

一种适用于高通量血清中25-羟基维生素D分析的新型半自动化固相萃取方法

Billy J Molloy, Lisa J Calton PhD, Donald P Cooper PhD
沃特世公司(英国曼彻斯特)

实验

使用Waters® ACQUITY® TQD系统(沃特世公司, 英国曼彻斯特)进行所有分析。系统配置如图1所示。仪器通过MassLynx® 4.1软件在电喷雾正离子模式下运行, 并采用TargetLynx™ 应用软件自动进行数据处理。

对化合物依赖的锥孔电压进行优化使得进入离子源的母离子的丰度最大化, 并通过第一级四极杆选择相应的母离子进入碰撞池。利用氦气和碰撞能量促使碰撞诱导解离, 生成特征性产物离子。利用此方法建立的具体多重反应监测(MRM)实验如表1所示。

UPLC条件

UPLC系统:	Waters ACQUITY UPLC®系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH苯基 色谱柱2.1 x 50 mm, 1.7 μm
柱温:	35 °C
流速:	450 μL/min
流动相A:	含2 mM醋酸铵 和0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	含2 mM醋酸铵 和0.1%甲酸的甲醇溶液
梯度:	在3 min内流动相B从65% 增加至85%

简介

近年来, 血清中25-羟基维生素D(25OHD)的分析需求大大增加。维生素D除了影响骨骼代谢之外, 如今的一些临床研究还表明维生素D缺乏症与某些癌症、多发性硬化症和心脏疾病的增发风险有关^{1,2}。25OHD的浓度被认为是表征维生素D水平的临床指标³, 并且对监测补充治疗具有重要意义, 它具有维生素D2和维生素D3两种形式。当25-羟基维生素D2(25OHD2)的抗体交叉反应低于100%时, 一些免疫检测方法可能无法测出维生素D2补充治疗患者的25OHD总浓度⁴。因此, 现在许多临床实验室都采用基于LC/MS/MS的方法测定25OHD, 以实现25OHD2和25-羟基维生素D3(25OHD3)的可靠定量。利用LC/MS/MS分析25OHD需要对样品进行预处理, 使25OHD从维生素D结合蛋白中释放出来, 最大程度降低基质效应。但是, 这些步骤不仅耗时, 而且在样品转移时易引入人为误差。

本应用纪要介绍了一种半自动化样品预处理方案, 可从最初的试管操作到结果处理对样品进行全程追踪, 最后采用UPLC/MS/MS分析25OHD。



图1. 沃特世ACQUITY TQD的系统配置。

MS条件

MS系统:	Waters TQD
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	0.8 kV
锥孔电压:	见表1
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气流量:	1000 L/h
源温度:	120 °C
采集:	MRM分析(表1)

化合物	MRM (m/z)	锥孔能量 (V)	碰撞能量 (eV)
25OHD3	401.35 >159.1	24	28
25OHD3*	401.35 >383.3	24	10
d ₆ -25OHD3	407.35 >159.1	24	28
25OHD2	413.35 >355.3	26	10
25OHD2*	413.35 >83.1	26	22
d ₃ -25OHD2	416.35 >358.3	26	10

表1. 监测25OHD2或25OHD3和内标物时使用的调谐参数。*表示可选的定性离子, 用于提高化合物鉴别的可靠性。

临床样品、校准品和质量控制标准品

用于测定血清样品中25OHD2或25OHD3浓度的校准品和质量控制标准品(QC)得自市售产品(Chromsystems, 德国)。决定检测精度所用的高浓度和中浓度QC样品来自市售产品(UTAK, 美国), 低浓度QC样品通过混合25OHD缺乏症患者血清并加入已知浓度的25OHD2而制备。低、中和高浓度QC样品的25OHD2最终浓度分别为7.5、34.3和81.4 ng/mL, 25OHD3最终浓度分别为12.4、31.2和71.3 ng/mL。

将本方法所得结果与之前在布里斯托尔皇家医院(BRI)临床生物化学部门通过己烷提取鉴定物并进行(LC/MS/MS)检测分析的30个临床血清样品的结果进行对比。依从英国国家研究道德服务规范, 对样品进行了匿名处理。

半自动化样品制备

将血清样品、校准品和QC标准品置于自动化液体处理系统(LHS; Tecan FreedomEVO®, 瑞士。图2), 并利用条形码进行识别, 以追踪整个提取过程。使用甲醇沉淀蛋白质之前, 通过LHS将样品(150 µL)等分注入96深孔板中, 并加入内标溶液(20 µL, 含250 ng/mL d₆-25OHD3或d₃-25OHD2)。

然后进行离心(离线), LHS将上清液转移至经调节的Oasis® µElution固相萃取(SPE)板中, 并用甲醇水溶液清洗。按照与初始色谱条件的有机溶剂强度匹配的两步洗脱方案将保留的分析物用LHS洗脱。手动密封洗脱板并转移至ACQUITY自动进样器, 然后利用ACQUITY样品管理器的预加载功能, 取20 µL样品直接注入UPLC/MS/MS系统。这样, 进样之间的时间大约为4.9 min。

ACQUITY自动进样器, 然后利用ACQUITY样品管理器的预加载功能, 取20 μ L样品直接注入UPLC/MS/MS系统。这样, 进样之间的时间大约为4.9 min。

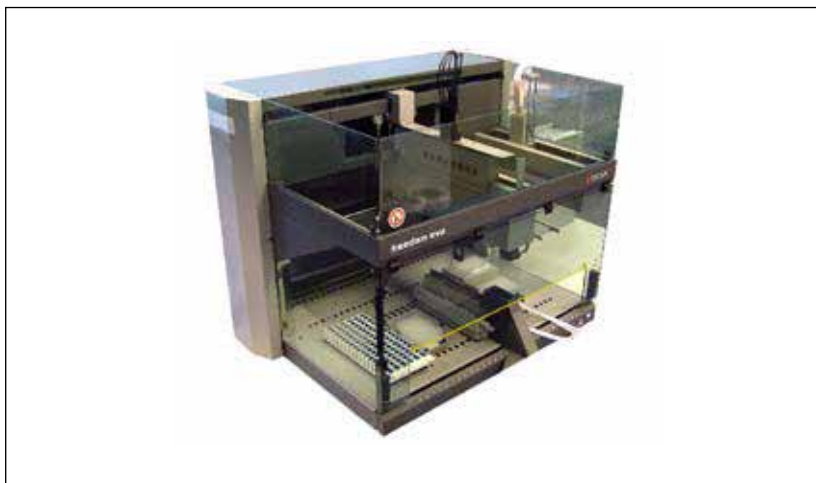


图2. Tecan Freedom EVO® 100
的系统配置。

96个样品的样品制备时间大约为2 h, 其中仅涉及极少的手动操作。在典型实验室中, LHS的工作流程如下所述。

工作流程

t=0: 实验室技术人员准备好患者样品、校准品、QC标准品和试剂并手动加载至LHS。

t=+30分钟: 实验室技术人员启动LHS预处理方案。

t=+1小时15分钟: 实验室技术人员移去蛋白质沉淀板, 进行离线离心。

t=+1小时20分钟: 实验室技术人员将板重新置于LHS并再次启动自动化SPE方案。

t=+2小时15分钟: 实验室技术人员密封收集板并转移至UPLC自动进样器。

结果

线性

在2.5–220 ng/mL 的浓度范围内向马血清(西格玛奥德里奇公司)中加入已知浓度的25OHD2和25OHD3, 测定检测方法的线性。对分析物每天测定一次, 连续测定5天, 所得的分析物浓度和响应值(分析物峰面积/IS峰面积)之间的相关性呈线性。

25OHD3的确定系数(r^2)>0.998(图3), 25OHD2的确定系数>0.997。计算所得的校准品浓度均在指定值的10%范围之内, 偏差在额定值的±15%范围之内, 被认为符合各个分析物的定量限要求。

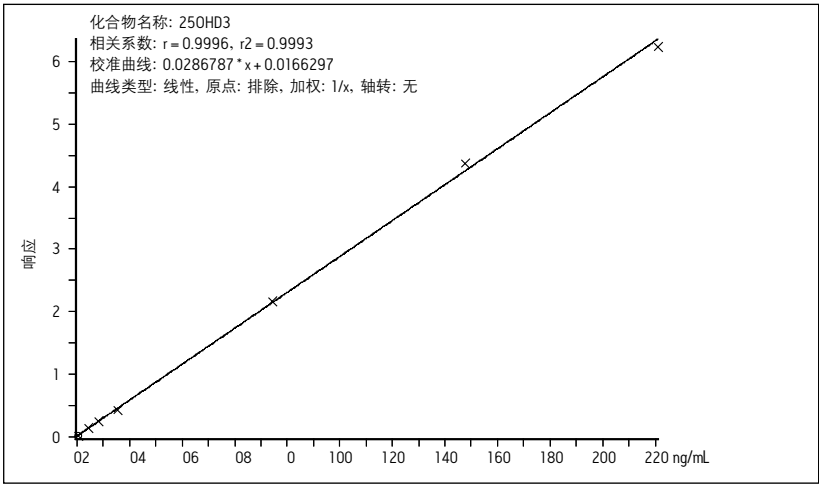


图3.马血清中25OHD3的校准曲线。

精度

通过提取低、中和高浓度的QC样品并重复分析5次以测定批内精度。根据这三个浓度水平计算25OHD的变异系数(CV)。对低、中和高浓度的QC样品进行连续5天的分析, 测定批间精度。结果如表2所示。

	低浓度QC		中浓度QC		高浓度QC	
	25OHD2	25OHD3	25OHD2	25OHD3	25OHD2	25OHD3
批内精度 CV%	6.4	7.13	6.56	6.15	7.70	4.33
批间精度 CV%	11.93	8.67	9.14	9.75	9.14	7.99

准确度

通过对来自国际维生素D的外部质量评估计划(DEQAS; www.deqas.org)的16份外部质量控制样品进行分析, 以考察25OHD3检测方法的准确度。使用Chromsystems校准曲线计算DEQAS样品浓度。所有结果均在25OHD3 的LC/MS方法所得结果平均值的10.8%偏差范围之内。

回收率

25OHD2和25OHD3在检测分析范围内的回收率大于80%(以空白加标马血清在提取前和提取后的分析物响应百分比表示)。

灵敏度和特异性

25OHD3计算浓度为4.7 ng/mL的患者样品的色谱图如图4所示。定量离子跃迁(m/z 401.35>159.1)不受干扰, 峰积分可重现, 可见本方法能够检测来自维生素D严重缺乏症患者的样品中的25OHD。

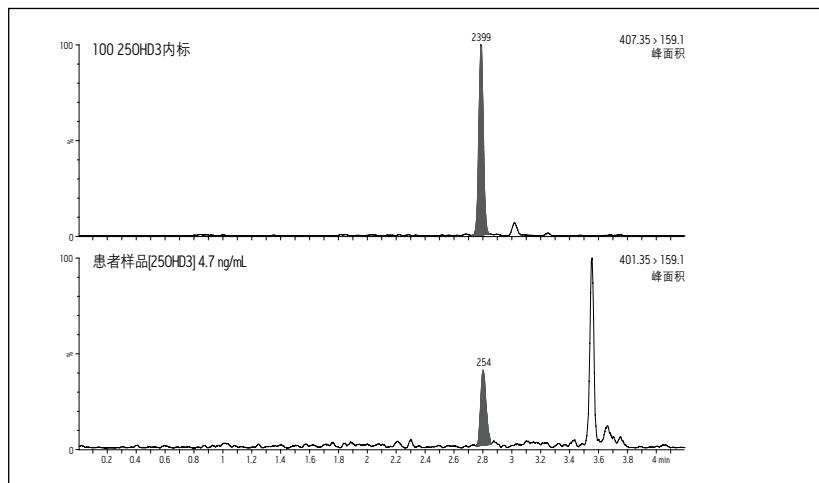


图4 .低浓度25OHD3患者样品的色谱图。

离子抑制

我们在色谱条件开发过程中对离子抑制进行了研究。将源于实验室器皿和血液收集装置的磷脂, 增塑剂和脱模剂的影响最小化。

样品分析

对来自BRI的30份匿名患者样品进行分析并测定了25OHD的总浓度。运用Passing-Bablok方法进行回归分析, 并采用Bland-Altman方法(Microsoft Office Excel2003, 带Analyse-It插件1.73版)对方案进行评估^{5,6}。当运用Bland-Altman差异图进行分析时, 两种分析方法(Waters=BRI+1.3ng/mL)之间几无差别。比较两种方法的总体回归曲线, Waters=0.98(BRI)+1.47 (r²=0.96), 如图5所示。

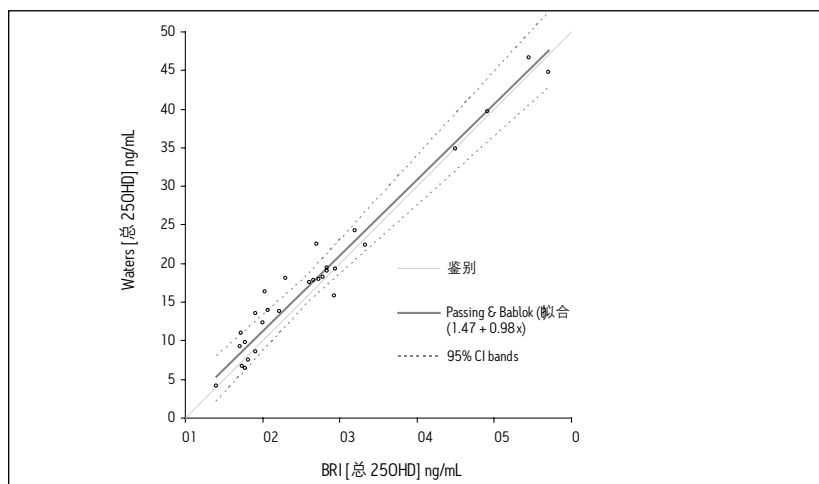


图5 .散点图和Passing-Bablok拟合。

讨论

如今, LC/MS/MS在许多实验室中被广泛用于维生素D的测定, 但是通常这些方法大多需要经验丰富的实验员手动进行样品处理, 才能实现成功的实施。

对血清中25OHD2或25OHD3的分析表明本方法的线性良好 ($r^2 > 0.997$), 连续5天分析所得的准确度和精度良好。此外, 本方法体现了与常规临床LC/MS/MS检测的良好一致性。

半自动化方法运用了Tecan Freedom EVO 100的液体处理和样品追踪功能。LHS极大地减少了手动操作步骤和操作变异性, 进一步确保了结果的一致性和重现性。此外, Oasis μ Elution提取板技术的使用省去了耗时的溶剂蒸发和复溶步骤, 使每个工作班次可至少分析192个样品。

本文介绍的半自动化方法克服了当前LC/MS/MS方法的诸多局限性。尤其是省去了一些耗时耗力的手动样品预处理步骤。这将使更多的实验室可以利用UPLC/MS/MS方法进行25OHD分析。

沃特世公司致谢英国布里斯托尔皇家医院临床生物化学系的独立临床研究员Ann Bowron在本应用纪要制作中所提供的临床研究样品, 以及她提供的宝贵帮助和建议。

参考文献

1. Gorham ED, et al. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: quantitative meta-analysis. *Am J Prev Med* 2007;32:210–6.
2. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:708–11.
3. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary reference Intakes Institute of Medicine. DRI Dietary Reference Intakes for calcium phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington, DC; 1997.
4. Hollis B. Editorial: The Determination of Circulating 25-Hydroxyvitamin D: No Easy Task. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004;89(7):3149–51.
5. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part 1. *J Clin Chem Biochem* 1983;21:709–20.
6. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307–10.

MassTrak系统和试剂盒是符合欧盟指令98/79/EC、美国食品药品监督管理局质量管理质量体系规范和现行的药品良好生产规范的体外诊断设备。沃特世公司已通过ISO 13485:2003认证。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UltraPerformance LC、UPLC、MassLynx、Oasis和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。TargetLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2009年 沃特世公司 中国印制
2009年7月 720003139ZH VW-PDF

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com

