合要求、供应充足、气路通畅。

9.2 检测方法

9.2.1 液相色谱条件

9.2.1.1 液相色谱仪器条件

使用者可以实现目标物与其他分析物有效分离并获得良好峰型为原则进行条件优化, 包括:

- a) 色谱柱: 见本标准第 7.2 条;
- b) 流动相: 见本标准第 9.1.1 条;
- c) 流速: 0.5 mL/min;
- d) 进样量: 5 μ L;
- e) 柱温: 40 $^{\circ}$ C;
- f) 进样器温度: 6 $^{\circ}$ C。

9.2.1.2 液相色谱洗脱条件

使用者可根据实验需要进行条件优化, 见表 1。

表 1 液相色谱洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	35	65
1	20	80
2.5	20	80
2.51	0	100
4	0	100
4.01	35	65
5.5	35	65

9.2.2 质谱条件

使用者可以有效提高离子化效率为原则，优化离子源的类型、温度，以及雾化气、干燥气温度和流量等参数；以有效提高离子传输效率为原则，优化锥孔电压，碰撞能量等参数，进而实现提高检测灵敏度的目的，合理选择反应模式，使用者可根据实验需要进行条件优化，包括：

- a) 离子源：APCI；
- b) 离子化电压：5500 V；
- c) 气帘气：25 psi；
- d) 碰撞气：Medium；
- e) 雾化电流：5 μ A；
- f) 雾化温度：350 $^{\circ}$ C；
- g) 雾化气：60 psi；
- h) 驻留时间：0.1 s；
- i) 离子对 (MRM 模式)：见表 2

表 2 质谱条件

名称	定量/定性	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)
25(OH)VD ₂	定量	413.3	395.4	80	14
	定性	413.3	355.4	80	14
25(OH)VD ₂ -[² H ₃]	定量	416.3	398.3	78	12
	定性	416.3	358.4	78	14
25(OH)VD ₃	定量	401.4	383.5	90	13
	定性	401.4	365.5	90	16
25(OH)VD ₃ -[² H ₃]	定量	404.3	386.5	120	15
	定性	404.3	368.4	120	17

9.2.3 液相色谱串联质谱检测

按照以下步骤进行液相色谱串联质谱检测：

- a) 按照本标准第 8.4 条的方法对 25(OH)VD₂ 和 25(OH)VD₃ 标准品工作液和待测血清样品进行前处理，按照本标准第 9.2.1 条和第 9.2.2 条的条件进行液相色谱串联质谱参数设置和优化；
- b) 标准品工作液经前处理后，按照浓度由低到高顺序进行液相色谱串联质谱分析；

c) 待测血清样品进行前处理后, 进行液相色谱串联质谱分析。

9.2.4 结果计算

9.2.4.1 保留时间

25(OH)VD₂和25(OH)VD₃在液相色谱中保留时间可依使用的色谱柱性能不同而有差异, 建议分析物与标准品溶液保留时间差值小于0.1 min(6 s)。

9.2.4.2 工作曲线的建立

9.2.4.2.1 直线拟合

对25(OH)VD₂和25(OH)VD₃及同位素标记的25(OH)VD₂和25(OH)VD₃按表2分别提取MRM离子色谱图, 积分得各自的峰面积。以标准品定量离子峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 以标准品浓度与内标物浓度的比值为横坐标进行直线拟合, 按式(1)得到工作曲线参数*a*, *b*值。

$$\frac{A_{std}}{A_{is}} = a \times \frac{C_{std}}{C_{is}} + b \dots\dots\dots (1)$$

式中:

*A*_{std} ——标准品工作液中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃定量离子MRM积分峰面积;

*A*_{is} ——标准品工作液中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃内标物MRM积分峰面积;

*C*_{std} ——标准品工作液中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃的浓度;

*C*_{is} ——标准品工作液中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃内标物的浓度, 本方案中此浓度为50 ng/mL;

a ——拟合直线的斜率;

b ——拟合直线的截距。

直线拟合的相关系数 *r* > 0.99。

9.2.4.2.2 建立工作曲线

将本标准第9.2.4.2.1条中拟合得到的参数*a*, *b*带入式(2), 得到工作曲线。

$$\frac{A_{target}}{A_{is}} = a \times \frac{C_{target}}{C_{is}} + b \dots\dots\dots (2)$$

式中:

*A*_{target} ——血清样品中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃定量离子MRM积分峰面积;

*A*_{is} ——血清样品中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃内标物MRM积分峰面积;

*C*_{target} ——血清样品中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃的浓度;

*C*_{is} ——血清样品中25(OH)VD₂或25(OH)VD₃内标物的浓度, 本方案中此浓度为50 ng/mL;

a ——按照本标准第9.2.4.2.1条中拟合得到的直线斜率;

b ——按照本标准第9.2.4.2.1条拟合得到的直线截距。

9.2.4.3 血清样品中25(OH)VD₂和25(OH)VD₃浓度的计算

对血清样品中25(OH)VD₂和25(OH)VD₃及同位素标记的25(OH)VD₂和25(OH)VD₃按照表2分别提取MRM离子色谱图, 积分得各自的峰面积。根据本标准第9.2.4.2.2条得到的工作曲线, 可计算得到式(2)中*C*_{target}值, 即血清样品中25(OH)VD₂和25(OH)VD₃的浓度。

10 方法验证

10.1 说明

实验条件优化后, 需对方法进行多方面验证, 例如精密度、正确度、回收实验、线性、LLMI和基质效应等。

10.2 精密度

依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的精密度进行验证，定量检测下限浓度附近低值 CV < 20%，其余浓度 CV < 15%。

10.3 正确度

适用时，可利用有证标准物质或者其他规范性文件方案进行验证，正确度验证结果在靶值 ± 15% 范围内。

10.4 回收实验

依据已发布的行业标准等规范性文件进行回收实验，理论值为样本中内源性分析物与所加入的标准品浓度之和，检测值应在靶值 ± 15% 范围内。

10.5 线性

依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的线性进行验证：

例如检测血清样品的线性范围 5 ng/mL ~ 200 ng/mL。如收集到足量的更低浓度血清样品，经验证后，可扩大线性范围的低限；如获得加入纯物质的更高值人血清，经验证后，可扩大线性范围的高限。

注：受标本本身浓度限制，高值血清为人血清加入纯物质获得，低值血清为收集的人血清。

10.6 LLMI

在 $S/N \geq 3$ 条件下按照已发布的行业标准规范文件计算 LOD，推荐使用 3~5 个接近 LOD 浓度的样品，每个浓度至少检测 10 次。LLMI 和理论值偏差应在 ± 15% 以内，CV 应 < 20%。

10.7 基质效应

应依据行业内或专业领域认可的规范性文件，评价不同浓度时的基质效应。

10.8 稳定性

依据行业内或专业领域认可的规范性文件，评价样品、质控品及内标等稳定性，保证检测结果的稳定可靠。

参 考 文 献

[1] Mineva EM, Schleicher RL, Chaudhary-Webb M, et al. A candidate reference measurement procedure for quantifying serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(19): 5615-5624.

[2] Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of 25-Hydroxyvitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₂ in Human Serum Using Isotope—Dilution Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 1942-1948.

[3] Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2011, 57(3): 441-448.

[4] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods*; C62-A, 2014.
