

液相色谱-串联质谱法检测 25-羟维生素 D 标准化专家共识

中国老年保健医学研究会检验医学分会, 中国老年医学学会检验医学分会
中华检验医学杂志, 2021, 44(7): 587-595

临床血清维生素 D 检测方法主要为化学发光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 和液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。从检测原理出发, LC-MS/MS 是基于被测生物标志物本身分子量、结构等化学性质的直接分析法, 因此具有独特高灵敏度、高特异性和高通量特点。CLIA 是基于抗原抗体反应, 与 LC-MS/MS 相较, 前处理简单且检测自动化程度高, 但存在特异性低、线性范围窄和检测结果可比性差等问题。

目前 LC-MS/MS 检测 25-羟维生素 D [25(OH)D] 的方法大多为实验室自建方法, 虽然已有多类质谱检测试剂盒陆续上市, 但方法缺乏标准化。另外, 标准物质的缺乏或不适当使用、质量保证措施的不完整均可导致检测结果的偏差甚至错误。LC-MS/MS 检测血清 25(OH)D 方法的标准化是其在临床实验室成功应用的必要条件, 也是保证方法之间一致性和可比性的核心要素。本专家共识旨在建立标准化的血清 25(OH)D 检测方法, 从标准物质和内标物的选择、仪器与试剂的准备、检测方法注意事项、质量控制管理、人员要求及参考区间等方面提出建议。

术语及定义

1. 25(OH)D: 人体血液中维生素 D 的主要循环形式包括 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 其中 25(OH)D₃ 为主要存在形式, 因其稳定性好, 可作为评价人体维生素 D 水平的可靠指标。
2. 内标: 加入到待测样品中, 作为测定待测组分含量的参照标准及其已知质量或含量纯物质。
3. 标准物质: 具有足够均匀且稳定的特定特性物质, 其特性适用于测量及标称特性检查的用途。
4. 有证标准物质: 附有由权威机构发布文件, 提供使用有效程序获得且具有不确定度和溯源性的一个或多个特性值标准物质。
5. 定量下限 (limit of quantitation, LOQ): 在规定的测量条件下, 以指定的测量不确定度能测量的样品中可被测量的最低值。

维生素 D 主要代谢路径

人体维生素 D 主要来源于皮肤经阳光作用合成的维生素 D₃, 另一种来源是食物中 (如经光照后的蘑菇、野生海鱼等) 的维生素 D₂, 两者通过肝脏代谢后以 2 种形式存在, 分别是 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 虽然人体血液中超过 95% 的 25(OH)D 为 25(OH)D₃, 但仍存在少量 25(OH)D₂, 若补充外源性 25(OH)D₂, 则体内可检测出浓度较高的 25(OH)D₂, 因此需分别对 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 进行定量检测。25(OH)D 在肾脏和其他组织中转变为具有生物活性的二羟基代谢物 1, 25-羟基维生素 D [1, 25-(OH)₂D], 该物质经过维生素 D 结合蛋白转运至靶器官, 与维生素 D 受体结合, 从而发挥其生理作用 (图 1)。1, 25-(OH)₂D 在人体内的浓度低 (pg/ml 级别)、半衰期短, 检测难度较大, 而 25(OH)D 因其浓度高、稳定、半衰期较长, 是反映机体维生素 D 代谢的重要检测指标。

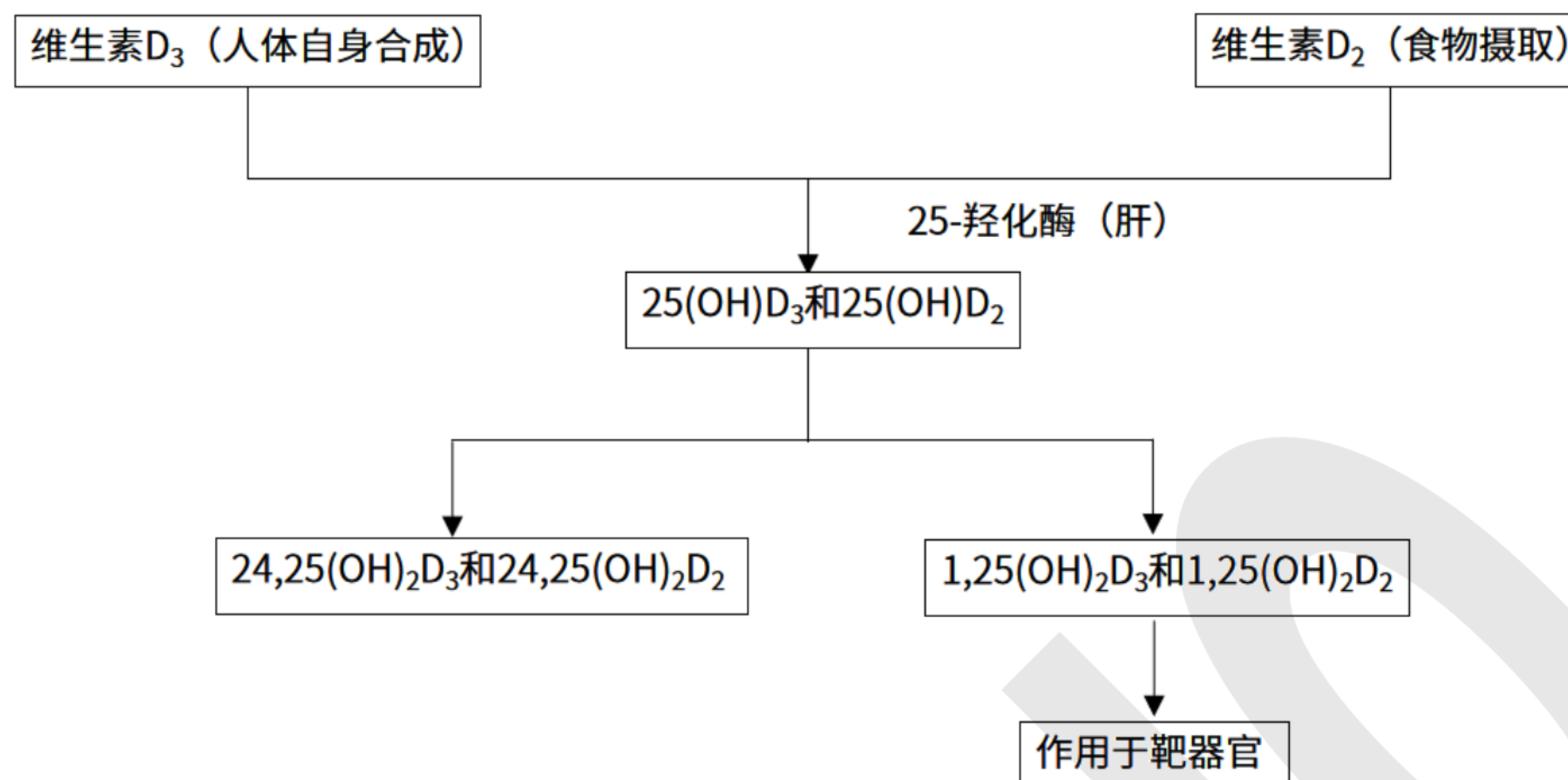


图 1 维生素 D 代谢途径

LC-MS/MS 技术

LC-MS/MS 是通过质量分析器测定带电粒子质荷比的一种分析技术；MS/MS 是将 2 个质量分析器由碰撞室串接起来的分析设备，即三重四极杆质谱仪。第一级质量分析器筛选出被离子化的样本中特定质荷比的母离子，母离子进入碰撞室，通过碰撞诱导解离的方式形成碎片离子；第二级质量分析器筛选出特异性强的定量离子及定性离子，子离子进入检测器监测，最终得到目标分析物的含量。每个母离子/子离子对被称为 1 个离子对，只有具有特定离子对的待测物质，才能进入检测器。因此，MS/MS 具有很好的检测特异性。此外，质谱方法具有同时监测多离子通道多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 的独特优势，即使在检测背景信号高的内源性化合物时，亦可通过同时监测 2 个离子碎片通道，实现待测物质的精准检测。

关键质量要素

1. 标准物质的选择

具有溯源性的有证标准物质是实现量值溯源、检测结果准确一致的重要保证。应选用国家级权威机构有的证标准物质，若不可获得相关权威机构或国际公认的有证标准物质，则其他获得相关国家认可委员会标准物质生产者认可的提供明确溯源途径和测量不确定度的标准物质可作为替代选择。

表 1 25-羟基维生素 D 标准物质信息

机构	标准物质	货号/编码
中国计量科学研究院	冰冻人血清中 25-羟基维生素 D 标准物质	NIM-RM3698-3700
	25-羟基维生素 D 校准溶液	SRM 2972a
美国国家标准和技术研究院	冰冻人血清中维生素 D 代谢物	SRM 972a
	冰冻人血清中维生素 D 代谢物 (高浓度)	SRM 2973
美国 Cerilliant 公司	25-羟基维生素 D ₂	H-073
	25-羟基维生素 D ₃	H-083

2. 内标物的选择

1) 内标物的作用

内标物可用于校正基质效应以及样本前处理、色谱分离和离子化过程引入的偏差，有助于提高定量分析的准确度和精密度。

2) 推荐内标

推荐使用 25(OH)D 的稳定同位素标记物作为内标品，一般有：氘代或 ^{13}C 同位素内标。

3) 内标物要求

内标物至少比目标分析物大 3 个分子量。内标物化学纯度 $\geq 98\%$ ，同位素标记纯度 $\geq 97\%$ ，如果低于该纯度，则其未标记的化合物浓度会与 25(OH)D₂ 或 25(OH)D₃ 的检测下限接近，导致检测结果系统性偏高。必要时应对内标物纯度进行测试，以避免其中含有与目标分析物共洗脱且具有相同质量数的干扰物质。

表 2 可选内标品信息

机构或组织	内标品	产地	货号
Iso Sciences	25-羟基维生素 D ₂ -d ₃	美国	4176
西格玛-奥德里奇 (Sigma-Aldrich)	25-羟基维生素 D ₂ -d ₃	美国	705888
剑桥同位素 (Cambridge isotope laboratories)	25-羟基维生素 D ₃ -d ₆	美国	DLM-7708
多伦多化学 (Toronto Research Chemicals)	25-羟基维生素 D ₃ -d ₆	加拿大	C125702
曼哈格 BePure	25-羟基维生素 D ₂ -d ₃	中国	MD-0005
	25-羟基维生素 D ₂ -d ₆	中国	MD-0005D6
	25-羟基维生素 D ₂ - $^{13}\text{C}_3$	中国	MC-0005
	25-羟基维生素 D ₃ - $^{13}\text{C}_3$	中国	MC-0010
	25-羟基维生素 D ₃ -d ₃	中国	MD-0010
贝塔医药	25-羟基维生素 D ₃ -d ₆	中国	MD-0011D6
	25-羟基维生素 D ₂ -d ₆	中国	BTS-VD2-d6
	25-羟基维生素 D ₃ -d ₆	中国	BTS-VD3-d6

注：因 25(OH)D₂-d₆[m+1]⁺(m/z 419) 脱水形成的子离子(m/z 401) 与 25(OH)D₃ 的分子离子峰[m+1]⁺(m/z 401) 有相同质荷比，易与 25(OH)D₃ 特别是其异构体 3-epi-25(OH)D₃ 检测发生干扰，一般建议在使用氘代内标时选用 25(OH)D₂-d₃ 作为内标。

3. 样本前处理方法的选择

生物样本分析的主要障碍包括浓度低、干扰大、个体差异大等，样品处理目的主要是去除样品中的杂质，富集样品。针对血清 25(OH)D 的检测，如果仪器灵敏度高，蛋白沉淀法可作为首选的样品处理方法，具有耗时少，简单、经济等优点，但需要进行适当的色谱分离，以减少基质效应。固液萃取 (solid liquid extraction, SLE) 和固相萃取法 (solid phase extraction, SPE) 虽然可以去除样品的基质及富集样品，但其洗脱效率容易受到洗脱耗材批次差异的影响，需要进行不同厂家及不同批次的比对。

4. 色谱条件选择

根据被测化合物的特性，进行流动相的优化，尽量避免使用非挥发性盐、无机酸、表面活性剂等流动相添加剂，尽量不用或少用极低浓度 (<0.02%) 的流动相添加剂。此外，25(OH)D₃ 与 3-epi-25-羟基维生素 D₃ [3-epi-25(OH)D₃] 为同分异构体。在学龄儿童体内，3-epi-25(OH)D₃ 占 25(OH)D 的 2.5%~17%，在出生后前 3 个月婴儿体内，3-epi-25(OH)D₃ 浓度

较高，占 25(OH)D 浓度的 60%，在成人中占比较低，偶尔可高达 22%。25(OH)D₂ 与 3-epi-25(OH)D₃ 质荷比一致，导致无法通过质谱直接分离，一般可通过色谱分离的方式使这 2 种分析物具有不同保留时间；当分离度达到 1.5 时，可忽略 3-epi-25(OH)D₃ 对 25(OH)D₂ 检测的影响。如果需要进行 3-epi-25(OH)D₃ 的分离，则需确保色谱条件可以实现其与 25(OH)D₂ 的基线分离，参考谱图见图 2。

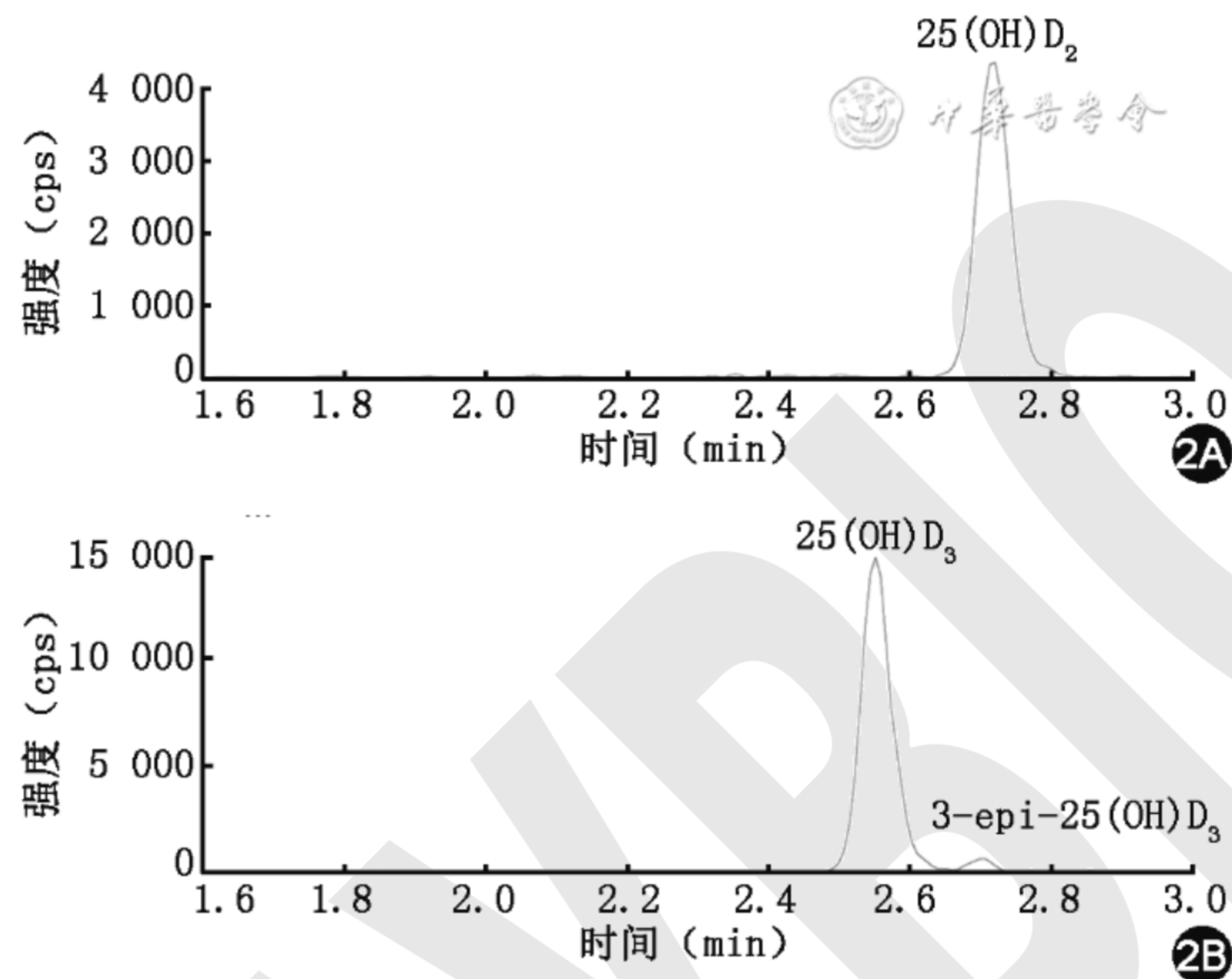


图 2 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 检测色谱图

5. 质谱参数选择

LC-MS/MS 定量分析推荐一个分析物使用 2 个离子通道，分别作为定量离子通道和定性离子通道。25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 是水解代谢产物，热不稳定及离子化过程中也容易形成脱水离子。需要注意的是其在基质中的背景噪音偏高，应避免选择脱水的子离子碎片（即母离子减少 18 的碎片离子）。但如果大气压化学电离源作为离子化模式，其在离子源中完全脱水形成稳定的脱水离子可以作为母离子。在任何给定时间内监测到的离子对通道越多，单个色谱峰可采集到的数据点就越少，如果用于表征色谱峰面积的数据点数量不足，数据的可靠性可能会受到影响，扫描时间单个色谱峰包含至少 10 个（建议 15~20 个）数据点。此外，优化离子通道内延迟时间，以避免碎片离子间发生交叉干扰。初步确定碰撞池电压和碰撞池能量后，建议使用提取样本进样以获得基质样本中最佳信噪比的碎片离子。

25(OH)D 检测

1. 试剂

(1) 二类 25-羟维生素 D 检测试剂盒：可溯源至可获得的最高级别标准物质。

(2) 标准曲线：建议 25(OH)D₂ 的标准曲线范围至少包含 2~100 ng/mL 区间，25(OH)D₃ 的标准曲线范围至少包含 5~250 ng/mL 区间，并且在选定的标准曲线范围内一般分散设置 4~5 个浓度点。

(3) 质控样本：单独配制质控样本的初级工作液。质控样本基质应尽量和患者样本基质保持一致，以减小样本处理和离子化中的基质效应。建议配制 2~3 个浓度质控样本，浓度范围建议在临床参考区间的基础上（分布于正常和异常参考区间），结合分析方法的标准曲线

综合设定，通常为标准曲线中 3 倍左右的 LOQ、中间浓度±20%和 70%~80%的定量上限，以确保不同浓度未知样本的准确性。

2. 样本要求

本方法适用于新鲜、冷冻或冻干血清样本的 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 浓度检测。

3. 参考区间

表 3 不同文献规定的 25(OH)D 的临床参考区间

来源	正常		缺乏		不足		严重不足	
	ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
WS/T 677-2020 人群维生素 D 缺乏 筛查方法	≥20	≥50	≥12~<20	≥30~<50	<12	<30	-	-
维生素 D 及其类似物临床应用共识	>30	>75	20~30	50~75	<20	<50	<10	<25

注：“-”表示引文中无此项内容。

4. 报告发布

根据《GB/T 22576.1-2018/ISO 15189:2012》进行检测结果的报告发布，报告前综合评估：质控是否在控，与此前结果是否一致，样本质量等因素进行综合考量。此外，建议各实验室报告单上分别显示 25(OH)D₂、25(OH)D₃ 和 25(OH)D 的含量。

参考文献

- GreavesRF. A guide to harmonisation and standardisation of measurands determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in routine clinical biochemistry[J]. Clin Biochem Rev, 2012, 33(4): 123-132.
- CouchmanL, BentonCM, MonizCF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the devil is in the detail[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(15-16): 1239-1243. DOI: 10.1016/j.cca.2012.04.003.
- BunkDM. Reference materials and reference measurement procedures: an overview from a national metrology institute[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(4): 131-137.
- LynchKL. CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2016, 62(1):24-29. DOI: 10.1373/clinchem.2015.238626.
- 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(10): 770-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.10.009.
- 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. 检验医学, 2019, 34(3): 189-196. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2019.03.001.
- 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 维生素 D 及其类似物的临床应用共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(3): 187-200. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2018.03.002.
- 秦建华, 王莉. 维生素 D 缺乏和心血管疾病危险因素关系的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(2):279-283. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2016.02.028.
- LangPO, SamarasD. Aging adults and seasonal influenza: does the vitamin d status (h)arm the body?[J]. J Aging Res, 2012, 2012:806198. DOI: 10.1155/2012/806198.
- MartineauAR, JolliffeDA, HooperRL, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data[J]. BMJ, 2017, 356:i6583. DOI: 10.1136/bmj.i6583.
- 袁小芬, 马金飞, 杨青青, 等. 液相色谱-串联质谱技术在维生素检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6): 479-483. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.015.
- BergerSE, VanRompay MI, GordonCM, et al. Investigation of the C-3-epi-25(OH)D₃ of 25-hydroxyvitamin D₃ in urban schoolchildren[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2018, 43(3): 259-265. DOI: 10.1139/apnm-2017-0334.
- van den OuwelandJM, BeijersAM, van DaalH. Overestimation of 25-hydroxyvitamin D₃ by increased ionisation efficiency of 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ in LC-MS/MS methods not separating both metabolites as determined by an LC-MS/MS method for separate quantification of 25-hydroxyvitamin



- D3, 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 967:195-202. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.021.
14. GB-T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
15. 国家卫生和计划生育委员会. WS-T 225-2018 临床化学检验血液标本的收集与处理规范[S]. 北京:中国标准出版社, 2002.
16. 国家卫生健康委员会. WS/T 677-2020 人群维生素 D 缺乏筛查方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2020.
17. 李水军. 液相色谱-质谱联用技术临床应用[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2014.
18. 国家卫生健康委员会. WS/T 641-2018 临床检验定量测定室内质量控制标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
19. 国家卫生健康委员会. WS/T 644-2018 临床检验室间质量评价[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
20. 国家卫生和计划生育委员会. WS/T 414-2013 室间质量评价结果应用指南[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.

OKAYBIO