



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105527364 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201510530370. 0

(22) 申请日 2015. 08. 26

(71) 申请人 袁洪

地址 410013 湖南省长沙市岳麓区桐梓坡路  
138 号中南大学湘雅三医院

(72) 发明人 袁洪 郭成贤 江涛 刘湘军

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责  
任公司 43113

代理人 卢宏 周栋

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006. 01)

G01N 30/06(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

超高效液相色谱串联质谱检测血清 25 羟基  
维生素 D 的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种高灵敏高通量超高效液相色谱串联质谱仪检测 25 羟基维生素 D 的方法。向血清样品中加入 25 羟基维生素 D 的内标物,加入硫酸锌溶液和甲醇溶液进行蛋白沉淀;充分混匀后加入正己烷溶剂萃取;再充分混匀后离心,接着移取上清液并进行氮气吹干,加入复溶液,得到待测样品;对待测样品用超高效液相色谱串联四级杆质谱仪进行检测;以 25 羟基维生素 D<sub>2</sub>和 / 或 25 羟基维生素 D<sub>3</sub>的定量离子对及定性离子对的保留时间为定性依据,采用内标标准曲线法定量。本发明前处理简单,特异性、抗基质干扰能力强;检测时间短,通量高,检测精密度、灵敏度高,成本低廉。

1. 超高效液相色谱串联质谱检测血清25羟基维生素D的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1)向血清样品中加入体积为血清样品体积1/15至2/15的25羟基维生素D的内标物,加入硫酸锌溶液和甲醇溶液进行蛋白质沉淀;充分混匀后加入正己烷溶剂萃取;再充分混匀后离心,得到上清液和沉淀,移取上清液后用氮气吹干沉淀,再加入复溶液,得到待测样品;所述25羟基维生素D内标物包含<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>;所述复溶液为甲醇和水按7:(2—4)的体积比混合的混合液;

其中,所述血清样品、硫酸锌溶液、甲醇溶液、正己烷溶剂的体积比为1:(0.8—1.2):(1.8—2.2):(4—6);所述复溶液与血清样品的体积比为1:(1.8—2.2);

(2)对待测样品用超高效液相色谱串联四级杆质谱仪进行检测。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)所述质谱采用正离子模式,并采用多反应监测离子扫描MRM的扫描方式;

所述正离子模式中,内标定量离子对包括<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和/或<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对;目标定量离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对;目标定性离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定性离子对和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>定性离子对;

内标定量离子对的多反应监测离子扫描MRM的质荷比条件为:

<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对的母离子的质荷比为419.3,对应的子离子的质荷比为83.1;

<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对的母离子的质荷比为407.3,对应的子离子的质荷比为159.1;

目标定量离子和目标定性离子的多反应监测离子扫描MRM的质荷比条件为:

25羟基维生素D<sub>2</sub>的母离子的质荷比为413.35,对应的定量离子的质荷比为395.3,定性离子的质荷比为83.1;

25羟基维生素D<sub>3</sub>的母离子的质荷比为401.35,对应的定量离子的质荷比为383.3,定性离子的质荷比为159.1;

所述液相色谱采用梯度洗脱模式,液相色谱条件为:

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18Column(2.1x50mm,1.7μm);

色谱柱柱温:45°C;

进样量:20ul;

流速:0.4ml/min;

流动相:流动相A为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的水,流动相B为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的甲醇;

<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为3.09min,<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>2</sub>的保留时间为3.16min;

(3)以25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为定性依据,判断25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的存在;

依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>与对应内标物在内标标准曲线上的峰面积比值,计算血清样品中的25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述反应监测离子扫描MRM的锥孔电压、驻留时间、碰撞能量条件如下:

物质	锥孔电压 (单位 V)	驻留时间 (单位 S)	碰撞能量 (单位 V)
25 羟基维生素 D <sub>2</sub>	24	0.05	10
25 羟基维生素 D <sub>2</sub>	24	0.05	22
25 羟基维生素 D <sub>3</sub>	24	0.05	10
25 羟基维生素 D <sub>3</sub>	24	0.05	28
<sup>6</sup> d-25 羟基维生素 D <sub>2</sub>	24	0.05	22
<sup>6</sup> d-25 羟基维生素 D <sub>3</sub>	24	0.05	28

4. 根据权利要求2所述的方法,所述梯度洗脱的条件如下:

时间 (单位 min)	A 流动相比例 (%)	B 流动相比例 (%)
0.00	27	73
2.00	27	73
3.50	2	98
3.51	27	73
6.00	27	73

5. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述质谱中质谱离子源参数如下:

电离源:电喷雾电离ESI源;

脱溶剂气温度:400°C;

脱溶剂气流速:900L/Hr;

离子源温度:120°C;

毛细管电压:2500V。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述离心的条件为:在室温下,以13000r/min的速度离心5—10min。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述用氮气吹干沉淀是通入45—55°C的氮气直至沉淀干燥。

## 超高效液相色谱串联质谱检测血清25羟基维生素D的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及维生素D检测的技术领域,特别涉及一种超高效液相色谱串联质谱检测血清25羟基维生素D的方法。

### 背景技术

[0002] 维生素D为脂溶性非必需维生素,是固醇类衍生物,25羟基维生素D是维生素D在肝微粒体25羟化酶的作用下转化形成,由于其与维生素D的其他代谢产物相比,在血液中的浓度高且循环周期长,而成为维生素D体内浓度的良好指示剂,是人体维生素D营养状况的评价指标。

[0003] 维生素D家族成员中最重要的是维生素D<sub>2</sub>和维生素D<sub>3</sub>。维生素D<sub>2</sub>多含于植物性食物中,它是植物的麦角固醇经阳光照射而合成。维生素D<sub>3</sub>占人体总量90%–95%,主要是由皮肤内的7-脱氢胆固醇在特定波长的紫外线照射作用下合成,也可通过食物摄取获得。维生素D具有调节人体血清钙磷代谢,维持骨骼和肌肉的正常生理作用。随着对于维生素D的深入研究发现,人群中维生素D缺乏普遍存在,且维生素D缺乏与各类疾病的发生和发展密切相关,比如肥胖、高血压、糖尿病、心梗等心血管疾病和代谢综合征疾病。因此维生素D缺乏与各类疾病的相互关系引起国内外研究机构的广泛关注。

[0004] 传统的25羟基维生素D检测方法有放射免疫分析法、酶联免疫法、化学发光法、电化学发光法和高效液相色谱法等。但主要存在如下问题:第一,由于25羟基维生素D在人体内主要与血清结合蛋白结合,人体内存在大量的高亲和力结合蛋白,因此检测存在严重的基质干扰。而传统的放射免疫法和发光法,不能有效去除基质干扰;第二,现有检测技术前处理过程复杂、方法特异性差;第三,免疫法有时存在交叉反应,出现假阳性结果,同时发光法存在发光效率低等问题。因此免疫法和发光法不能同时准确定量25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量,无法给出准确的25羟基维生素D的总含量;第四,上述传统方法整个检测过程时间长、通量低。

[0005] 因此,需要分析领域技术人员迫切解决的一个问题就是:如何提供一种适合用于人体血清的25羟基维生素D的检测方法。相比传统免疫法和液相色谱法,液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)能够解决上述问题,目前国际普遍认为LC-MS/MS是检测血清中25羟基维生素D的“金标准”。然而该“金标准”处理过程复杂,灵敏度和精密度有待进一步提高。

### 发明内容

[0006] 本发明旨在解决现有技术的不足,提供一种适用于人体血清的25羟基维生素D的检测方法,能够有效去除基质干扰,快速检测。

[0007] 为了达到上述目的,本发明提供的技术方案为:

[0008] 超高效液相色谱串联质谱检测血清25羟基维生素D的方法包括如下步骤:

[0009] (1)向血清样品中加入体积为血清样品体积1/15至2/15的25羟基维生素D的内标物,加入硫酸锌溶液和甲醇溶液进行蛋白质沉淀;充分混匀后加入正己烷溶剂萃取;再充分

混匀后离心,得到上清液和沉淀,移取上清液后用氮气吹干沉淀,再加入复溶液,得到待测样品;所述25羟基维生素D内标物包含<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>;所述复溶液为甲醇和水按7:(2—4),优选7:3的体积比混合的混合液;

[0010] 其中,所述血清样品、硫酸锌溶液、甲醇溶液、正己烷溶剂的体积比为1:(0.8—1.2):(1.8—2.2):(4—6),优选1:1:2:5;所述复溶液与血清样品的体积比为1:(1.8—2.2),优选1:2;

[0011] (2)对待测样品用超高效液相色谱串联四级杆质谱仪进行检测。

[0012] 优选地,步骤(2)所述质谱采用正离子模式,并采用多反应监测离子扫描MRM的扫描方式;

[0013] 所述正离子模式中,内标定量离子对包括<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对;目标定量离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对;目标定性离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定性离子对和25羟基维生素D<sub>3</sub>定性离子对;

[0014] 内标定量离子对的多反应监测离子扫描MRM的质荷比条件为:

[0015] <sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对的母离子的质荷比为419.3,对应的子离子的质荷比为83.1;

[0016] <sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对的母离子的质荷比为407.3,对应的子离子的质荷比为159.1;

[0017] 目标定量离子和目标定性离子的多反应监测离子扫描MRM的质荷比条件为:

[0018] 25羟基维生素D<sub>2</sub>的母离子的质荷比为413.35,对应的定量离子的质荷比为395.3,定性离子的质荷比为83.1;

[0019] 25羟基维生素D<sub>3</sub>的母离子的质荷比为401.35,对应的定量离子的质荷比为383.3,定性离子的质荷比为159.1;

[0020] 所述液相色谱采用梯度洗脱模式,液相色谱条件为:

[0021] 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 Column(2.1 x 50mm,1.7μm);

[0022] 色谱柱柱温:45°C;

[0023] 进样量:20ul;

[0024] 流速:0.4ml/min;

[0025] 流动相:流动相A为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的水,流动相B为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的甲醇;

[0026] <sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为3.09min,<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>2</sub>的保留时间为3.16min;

[0027] (3)以25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为定性依据,判断25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的存在;

[0028] 依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>与对应内标物在内标标准曲线上的峰面积比值,计算血清样品中的25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量。

[0029] 另外,所述反应监测离子扫描MRM的锥孔电压、驻留时间、碰撞能量条件如下:

[0030]

物质	离子对	锥孔电压(V)	驻留时间(S)	碰撞能量 (V)
25OHD <sub>2</sub>	413.35>395.3*	24	0.05	10
25OHD <sub>2</sub>	413.35>83.1	24	0.05	22
25OHD <sub>3</sub>	401.35>383.3*	24	0.05	10
25OHD <sub>3</sub>	401.35>159.1	24	0.05	28
d6-25OHD <sub>2</sub>	419.35>83.1	24	0.05	22
d6-25OHD <sub>3</sub>	407.35>159.1	24	0.05	28

[0031] 其中,\*代表定量离子对

[0032] 所述梯度洗脱的条件如下:

时间 (单位 min)	A 流动相比例 (%)	B 流动相比例 (%)
0.00	27	73
2.00	27	73
3.50	2	98
3.51	27	73
6.00	27	73

[0033] [0034] 所述质谱中质谱离子源参数如下:

[0035] 电离源:电喷雾电离ESI源;

[0036] 脱溶剂气温度:400°C;

[0037] 脱溶剂气流速:900L/Hr;

[0038] 离子源温度:120°C;

[0039] 毛细管电压:2500V。

[0040] 优选地,步骤(1)中所述离心的条件为:在室温下,以13000r/min的速度离心5—10min。步骤(1)所述用氮气吹干沉淀是通入45—55°C的氮气直至沉淀干燥。

[0041] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0042] 本发明应用超高效液相色谱串联质谱仪进行检测,本发明可以同时定性或定量检测出人血清中的25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>;

[0043] 本发明通过硫酸锌溶液联合甲醇溶液进行蛋白质沉淀,通过正己烷液液萃取,氮气吹干复溶后便可以用超高效液相色谱串联四级杆质谱仪进行检测;

[0044] 本发明前处理简单,并且可以有效去除基质干扰,特异性、抗基质干扰能力强;

[0045] 本发明应用超高效液相色谱串联质谱仪进行检测,检测时间短,通量高,检测灵敏度、精密度高,成本低廉。

[0046] 总之,本发明采用蛋白质沉淀和液液萃取法得到25羟基维生素D提取液,利用超高效液相色谱串联质谱仪进行检测,同位素稀释法定量。满足前处理简单,能有效去除基质干扰,同时准确定量检测25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>,并且整个检测过程时间短,通量高。相比目前已报道的LC-MS/MS法检测25羟基维生素D的文献,本发明前处理更简单,不需要进行固相萃取净化操作或者在线固相萃取仪等贵重仪器,灵敏度和精密度更高,满足临床检测要求。另外,相比常规的液相色谱柱,超高效色谱柱的填料颗粒更细,同时耐压能力

更强,检测灵敏度更高,可以快速检测,缩短分析时间,因此本发明在采用LC-MS/MS方法的前提下,优化前处理过程和仪器设置参数,同时优化了LC-MS/MS方法中的流动相和梯度条件,进而改善了色谱峰的峰形和响应值,使得25羟基维生素D的检测灵敏度显著提高,适合临床推广。

#### 附图说明

[0047] 图1是25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的定量限(S/N=10)。

#### 具体实施方式

[0048] 实施例1

[0049] 所述超高效液相色谱串联质谱仪检测25羟基维生素D的方法实包括如下步骤:

[0050] (1)前处理:

[0051] 向人体血清样品中加入25羟基维生素D的内标物,加入硫酸锌溶液和甲醇溶液进行蛋白质沉淀;充分混匀后加入正己烷溶剂萃取;再充分混匀后离心,接着移取上清液并进行氮气吹干,加入复溶液,得到待测样品;

[0052] 其中,所述人血清样品与所述硫酸锌溶液、甲醇溶液、正己烷萃取溶液的体积比为1:1:2:5;所述上清液与对应的原溶液的体积比为1:1;所述复溶液与人血清样品的体积比为1:2。

[0053] 25羟基维生素D内标物可以包括d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>。即可以只包括d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>,也可以只包括d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>,也可以同时包括d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>和d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>。

[0054] 如果只检测25羟基维生素D<sub>2</sub>(25OHD<sub>2</sub>),则可以只添加d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>;如果只检测25羟基维生素D<sub>3</sub>(25OHD<sub>3</sub>),则可以只添加d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>;

[0055] 如果同时检测25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>,则可以同时添加d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>和d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>。

[0056] 对加入正己烷后的溶液的离心条件为:13000r/min的速度离心5min。

[0057] 对移取的上清液干燥的条件为:通50°C的氮气直至干燥。

[0058] 所述复溶液为甲醇和水的混合物,其中,甲醇和水的体积比为70:30。

[0059] (2)检测;

[0060] 对所述待测样品采用超高效液相色谱串联四级杆质谱仪进行检测;

[0061] 所述检测采用正离子模式,扫描方式采用多反应监测离子MRM;

[0062] MRM:Multiple Reaction Monitor,指多反应监测离子扫描;

[0063] 其中,内标定量离子对包括d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和/或d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对;

[0064] 具体的,当检测d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>时,采用d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>的定量离子对;

[0065] 当检测d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>时,采用d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>的定量离子对;

[0066] 当同时检测d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>和d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>,采用d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>2</sub>的定量离子对和d<sup>6</sup>-25羟基维生素D<sub>3</sub>的定量离子对;

[0067] 目标定量离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子

对;目标定性离子对包括25羟基维生素D<sub>2</sub>定性离子对和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>定性离子对;

[0068] 具体而言,对25羟基维生素D<sub>2</sub>进行检测时,采用25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和25羟基维生素D<sub>2</sub>定性离子对;

[0069] 对25羟基维生素D<sub>3</sub>进行检测时,采用25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对和25羟基维生素D<sub>3</sub>定性离子对;

[0070] 同时对25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>进行检测时,分别采用25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对和25羟基维生素D<sub>2</sub>定性离子对及25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对和25羟基维生素D<sub>3</sub>定性离子对;

[0071] 内标定量离子对的多反应监测离子扫描MRM的条件包括:

[0072] <sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>定量离子对的母离子的质荷比为407.3,对应的子离子的质荷比为159.1;

[0073] <sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>定量离子对的母离子的质荷比为419.3,对应的子离子的质荷比为83.1;

[0074] 目标定量离子的多反应监测离子扫描MRM的条件包括:

[0075] 25羟基维生素D<sub>3</sub>的母离子的质荷比为401.35,对应的定量离子的质荷比为383.3,定性离子的质荷比为159.1;

[0076] 25羟基维生素D<sub>2</sub>的母离子的质荷比为413.35,对应的定量离子的质荷比为395.3,定性离子的质/荷比为83.1;

[0077] 其中,所述液相色谱采用梯度洗脱模式,液相色谱条件包括:

[0078] 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 Column(2.1 x 50mm,1.7μm);

[0079] 色谱柱柱温:45°C;

[0080] 进样量:20ul;

[0081] 流速:0.4ml/min;

[0082] 梯度模式洗脱中流动相包括:A流动相为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的水,B流动相为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的甲醇。

[0083] 采用上述流动相,在梯度洗脱中,25羟基维生素D<sub>2</sub>的保留时间为3.16min,25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为3.09min。

[0084] 多反应监测离子扫描MRM的条件如下:

	物质	离子对	锥孔电压(V)	驻留时间(S)	碰撞能量 (V)
	25OHD <sub>2</sub>	413.35>395.3*	24	0.05	10
[0085]	25OHD <sub>2</sub>	413.35>83.1	24	0.05	22
	25OHD <sub>3</sub>	401.35>383.3*	24	0.05	10
	25OHD <sub>3</sub>	401.35>159.1	24	0.05	28
	d6-25OHD <sub>2</sub>	419.35>83.1	24	0.05	22
[0086]	d6-25OHD <sub>3</sub>	407.35>159.1	24	0.05	28

[0087] 其中,\*代表定量离子对

[0088] 可以理解,上述MRM的条件并不是只对应一种情形,可以是检测25羟基维生素D<sub>2</sub>,也可以是检测25羟基维生素D<sub>3</sub>,还可以是同时检测25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>。



[0089] 梯度洗脱条件如下：

时间 (min)	A 相比例 (%)	B 相比例 (%)
0.00	27	73
2.00	27	73
3.50	2	98
3.51	27	73
6.00	27	73

[0091] 质谱离子源参数包括：

[0092] 电离源：电喷雾电离ESI源；

[0093] 脱溶剂气温度：400℃；

[0094] 脱溶剂气流速：900L/Hr；

[0095] 离子源温度：120℃；

[0096] 毛细管电压：2500V。

[0097] (3)定性判断和定量计算：

[0098] 依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间为定性依据，判断25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>的存在；

[0099] 具体而言，当检测25羟基维生素D<sub>2</sub>时，依据25羟基维生素D<sub>2</sub>的保留时间判断25羟基维生素D<sub>2</sub>的存在；

[0100] 当检测25羟基维生素D<sub>3</sub>时，依据25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间判断25羟基维生素D<sub>3</sub>的存在；

[0101] 当同时检测25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>时，依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的保留时间判断25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的存在。

[0102] 用超高效液相色谱串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中被测目标物质色谱峰定量离子对和定性离子对保留时间与标准溶液中对应物质色谱峰定量离子对和定性离子对的保留时间一致，则可以判断样品中存在对应的目标物质。

[0103] 依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>与对应内标物在内标曲线上的峰面积比值，计算人体血清样品中的25羟基维生素D<sub>2</sub>和/或25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量。

[0104] 具体而言，当检测25羟基维生素D<sub>2</sub>，依据25羟基维生素D<sub>2</sub>与对应内标物在内标标准曲线上的峰面积比值，计算人体血清中的25羟基维生素D<sub>2</sub>的含量。

[0105] 当检测25羟基维生素D<sub>3</sub>，依据25羟基维生素D<sub>3</sub>与对应内标物在内标标准曲线上的峰面积比值，计算人体血清中的25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量。

[0106] 当同时检测25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>时，依据25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>与对应内标物在内标标准曲线上的峰面积比值，计算人体血清中25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量。以25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的含量之和作为25羟基维生素D的含量。

[0107] 基于上述的实验条件，经过多次试验验证，本发明实施低、中、高浓度加标回收实验的日内精密度和连续3天的日间精密度的RSD<9%。25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的检出限(S/N=3)分别为0.3ng/ml和0.2ng/ml，25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的定量限

(S/N=10)分别为0.8ng/ml和0.5ng/ml(参见图1)。简单有效的前处理过程,高分辨率和高灵敏度的液相色谱串联质谱仪,适宜的液相条件和良好的质谱参数的优化,使得本发明的实施数据优于已报道的文献数据。

[0108] 实施例2为使本领域技术人员更好地理解本发明,现提供一个例子来说明本发明用于25羟基维生素D的检测方法的具体实现过程。

[0109] 将150u1人血清移取至洁净的2ml离心管中,加入10u1内标溶液,混匀10s,加入0.2M硫酸锌溶液150u1,混匀10s,加入300u1甲醇,混匀10s,加入750u1正己烷,混匀30s,离心(13000rpm,5min),取上清液600u1,50℃氮气吹干,最后用75u1 70%甲醇水溶液复溶,涡旋混匀后,转移至玻璃内衬管,加载至液相色谱自动进样器中。

[0110] 液相色谱自动进样器自动将样品加载到色谱柱,然后通过流动相传递至质谱仪LC-MS/MS.LC-MS/MS采用电喷雾电离源(ESI)串联四级杆质量分析器作为质谱检测器进行分析。其中,脱溶剂气温度为400℃,脱溶剂气流速为900L/Hr,离子源温度为120℃,毛细管电压为2500V。采用多反应监测离子MRM扫描,其条件参见表1。

[0111] 表1 反应监测离子扫描MRM条件

[0112]

物质	离子对	锥孔电压(V)	驻留时间(S)	碰撞能量(V)
250HD <sub>2</sub>	413.35>395.3*	24	0.05	10
250HD <sub>2</sub>	413.35>83.1	24	0.05	22
250HD <sub>3</sub>	401.35>383.3*	24	0.05	10

[0113]

250HD <sub>3</sub>	401.35>159.1	24	0.05	28
d6-250HD <sub>2</sub>	419.35>83.1	24	0.05	22
d6-250HD <sub>3</sub>	407.35>159.1	24	0.05	28

[0114] 其中,\*代表定量离子对

[0115] 自动进样器自动将20u1预先净化好的样品加载到超高效液相色谱系统中,液相色谱条件参见表2。色谱柱采用ACQUITY UPLC BEH C18 Column(2.1 x 50mm,1.7μm),A流动相为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的水,B流动相为含2mM乙酸铵和0.1%甲酸的甲醇,其中,色谱柱柱温为45℃,进样量为20u1,流速为0.4ml/min。

[0116] 表2 液相色谱条件

[0117]

步骤	分析时间(min)	流速(ml/min)	A相比例(%)	B相比例(%)
1	0.00	0.4	27	73
2	2.00	0.4	27	73
3	3.50	0.4	2	98
4	3.51	0.4	27	73
5	6.00	0.4	27	73

[0118] 样品随流动相排出色谱柱出口后,在压力的作用下进入质谱仪离子源或废液,由六通阀控制进入离子源的样品通道。在离子源内液体样品被汽化并且电离为带电离子,带电离子在电压和真空作用下,进入Q1、Q2和Q3,其中,Q1和Q3为质量分析器,只允许根据25羟

基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的质荷比选择的母离子和子离子通过,Q2为碰撞单元,母离子在此处与惰性气体原子碰撞,产生特定的碎片离子。

[0119] 质谱仪的第一个四级杆(Q1)选择具有25羟基维生素D<sub>2</sub>、25羟基维生素D<sub>3</sub>、<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>3</sub>和<sup>6</sup>d-25羟基维生素D<sub>2</sub>(内标)的特定质荷比m/z的离子,具有这些m/z比的离子被允许进入Q2,Q2产生的碎片离子进入到Q3,其中只有25羟基维生素D<sub>2</sub>、25羟基维生素D<sub>3</sub>和内标的碎片离子被选择通过,而其他离子被除去。参见表3,出示了被用于鉴别和定量的25羟基维生素D。

[0120] 表3 25羟基维生素D的质量转变表

[0121]

被分析物	母离子(m/z)	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
25OHD <sub>3</sub>	401.35	383.3	159.1
25OHD <sub>2</sub>	413.35	395.3	83.1
6d-25OHD <sub>2</sub>	419.35	83.1	-
6d-25OH D <sub>3</sub>	407.35	159.1	-

[0122] 随着离子与检测器碰撞,它们将捕获到的离子质量数转化成数字信号的电子脉冲。所获得的数据被传递到计算机,其将所收集的离子信号强度对时间作图,即得质谱总离子流图。

[0123] 血清标准物中分析物和内标的峰面积的比值被用于构建内标标准曲线,然后该曲线被用于计算样品或质量控制物中分析物浓度,结果见表4;

[0124] 表4 25羟基维生素D<sub>2</sub>和25羟基维生素D<sub>3</sub>的精密度

[0125]

	低浓度质控		中浓度质控		高浓度质控	
	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>
日内精密度 (%)	5.6	7.5	8.0	3.9	5.1	6.2
日间精密度 (%)	8.9	6.3	9.0	5.5	7.2	5.8

[0126] 某权威检测中心,采用本实施方法进行了1000例的人体血清25OHD检测,检测结果显示质量控制物质结果准确,实验人员每日至少可以检测100份样品,检测效率高。说明本方法准确可靠,前处理简单,分析时间短。

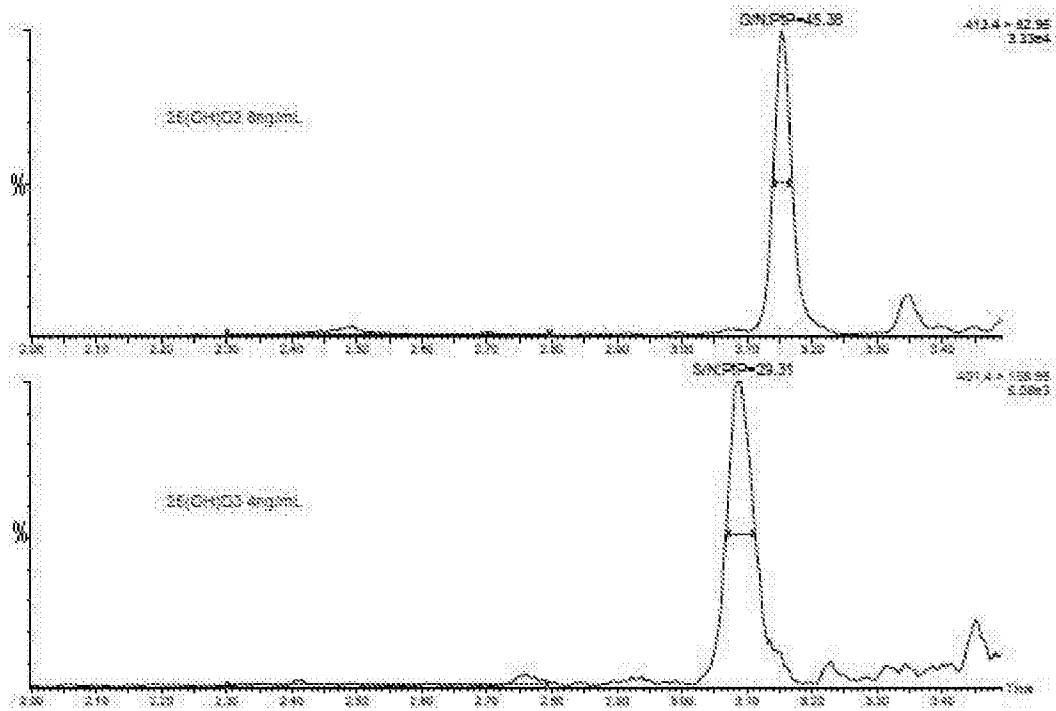


图1