

• 短篇论著 •

北京地区健康成人 LC-MS/MS 法测定血浆 25-羟维生素 D 参考区间的建立

李 敏, 孙江漫, 孟祥兆, 于洪远[△]

北京航天总医院检验科, 北京 100076

摘要:目的 建立北京地区健康成人采用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 法检测血浆 25-羟维生素 D [25(OH)D] 的参考区间。方法 选择 2022 年 1—12 月于北京航天总医院进行体检的健康成人作为研究对象, 其中男 1 083 例, 女 1 062 例。采用 LC-MS/MS 法对研究对象进行血浆 25(OH)D 水平检测。依据美国临床和实验室标准化协会 C28-A3 的要求, 建立 25(OH)D 的参考区间。结果 健康成年男性血浆 25(OH)D 水平 [16.70(12.50, 22.00) ng/mL] 高于健康成年女性血浆 25(OH)D 水平 [15.90(11.50, 21.90) ng/mL], 差异有统计学意义 ($Z = -2.310, P < 0.05$)。青年组、中年组、老年组血浆 25(OH)D 水平分别为 16.40(11.90, 21.30)、16.90(12.70, 22.85)、15.90(11.40, 21.40) ng/mL, 组间比较差异有统计学意义 ($H = 7.224, P < 0.05$)。将健康成年男、女性血浆 25(OH)D 水平参考区间以 60 岁为界分别设定, 以参考分布的 2.5% 和 97.5% 百分位数为参考下限和上限, 男性 ≤ 60 岁: 6.97~37.03 ng/mL, > 60 岁: 5.44~38.21 ng/mL。女性 ≤ 60 岁: 7.02~35.82 ng/mL, > 60 岁: 5.92~38.40 ng/mL。对该研究建立的血浆 25(OH)D 水平参考区间进行验证, 结果符合 WS/T 402-2012 标准。结论 初步建立了北京市健康成人血浆 25(OH)D 的参考区间, 为临床诊疗提供依据。

关键词: 25-羟维生素 D; 参考区间; 液相色谱串联质谱法; 北京地区

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.02.027

中图分类号: R446.1

文章编号: 1673-4130(2024)02-0254-03

文献标志码: A

维生素 D 是一种类固醇激素, 25-羟维生素 D [25(OH)D] 是维生素 D 在代谢中的主要循环形式, 能反映食物摄入和自身合成的维生素 D 总量及维生素 D 的转化能力, 因此 25(OH)D 被认为是衡量维生素 D 营养状态的最佳指标^[1]。目前, 国内外临床检测 25(OH)D 的常用方法有放射免疫法、酶联免疫法、电化学发光免疫法、液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 法等^[2], 传统的免疫学方法虽然有自动化程度高、操作简便等优势, 但存在抗体特异性不足、抗干扰能力差、不能区分 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 等缺点, 无法准确反映体内 25(OH)D 水平。LC-MS/MS 法检测人血浆 25(OH)D, 特异度高、抗干扰能力强, 被公认为是检测人血浆 25(OH)D 的“金标准”^[3]。目前, 《WS/T 677-2020 人群维生素 D 缺乏筛查方法》^[4] 对 25(OH)D 的临床参考区间做了相关规定, 但研究表明, 性别、年龄、季节、地区纬度均对血浆 25(OH)D 水平有影响^[5-6], 目前鲜见有关北京地区采用 LC-MS/MS 法建立 25(OH)D 参考区间的报道。本研究旨在建立并验证北京地区健康成人 25(OH)D 参考区间, 为临床治疗及诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1—12 月在北京航天总医院进行体检的健康成人 2 145 例作为研究对象, 男 1 083 例, 女 1 062 例。研究对象按年龄分为 3 组:

18~<45 岁为青年组, 45~<60 岁为中年组, ≥ 60 岁为老年组。纳入标准: (1) 在北京地区生活超过 1 年的居民; (2) 半年内未使用任何维生素 D 补品; (3) 基本信息未缺失。排除标准: (1) 既往诊断包含骨科疾病; (2) 近期服用或注射过维生素 D 等药物; (3) 心血管疾病; (4) 免疫系统相关疾病; (5) 丙氨酸氨基转移酶、血脂、血糖等基础指标水平异常升高。所有研究对象或其监护人对检测知情同意。

1.2 仪器与试剂 Waters TQD 串联 ACQUITY-PLC 液相色谱质谱联用仪, Agela 氮吹仪, Eppendorf 移液器, Eppendorf 高速冷冻离心机, MilliQ 超纯水机。25(OH)D₃ 和 25(OH)D₂ 的标准品购自 Ceril-lant 公司, 内标品 25(OH)D₃-d3 和 25(OH)D₂-d3 购自剑桥同位素实验室, 甲醇、甲酸、正己烷购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge BEH C8 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100.0 mm, 2.5 μ m), 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇溶液, 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 10 μ L, 采用梯度模式洗脱, 具体见表 1。

1.3.2 质谱条件 电喷雾电离离子源, 正离子模式。毛细管电压为 2.0 kV, 源温度为 150 $^{\circ}$ C, 雾化气温度为 400 $^{\circ}$ C, 雾化气流速为 600 L/h, 锥孔气流速为 100

[△] 通信作者, E-mail: jyk711@sina.com。

L/h。选择多离子反应监测模式,检测的离子对和质谱条件见表 2。

表 1 流动相的梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A 的体积 (%)	流动相 B 的体积 (%)	梯度
0.0	0.3	18	82	6
0.5	0.3	15	85	6
2.8	0.3	10	90	6
2.9	0.3	0	100	6
4.5	0.3	0	100	6
4.6	0.3	18	82	6
6.0	0.3	18	82	6

表 2 质谱参数设置

项目	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (v)	碰撞能量 (v)
25(OH)D ₂	413.3	355.3	24	10
25(OH)D ₃	401.3	365.3	24	10
25(OH)D ₂ -d3	416.3	358.3	24	10
25(OH)D ₃ -d3	404.3	368.2	20	12

1.3.3 样本采集 研究对象空腹静脉采血,3 000 r/min 离心 10 min,收集血浆于-20 ℃保存,排除溶血、脂血等不合格样本。

1.3.4 样本处理 取 200 μL 待测样品转移至对应的 1.5 mL 离心管,加入 20 μL 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₂ 的混合内标溶液,涡旋混匀。往上述离心管中加入 200 μL 甲醇,振荡混匀。蛋白质沉淀后加入 800 μL 正己烷,涡旋混匀 10 min。在 4 ℃ 及 13 000 r/min 的条件下离心 10 min,吸取 600 μL 上清液于新的离心管中,氮气吹干。加入 100 μL 75% 甲醇复溶,4 ℃ 及 4 200 r/min 的条件下离心 5 min,取 80 μL 上清液上机检测。

1.3.5 定量分析 采用内标法进行定量,通过将样本中 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₂ 的峰面积与相应内标面积的比值带入标准曲线,计算出样本中 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₂ 水平,二者相加的总和即为总 25(OH)D 水平。

1.4 统计学处理 依据文献[7]剔除离群值,将所有数据从小到大排列,将疑似离群点与其相邻点的差值设为 D,数据全距设为 R,两者相除,若 D/R>1/3,则考虑为离群点。采用 SPSS22.0 进行数据分析。用 Kolmogorov-Smirnov test 进行正态性检验,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计量数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。两独立样本的比较采用 Mann-Whitney U 检验,多个独立样本的比较用 Kruskal-Wallis H 检验,以参考分布的 2.5% 和 97.5% 百分位

数为参考下限和上限。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同性别、不同年龄血浆 25(OH)D 水平比较 健康成年男性血浆 25(OH)D 水平为 16.70(12.50, 22.00)ng/mL,健康成年女性血浆 25(OH)D 水平为 15.90(11.50, 21.90)ng/mL,健康成年男性血浆 25(OH)D 水平高于健康成年女性($Z=-2.310, P<0.05$)。青年组、中年组、老年组血浆 25(OH)D 水平分别为 16.40(11.90, 21.30)、16.90(12.70, 22.85)、15.90(11.40, 21.40)ng/mL,组间比较差异有统计学意义($H=7.224, P<0.05$)。青年组和中年组血浆 25(OH)D 水平比较差异无统计学意义($Z=-1.392, P>0.05$);中年组和老年组血浆 25(OH)D 水平比较差异有统计学意义($Z=-2.642, P<0.05$);青年组和老年组血浆 25(OH)D 水平比较差异无统计学意义($Z=-1.346, P>0.05$)。

2.2 参考区间的建立 将健康成年男、女性血浆 25(OH)D 水平参考区间以 60 岁为界分别设定,以参考分布的 2.5% 和 97.5% 百分位数为参考下限和上限。男性≤60 岁:6.97~37.03 ng/mL,>60 岁:5.44~38.21 ng/mL。女性≤60 岁:7.02~35.82 ng/mL,>60 岁:5.92~38.40 ng/mL。

2.3 参考区间的验证 根据 WS/T402-2012 的血浆 25(OH)D 水平的参考区间验证规则^[8],选取 2023 年 1—4 月在北京航天总医院体检的健康成年男性和女性各 40 例,不同性别人群中≤60 岁和>60 岁各 20 例,分别检测其血浆 25(OH)D 水平。≤60 岁和>60 岁健康成年人血浆 25(OH)D 水平均有 90% 以上的检测值落在本研究血浆 25(OH)D 水平参考区间内,验证通过。

3 讨 论

25(OH)D 是人体内维生素 D 的主要储存形式,可同时反映内源性和外源性的维生素 D 水平,通过测定它可以明确整个维生素 D 的情况^[8]。近年来研究表明,维生素 D 的生物学作用不局限于调节钙磷代谢和促进骨健康,还具备一些非骨骼系统作用,与自身免疫疾病、心血管系统疾病、糖尿病及癌症密切相关^[9]。因此实验室开展的维生素 D 检测项目对预防相关疾病及机体健康具有重要意义。传统的免疫学检测 25(OH)D 的方法均采用商品化的试剂盒,试剂盒说明书提供的参考区间大多根据白种人建立,不符合我国人群的实际情况。随着质谱检测技术的发展,采用 LC-MS/MS 法检测血浆 25(OH)D 的实验室数量也随之增加。研究表明,免疫法检测血浆 25(OH)D 与 LC-MS/MS 法的一致性表现不一^[10-11],临床在评价维生素 D 营养状况时应考虑不同方法学间存在的差异。因此,建立北京地区健康成人采用 LC-MS/MS 法检测血浆 25(OH)D 的参考区间尤为

重要。

本研究结果表明,健康成年男性血浆 25(OH)D 水平高于健康成年女性血浆 25(OH)D 水平($Z = -2.310, P < 0.05$)。防紫外线产品的使用和性激素水平的不同可能是健康成年女性 25(OH)D 水平低于健康成年男性 25(OH)D 水平的重要原因^[12]。青年组、中年组、老年组血浆 25(OH)D 水平分别为 16.40 (11.90, 21.30)、16.90 (12.70, 22.85)、15.90 (11.40, 21.40) ng/mL, 组间比较差异有统计学意义($H = 7.224, P < 0.05$)。随着年龄的增长,皮肤中合成维生素 D 的原料 7-脱氢胆固醇逐渐下降,加之老年人维生素 D 受体数量和功能不足,肾脏 1 α -羟化酶活性也随着年龄的增长而降低,这些因素均会影响维生素 D 的合成^[13]。本研究结果显示,将健康成年男、女性血浆 25(OH)D 水平参考区间以 60 岁为界分别设定,以参考分布的 2.5%和 97.5%百分位数为参考下限和上限,结果为男性 ≤ 60 岁:6.97~37.03 ng/mL, > 60 岁:5.44~38.21 ng/mL, 女性 ≤ 60 岁:7.02~35.82 ng/mL, > 60 岁:5.92~38.40 ng/mL。对于同一种检测项目,其参考区间也会受不同检测方法、生物学特性和试剂厂商的影响而有所差异^[14],有必要进一步研究以获得可靠的参考区间,从而降低诊断的假阳性,避免误诊给患者造成不必要的心理和经济负担^[15]。因此,制订适合我国、适合本地区人群的实验室参考区间具有非常重要的意义。目前有较多关于各地区血浆 25(OH)D 参考区间建立的相关报道,但这些研究均采用化学发光法对样本进行检测^[16-17]。随着质谱技术的发展,较多的实验室选择 LC-MS/MS 法对 25(OH)D 进行定量分析,但鲜见有北京地区健康成人 LC-MS/MS 法测定血浆 25 羟维生素 D 参考区间的相关报道。本研究建立的参考区间,与文献^[18-20]这些地区的报道结果均有一定的差异,除了不同地区纬度的影响外,方法学的差异是最主要的原因。

综上所述,本研究对北京地区健康成人的血浆 25(OH)D 进行调查,建立了本地区健康成人 LC-MS/MS 法测定血浆 25(OH)D 的参考区间,为后续开展维生素 D 代谢及其与疾病相关的研究奠定了基础。

参考文献

[1] 高正凤,徐梦华,袁美芬,等. 上海地区未成年人 25-羟基维生素 D 参考区间的初步调查[J]. 检验医学,2017,32(4):280-283.

[2] 张民杰,程昱璇,桑培培,等. 25-羟基维生素 D 不同临床检测方法的评价[J]. 标记免疫分析与临床,2021,28(10):1800-1804.

[3] 程雅婷,董衡,梁晓翠,等. 人血清中 25 羟基维生素 D 测

定的两种质谱方法比较[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2013(14):6535-6537.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 人群维生素 D 缺乏筛查方法: WS/T 677-2020[S]. 北京: 中国标准出版社,2020.

[5] 王丹晨,尹逸丛,禹松林,等. 性别、年龄和季节对血清 25-羟维生素 D 水平的影响[J]. 基础医学与临床,2020,40(2):151-154.

[6] 胡颖,俞丽丽,金懿,等. 重庆地区妊娠期女性维生素 D 的横断面调查及补充方案的效果评价[J]. 国际检验医学杂志,2022,43(12):1448-1453.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: EP28-A3c[S]. Wayne, PA: CLSI, 2010.

[8] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室检验项目参考区间的制定: WS/T 402-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[9] 刘兰民,麻国芳,张晓娜,等. 西宁地区成人血清 25-羟基维生素 D 参考区间的初步调查[J]. 国际检验医学杂志, 2019,40(11):1391-1393.

[10] 龚美亮,王科宇,陈瑞,等. 一种免疫分析系统与液相色谱-串联质谱检测 25-羟维生素 D 的一致性评价[J]. 中华检验医学杂志,2021,44(7):621-626.

[11] 禹松林,方慧玲,程歆琦,等. 五种自动化免疫学方法和液相色谱串联质谱方法测定 25 羟维生素 D 的比较[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(7):475-479.

[12] 高杲,陈晓. 上海地区成人维生素 D 水平与性别、年龄、季节的关系[J]. 中国骨质疏松杂志,2022,28(2):280-284.

[13] 李敏,孙江漫,孟祥兆,等. 北京地区老年人群血浆维生素 A、D 和 E 水平检测结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2022,37(5):159-163.

[14] 朱旭,程歆琦,钟远红. 北京地区脂蛋白(a)颗粒浓度参考区间的建立[J]. 临床检验杂志,2022,40(3):204-208.

[15] 李爽爽,王志成. 应用 UPLC-MS/MS 检测上海市成年健康人群血清维生素 B6 和 B7 参考区间的建立[J]. 现代检验医学杂志,2022,37(6):140-143.

[16] 魏霞,石安然,黄望,等. 福州地区健康人群血清 25-羟维生素 D 参考区间的建立[J]. 深圳中西医结合杂志,2022, 32(18):17-20.

[17] 师东豪. 乌鲁木齐地区成人血清 25 羟基-维生素 D 参考区间的建立[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学,2020.

[18] 熊适,钱士匀,熊小泉,等. 海南地区成人血清 25 羟基-维生素 D 参考区间的初步调查[J]. 检验医学,2014,29(5): 464-467.

[19] 任晓兵,徐蓓,陈广福,等. 西安市某医院成人与儿童血清 25 羟基维生素 D 水平的研究[J]. 现代生物医学进展, 2019,19(20):3853-3856.

[20] 荆晓,梅澍,牛继国,等. 甘肃地区健康人群甲状旁腺素水平分析及参考区间的建立[J]. 国际检验医学杂志,2023, 44(7):798-802.