

25-羟基维生素 D 检测方法研究进展

曾伟杰^{1,2}, 谢 洁^{2*}, 龚晓云², 翟 睿², 黄泽建², 刘梅英², 徐锐峰², 江 游²,
戴新华², 方 向², 时国庆^{1*}

(1. 北京科技大学化学与生物工程学院, 北京 100083; 2. 中国计量科学研究院前沿计量科学中心,
质谱仪器工程技术研究中心, 北京 100029)

摘 要: 维生素 D(vitamin D, VD)是人体内一种重要的调节因子, 除参与人体内钙磷代谢, 其在高血压、心血管病、肿瘤及糖尿病等疾病中也扮演着重要角色。25 羟基维生素 D(25-hydroxy vitamin D, 25(OH)D)是 VD 在体内的主要存在形式, 性质稳定(半衰期 2 周), 其水平能充分反映食物摄入和自身合成 VD 总量, 在精准药物治疗与营养膳食理念方面具有重要意义, 因此, 需要高准确测定 25(OH)D 浓度水平。本文综述了 25(OH)D 的前处理方法和检测方法, 主要包括放射免疫法、酶联免疫吸附法、化学发光免疫测定法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法, 并展望了其发展趋势。

关键词: 25-羟基维生素 D; 合成及代谢途径; 前处理方法; 检测方法

Research progress on determination methods of 25-hydroxy vitamin D

ZENG Wei-Jie^{1,2}, XIE Jie^{2*}, GONG Xiao-Yun², ZHAI Rui², HUANG Ze-Jian², LIU Mei-Ying²,
XU Rui-Feng², JIANG You², DAI Xin-Hua², FANG Xiang², SHI Guo-Qing^{1*}

(1. School of Chemistry and Biological Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China;
2. Mass Spectrometry Engineering Technology Research Center, Center for Advanced Measurement Science,
National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: Vitamin D (VD) is an important regulator in the human body. In addition to participating in calcium and phosphorus metabolism in humans, VD also plays an important role in diseases such as hypertension, cardiovascular disease, cancer and diabetes. 25-hydroxy vitamin D (25(OH)D) is the main form of VD in the human body, and the properties are stable (half-life of 2 weeks). The level can fully reflect the food intake and the total amount of VD synthesized by itself, which is of great importance in the context of precision drug therapy and nutritional diets, and therefore requires a high level of accurate determination of 25(OH)D levels. This paper summarized the pretreatment methods and detection methods of 25(OH)D, including radioimmunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescence immunoassay, high performance liquid chromatography

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发项目(2018YFF0109504)、中国计量科学研究院基本科研业务费项目(AKY1934, AKYCX1904, AKYKF1809)

Fund: Supported by National Key R&D Program of China (2018YFF0109504) and Research Project of National Institute of Metrology (AKY1934, AKYCX1904, AKYKF1809)

***通讯作者:** 时国庆, 副教授, 主要研究方向为环境与食品安全监测技术。E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

谢 洁, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为质谱应用分析。E-mail: xiejie@nim.ac.cn

***Corresponding author:** SHI Guo-Qing, Associate Professor, Beijing University of Science and Technology, No.30, College Road, Haidian District, Beijing100083, China. E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

XIE Jie, Ph.D, Assistant Researcher, National Institute of Metrology, No.18, North Third Ring Road, Chaoyang District, Beijing 100029, China. E-mail: xiejie@nim.ac.cn

and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and looked forward to the development trends.

KEY WORDS: 25-hydroxy vitamin D; synthesis and metabolic pathways; pretreatment; detection methods

1 引言

维生素 D(vitamin D, VD)是第 4 种被鉴定的能有效治疗佝偻病的物质,被认为是第 4 种维生素,因此用字母“D”表示,为了进一步区分同一类维生素的不同功用,对该类物质再分配下标,进而有目前常称的麦角钙化醇(ergocalciferol, VD₂)和胆钙化醇(cholecalciferol, VD₃),结构式见图 1。医学上应用 VD 来治疗儿童佝偻病已有 90 年的历史,随着科技的发展,人们对 VD 的认识越来越深入,在过去的 20 年有超过 50 种的 VD 代谢物被报道,虽然只有少数在血液进行了量化^[1]。25 羟基维生素 D(25-hydroxy vitamin D, 25(OH)D)是 VD 在血液中的主要运输形式,性质稳定(半衰期 2 周),其水平能充分反映人体通过食物摄入和自身合成后的 VD 的总量,因此体内 VD 水平的评价主要通过 25(OH)D 水平的测定。VD 缺乏是世界范围内备受关注的公共卫生问题,美国第三次全国健康营养检查结果显示近 9 成(≥70 岁)的女性存在每日 VD 摄入量不足问题,即存在发生 VD 缺乏症风险^[1],多次 VD 营养状况调查显示 VD 缺乏在儿童、青少年、妊娠期妇女、老年人更易发生 VD 缺乏,VD 缺乏会激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,使人更易患高血压和导致左心室肥大,所以应有意督促对这类人群从饮食或制剂中摄入充足 VD。

VD 是人体内一种重要的调节因子,普遍认可其对人体有益作用,除了参与人体内钙磷代谢,近年来的研究发现,其在高血压、心血管疾病、糖尿病、肿瘤等疾病中也扮演着重要角色,低水平的 VD 浓度会对这些疾病产生负面影响^[2-8]。研究表明,VD 能促进人体对钙和磷的吸收,童年时保证充足的 VD 摄入能有效降低老年后患骨质疏松的风险^[9],因此 VD 补充剂,经常与钙一起作为保健品被服用。摄入人体的 VD 主要存在 2 种形式,即 VD₂ 和 VD₃,有研究表明由于 25 羟基维生素 D₂(25-hydroxy vitamin D₂, 25(OH)D₂)对 VD 结合蛋白(vitamin D binding protein, DBP)的亲合力低于 25(OH)D₃的亲合力,导致 25(OH)D₂在体内会被更快速清除,即 25(OH)D₂和 25(OH)D₃形式对体内 VD 状态的贡献是不同的。为了进一步阐明相关疾病的病理学机制,流行病学研究中针对血清 VD 水平的检测需求出现了惊人的增长^[10],梅奥医学实验室报告 VD 检测量每年增长 80%至 90%^[11]。因 VD₂及其代谢产物的血液循环水平远低于 VD₃及其代谢产物,有文献报道直接将血清中的 25(OH)D₃水平作为测定 VD 营养状态的指标^[11]。通过测定 25(OH)D₂和 25(OH)D₃来评价 VD 水平,在精准药物治疗与营养膳食理念方面具有重要意义。

本文对 25(OH)D 的来源、前处理方法和检测方法进行了综述,对选择合适的 25(OH)D 的前处理方法和检测方法提供理论依据。

2 体内 VD 的合成及代谢

VD 是人体必需的脂溶性维生素,可储存在脂肪组织中,也参与血液循环^[12]。血液循环时 VD 主要和 VD 结合蛋白(DBP)结合。人体 VD 主要来源于膳食摄取和皮肤转化^[13]。蘑菇和鱼类是较为常见的富含 VD 的食物。VD₂和 VD₃在人体作用机制完全相同,但来源不同。其中 VD₂是由植物中的麦角醇,经紫外照射后转变而来,故又名麦角钙化醇,VD₃又被称为“阳光维生素”是由暴露在阳光或紫外线的皮下前体分子 7-脱氢胆固醇转变而来,又名胆钙化醇。通过皮肤转化或饮食摄取的 VD 均具有生物惰性^[14],要转化成具有生物活性形式还需要经过 2 次羟基化。首先摄入的 VD 在空肠和回肠被吸收后与乳糜微粒或 VD 运输蛋白结合,经血液系统或淋巴系统运输至肝脏,随后在肝脏中的 25-羟化酶帮助下转化为 25(OH)D,25(OH)D 经血入肾,被近端小管上皮细胞的线粒体中的细胞色素 P₄₅₀ 氧化酶(1 α 羟化酶)催化转化成有活性的 1,25-二羟基维生素(1,25-dihydroxy vitamins, 1,25-(OH)₂D)(又称骨化三醇)^[4]。该酶活性会受甲状腺激素水平、血钙水平和磷调节。1,25-(OH)₂D 可以与各组织中存在的 VD 受体(vitamin D receptor, VDR)发生相互作用,如 VD 核受体即为控制多重的配体依赖性转录因子,参与细胞增殖,免疫反应和骨矿化等生物学进程^[15]。合成学家在对 VD 分子的不同部分进行修饰后,现已开发出 3000 种维生素 D 类似物,然而只有极少部分有临床应用^[16]。当体内的 1,25-(OH)₂D 足量时,会在肾脏 24-羟化酶(renal 24-hydroxylase, CYP₂₄)作用下进一步转化为 24,25-二羟基维生素 D[24, 25-dihydroxy vitamin D, 24,25-(OH)₂D],最后这些代谢物在胆汁中被分解。此外,1,25-(OH)₂D 还能通过活化巨噬细胞促使其释放肿瘤坏死因子 α , 杀伤或抑制肿瘤细胞^[17]。

总而言之,人体中 VD 会以多种形式存在,其主要代谢物是 25(OH)D 和 1,25-(OH)₂D,并主要通过有活性的 1,25-(OH)₂D 实现其生理功能,但由于 1,25-(OH)₂D 在循环血液中含量低(pg/mL),仅为 25(OH)D₃ 的千分之一,且半衰期短(4~7 h),检测时还易受到多种因素的干扰难以作为临床指标。与之相对的 25(OH)D 是 VD 在血液中的主要运输形式,占体内 VD 总量的 95%,半衰期长(2 周),这种相当长的血清半衰期可准确指示一段时间内从紫外线照射和

饮食摄入中获得的 VD 水平^[18]。25(OH)D 性质稳定, 其体内循环水平不受血钙和甲状旁腺激素(parathyroid hormone related peptide, PTH)水平影响, 更能充分反映体内食物摄入和自身合成 VD 的总量及 VD 的转化能力, 真实反映人体的 VD 状况, 因此临床上认为通过检测血清中 25(OH)D 的含量来评估人体的 VD 水平更加可信^[19]。

3 VD 相关性疾病及限量标准

3.1 VD 相关疾病

传统观点中 VD 主要生理功能是维持体内钙、磷浓度的平衡。当体内 VD 不足时(<20 ng/mL), VD 与甲状旁腺激素的相互作用下降, 会降低钙在肠内的吸收, 使得人体仅能吸收大约 10%~15%的钙和 60%的磷^[20], 从而对骨健康产生消极影响, 进而引起佝偻病、软骨病、骨质疏松等常见病的发生。在对手足口病患者、子痫前期患者、白癜风患者、乙型肝炎患者、妊娠期糖尿病患者、肺癌患者、慢性心力衰竭等患者的 25(OH)D 检测, 发现其含量较正常人均出现明显下降且下降程度与疾病严重程度呈正相关, 因此通过检测 25-(OH)D 水平可反映疾病的轻、重程度。也有研究表明补充 25-(OH)D 可以增强疗效, 因此, 临床上越来越关注 VD 水平的监测及补充^[21]。

从代谢途径上看, VD 还能通过与蛋白激酶 C、促丝裂原活性蛋白激酶、蛋白激酶 A、磷脂酰肌醇、Ca²⁺依赖性电压门控通道或 Ca²⁺非依赖性电压门控通道相互作用介导第二信使旁路的激活、影响细胞内信号转导通路、改变细胞内钙浓度、激活或抑制 Bcl-2、c-jun, 最终影响细胞增殖、分化和凋亡^[22]。VD 具有多种生物作用, 近年的研究发现 VD 还是一种神经-内分泌-免疫调节激素, 在自身免疫疾病中发挥重要作用。如: 在白癜风发病机制研究中, VD 可抑制自身抗体对黑素细胞的杀伤作用, 增加体内的黑素细胞活性和酪氨酸水平^[23]。在血糖控制中, 其可以增加胰岛素敏感性, 促进胰岛素合成及分泌, 从而调节血糖浓度防治高血压。流行病学分析已证实孕期维生素 D 缺乏可增加子痫前期风险, 可能是发生子痫前期的病因^[24]。25(OH)D₃ 还可以调控单核细胞、中性粒细胞和气道上皮细胞等合成抗菌多肽和 B-防御素等抗维生素多肽, 起抗呼吸道感染作用^[25]。有文献指出, 较高的 VD 摄取和 25(OH)D 水平能降低女性患乳腺癌的风险。Gupta 等^[26]对 1075 名对照组的研究结果表明, 血浆 25(OH)D 的水平与乳腺癌的发生风险呈负相关, 这一负相关在产后绝经妇女中更加显著。Ke 等^[27]报道九成以上慢性丙型肝炎患者中存在 VD 缺乏或不足现象, 25(OH)D 水平的降低会促进肝纤维化的发展, 从而导

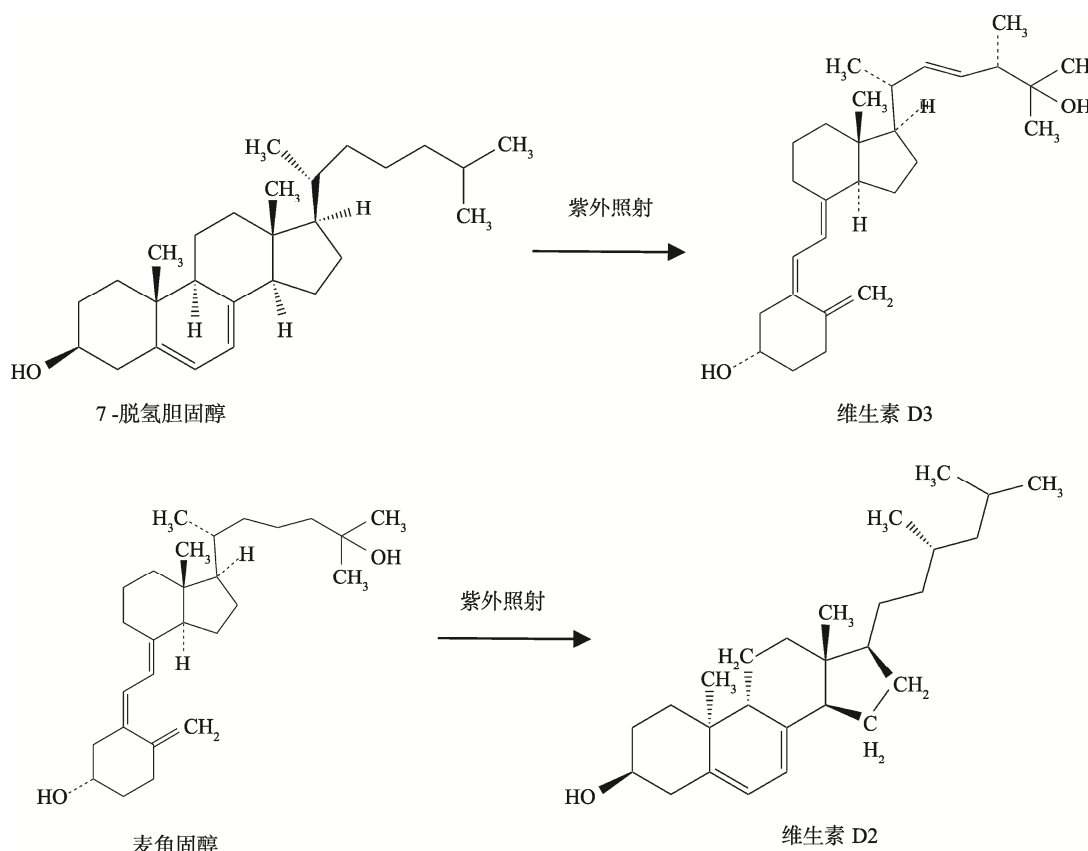


图 1 VD₂ 和 VD₃ 合成示意图

Fig.1 The synthetic processes of the VD₂ and VD₃

致肝硬化或肝癌。及时补充 25(OH)D 能够降低肝脂肪变性的发展和组织学病变的严重程度。吴刚等^[28]对 81 例 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者血清中的 25(OH)D₃ 的测定结果也证实了患者存在 25(OH)D₃ 缺乏。Querfeld 等^[29]证明,通过人为地补充 VD,作为辅助治疗手段能更好地发挥药物的抗病毒效果。Bertone-Johnson^[30]在对 81183 名 50~79 岁的美国妇女血清中的 VD 水平研究发现,高浓度的 VD 可以显著降低患抑郁症的风险。使用患者血清中 25(OH)D 水平来作为乳腺癌、抑郁症、心血管疾病等多种疾病预后评估的参考指标具有临床价值。目前在中国仍缺乏有针对性的、长期的、大样本的分析,在体内 VD 水平研究中,研究人员还可以在 1 年 4 个季节收集多组血样进行 25(OH)D 评估,验证其是否存在季节差异性^[31]。

3.2 限量标准

美国医学科学院推荐 25(OH)D 血浓度大于 20 ng/mL 有利于骨骼健康^[32]。也有文献将 VD 缺乏定义为血清 25(OH)D 低于 20 ng/mL,VD 不足为 21~29 ng/mL,充足为 30 ng/mL 以上,而大于 150 ng/mL 可能会导致中毒^[33]。还有文献直接按体内血清 25(OH)D₃ 水平将 VD 水平标准分为 5 类,严重缺乏(<25 nmol/L)、缺乏(<50 nmol/L)、不足(52~72 nmol/L)、充足(≥75 nmol/L),正常值(上限为 100 nmol/L)及中毒(>374 nmol/L)^[34]。

4 25(OH)D 前处理方法

为了使 25(OH)D 测定在临床生物化学实验室中得到更广泛的应用,有必要简化提取程序,并简化或消除色谱纯化步骤。表 1 中列举了几种常见的前处理手段,其大概的流程是:先将内标加入血清或血浆中,然后用有机溶剂沉淀蛋白质,离心后,进行固相萃取(solid phase extraction, SPE)程序,最后将纯化的样品注入液相色谱-串联质谱仪(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。目前各种仪器分析方法都涉及复杂的样品制备,这是由于维生素及其代谢物在循环血液中主要和特异性维生素 D 结合蛋白或白蛋白偶联,仅有 0.03% 的 25(OH)D 以游离形式存在^[35],其在血浆中的浓度在 10~50 ng/mL^[36]。所以前处理过程中一般需要使用甲醇等有机溶液使蛋白质发生变性,将维生素 D 从结合蛋白上释放出来,也有文献选择用 NaOH 来破坏蛋白与维生素 D 的结合^[37]。然后通过液-液萃取、固相萃取等方法提取、净化、浓缩样品中的 25(OH)D, Knox 等^[38]开发了一种 6 步的自动化固相萃取机,常见的样品提取剂有正己烷、10%二氯甲烷-正己烷,其中正己烷萃取被认为是最简单的方法,因其能够在沉淀蛋白质的同时去除水溶性干扰物。最后萃取物在氮气下干燥后使用复溶液(甲醇水等)复溶,进样检测。Chen 等^[13]开发了一种免疫亲和净化方法,在去蛋白的上清液中利用缀

合小鼠抗 1,25-(OH)₂D 单克隆抗体的抗体珠浆,提取目标物后再通过一定的方法将其洗脱,很好地去除了血清中的基质效应。随着科技的发展,自动化技术普遍应用于前处理过程,已有专门的自动化设备投入应用,包括一种简单的蛋白质沉淀方式,利用填充有惰性硅藻土材料的过滤板进行自动的 SPE 程序。自动化设备不但可以增加处理通量,还可以避免在液-液萃取、固相萃取(SPE)和溶剂蒸发等步骤中由于人为因素带来的误差^[39]。

5 25(OH)D 检测方法

目前 25(OH)D 检测方法主要分为免疫法和色谱法。传统的免疫法有:放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光免疫测定法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)及色谱法-主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和 LC-MS/MS。多数文献中检测 25(OH)D 所用生物样本为血清,其他样本还有血浆或干血点^[40]等。

5.1 放射免疫法(RIA)

针对 25(OH)D 的放射免疫分析最早于 1985 年由 Hollis 等^[41]提出,其以 ³H-25(OH)D 对样品进行加标,实验过程中所有标准品和对照物均在血清基质中并与血清样品同步提取,此时示踪物 ³H-25(OH)D 与待测样品中 25(OH)D 竞争性结合抗 25(OH)D 山羊抗体,然后用 2 步抗原抗体反应以实现固液分离,最后通过检测沉淀中 ³H 的放射量来计算样品中的 25(OH)D 的浓度。随着技术的发展,现普遍使用 ¹²⁵I-25(OH)D 作为示踪剂,通过检测沉淀中的 ¹²⁵I 放射量来计算 25(OH)D 浓度,该示踪剂极大地提高了该方法的灵敏度。在较早的研究中由于实验室间所用质控标准品不同,测定方法存在差异,对同一血清样品中 25(OH)D 测定结果往往存在较大的差异。例如,来自绝经后妇女的 42 个样本被送到实验室 A,使用乙醚提取并使用他们自己内部的放射免疫方法。在 42 名患者中,17%被归类为维生素 D 不足[血清 25(OH)D < 80 nmol/L]。来自同一组女性的 20 个不同的标本送去实验室 B,其使用商业上可获得的 RIA 法制备的试剂盒检测。该方法测定的血清 25(OH)D 值,90%的女性被分类为维生素 D 不足^[42]。

随着科技的发展,制备出更合适的抗体,RIA 有了巨大发展。Farrell 等^[43]用 RIA 法与 LC-MS/MS 法对 170 例血清样品连续 5 d 每个样品各重复测定 5 次,结果评估显示,LC-MS/MS 法一致相关性为 0.99,平均偏差为 1.4 nmol/L。由于该测定法在测定之前不需要样品预纯化,灵敏度高,特异性强,对仪器设备要求不高,更适用于基层单位对微量物质的测定。RIA 测定法被美国食品和药物管理局批准用于临床应用(DiaSorin, Stillwater, MN)。但该方法仍存

在一些固有局限, 如其不能区分 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 只能反映出人体内总的 25(OH)D 水平, 且最后放射性物质的处理上对检测人员与环境存在一定风险^[44]。

5.2 酶联免疫吸附法(ELISA)

酶联免疫吸附法(ELISA)也是 VD 测定时常用的方法, 其将 25(OH)D 的单克隆抗体结合在固相载体上, 利用抗原抗体的特异性结合进行定性或定量。该方法多用于试剂盒的制备, 英国 IDS 公司与中国博晖创新光电技术股份有限公司曾推出针对 25(OH)D 的检测试剂盒, IDS 使用生物素标记的 25(OH)D, 将其添加到校准品, 对照品和 25 μ L 未经染色的血清样品中。微孔板事先包被羊 25(OH)D 抗体, 然后将稀释的样品加入到微孔板中孵育, 让样品中的 25(OH)D 与固定量的 25(OH)D 很好地竞争性结合微孔板上抗体。在洗涤孔后, 用过氧化物酶标记的抗生物素蛋白和四甲基联苯胺作为底物, 完成显色^[1]。IDS 酶联免疫试剂盒说明书中声称所使用的羊多克隆抗体对 25(OH)D₃ 结合特异性为 100%, 对 25(OH)D₂ 的结合特异性为 75%。高玲娟等^[45]对 IDS 检测维生素 D 的试剂盒进行性能验证, 结果显示: 试剂盒测定 25(OH)D 批内与批间不精密度均 $\leq 5\%$, 定值质控品相对标准偏差 $\leq 8\%$, 拟合曲线(三次多项式)分析, $r^2 \geq 0.99$, 最低检出限为 5 nmol/L。各项指标均达到美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, NCCLS)的文件标准。张天勇等^[46]对国产检测血清 25(OH)D₃ 的 ELISA 试剂盒进行评价, 批内 10 次测定的变异系数(coefficient of variation, CV)为 9.8%, 批间 10 次测定的 CV 值为 13.2%。每次测定线性相关系数均达到 0.999, 最低检测限为 10 μ g/L。

叶青等^[47]采用 ELISA 法对 824 例 0~6 岁儿童血清 25(OH)D 进行检测, 结果显示 25(OH)D 的平均值(69.52 $\pm$ 57.09) nmol/L, 25(OH)D 缺乏(大于 25 nmol/L 且小于 50 nmol/L)160 例, 占受检人数的 19.42%。刘冬妹等^[48]用 ELISA 法对 1246 例 0~6 岁儿童血清 25(OH)D₃ 进行检测, 结果显示 25(OH)D₃ 的平均值(25.398 $\pm$ 7.765) μ g/L, 25(OH)D₃ 缺乏(小于 20 μ g/L)313 例, 占受检人数的 25.12%。

李晓云等^[34]曾以 LC-MS/MS 法为标准对 ELISA 法进行了评价, 选取的 50 例患者的血清样品用 LC-MS/MS 法测定 25(OH)D₃ 水平均数为(14.99 $\pm$ 6.51) ng/mL, 用 ELISA 法测定的均数为(20.91 $\pm$ 9.70) ng/mL, 两者的相关性为 0.725, 发现 LC-MS/MS 测定值整体低于 ELISA, 即使用 ELISA 法进行评价维生素 D 水平会低估体内维生素 D 的缺乏, 可能造成临床决策失误。

5.3 克隆酶供体免疫测定法(CEDIA)

CEDIA 该测定基于 β -半乳糖苷酶的 α -互补性原理。试剂盒中酶供体(enzymedonor, ED)标记的 VD 与样品中的 25(OH)D 竞争结合 VD 抗体, 结合了 VD 抗体的 ED 由于

空间位阻将不能再与酶受体(enzymeacceptor, EA)结合形成具有活性的 β -半乳糖苷酶。反应平衡后, 剩余的未结合 VD 抗体的 ED 标记的 VD 与 EA 结合形成具有活性的 β -半乳糖苷酶, 因此, 表现为样本中的 25(OH)D 浓度与形成的 β -半乳糖苷酶活性成正比。 β -半乳糖苷酶活性的检测是以 2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷作为底物, 反应生成的产物在 415 nm 处有最大吸光度, 通过在 415 nm 处测定吸光度的变化值, 即可测得样本中 25(OH)D 的浓度。桂香^[49]对 CEDIA 试剂盒进行评价, 批内 2 个质控 10 次测定 CV 值为 1.49% 和 2.11%, 批间 2 个质控 3 次测定的 CV 值为 2.84% 和 0.97%。线性范围 9~143 ng/mL 线性相关系数不低于 0.99。

5.4 化学发光法(CLIA)

化学发光法(CLIA)首先需要将一定的化学发光示踪剂(连接有异鲁米诺衍生物的 25(OH)D)加入样品中, 使其与样品中的 25(OH)D 竞争结合涂覆在顺磁珠上的抗血清。待反应结束后加入适量激发剂(鲁米诺和过硼酸钠), 通过检测化学荧光信号来计算样品中的 25(OH)D。目前, Ersfeld 等^[50]开发的一种针对 25(OH)D 的 CLIA 测定法, 与 RIA 比较, 相关系数为 0.94; 与 LC-MS/MS 比较, 相关系数为 0.95, 且该方法已在 LIAISON 分析仪上实现完全自动化, 单次测定时间 40 min, 平均每小时能分析 90 个样品。但由于该抗血清对 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 具有同等效应, 因此通过该方法测定的仍为总的 25(OH)D 水平。以 CLIA 为基础的试剂盒开发上, 宋翠翠等^[51]制备的针对 25(OH)D 化学发光检测试剂盒最低检出限 4.9 ng/mL, 准确度相对偏差小于 10%, 批内变异系数为 6.5%, 批间变异系数为 8.9%。牟夏莲^[52]用化学发光法对 477 例 7~13 岁小学生血清 25(OH)D 进行检测, 结果显示 25(OH)D 的平均值(16.93 $\pm$ 6.45) ng/mL, 25(OH)D 缺乏(< 20 ng/mL)324 例, 占受检人数的 67.92%。

在化学发光的基础上发展的电化学发光技术也被应用于 25(OH)D 的检测。刘肖英^[53]用电化学发光免疫分析法(ECLIA)对 2877 例 0~6 岁婴幼儿血清 25(OH)D 进行检测, 结果显示 25(OH)D 的平均值(82.43 $\pm$ 14.26) nmol/L。25(OH)D 缺乏(大于 25 nmol/L 且小于 50 nmol/L)144 例, 约占千分之一。周东芳等^[54]用罗氏电化学发光法对 3371 例孕妇女血清 25(OH)D 进行检测, 3371 例孕妇女 25(OH)D 测定平均值为(13.64 $\pm$ 6.484) ng/mL, 25(OH)D 缺乏(< 20 ng/mL)2836 例, 占受检人数的 84.13%。可能与孕妇女户外活动减少、缺乏紫外线暴露有关。

整体而言, 免疫法均较容易受温度、基质、抗体状态等因素影响, 批内及批间变异系数(coefficient of variation, CV)、精密度存在较大的偏差且设计的特异性结合 25(OH)D 的抗体和 VD 的其他代谢物之间存在交叉反应。即维生素羟化物都能与抗体存在不同程度反应, 通过该方

法只能测定得 25(OH)D 的总量,不能满足同时测定 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的需求。但该方法对设备及操作人员的要求相对简单,在开发针对 25(OH)D 的试剂盒具有重要意义。更适合自动化仪器的应用,在大规模筛选及检测 VD 上具有不可比拟的优势。

5.5 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法(HPLC)是一种传统的色谱法,主要通过液相中的色谱柱实现将目标物分离,然后再电化学检测器或紫外检测器中检测。1977 年第一次报道了 25(OH)D 的紫外检测试验,该方法实现了 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的分离。其灵敏度、特异性、准确性良好,可在单次测定中准确定量多种分析物。

阳利龙等^[55]用 HPLC 法测定血清中 25(OH)D₃,结果表明该方法拥有良好的精度,在 6.7~335.5 nmol/L 浓度范围内线性良好($r=0.9971$),方法回收率在 90%~110%之间,萃取回收率大于 70%,日内日间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 6%。叶怀庄等^[56]用 HPLC 对 2028 名 6~11 岁的小学生中筛选出晚发性佝偻病可疑者 221 人的血浆 25(OH)D₃ 进行检测,血浆 25(OH)D₃ 在 20~320 ng/ml 的浓度范围内线性关系良好($r^2=0.9992$),方法的回收率为 96.34%,相对标准偏差为 4.58%,最小检出浓度为 0.06 ng/mL($S/N=3$)。确诊晚发性佝偻病患者 151 人中血浆 25(OH)D₃<10 ng/mL 有 146 例,占受检人数的 96.7%。

陈道平等^[4]用 HPLC 对 30 名肺癌患者和 30 名健康人血清 25(OH)D 进行检测,患者血清的 25(OH)D 水平是 (23.4±7.9) ng/mL 显著低于健康组的 (36.2±7.6) ng/mL。

HPLC 能实现 25(OH)D₂ 与 25(OH)D₃ 的分离,但由于 25(OH)D₂ 在血清中的浓度远低于 25(OH)D₃ 的浓度, HPLC 对 25(OH)D₂ 的检测限不能达到临床要求,且该方法所需的样品量大,难以满足临床上的要求,又因前处理复杂且涉及多种有毒有害的有机试剂,所以目前在临床上的使用较少,有逐步被 LC-MS/MS 取代的可能。

5.6 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)

液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)具有非常高的灵敏度、特异性和准确性。同位素稀释 LC-MS/MS 更是国际上公认的检测“金标准”。能很好满足同时检测 25(OH)D₂ 与 25(OH)D₃ 需求。

应用该方法在检测 25(OH)D 存在的挑战主要是, VD 在不同离子源下的离子化效果不同,在合适的离子源选择上,由于 25(OH)D 具有天然的亲脂性, 25(OH)D 缺乏易带电的基团,难以通过常压化学电离源(advanced configuration and power interface, APCI)或电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI)电离。为提高其离子化效率,研究者往往选择使用衍生化试剂对其进行衍生化,使其加上一个富含 N 原子的基团。在用衍生化试剂对其进行衍生

化时,优先选择将分析物的分子量转移至较高质量范围,从而降低背景噪声的干扰。最初使用的 Cookson 试剂,形成的 Disels-Alder 加合物上含有质子亲和原子(氧和氮),该基团帮助下能够让衍生化产物在正离子 ESI 下很容易形成加氢峰 $[M+H]^+$,从而提高对 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的响应值^[57]。有文献报道使用 MEQTAD 作为衍生化试剂可比完整形式提高 15 倍灵敏度。然而复杂的衍生化程序,极大限制了检测通量,难以满足临床实验室对检测通量的需求。后续研究者普遍避免进行衍生化处理,有研究提出了通过在流动相中添加甲胺,使其形成甲胺加合离子 $[M^+CH_3NH_3]^+$ 的方式来提高离子化效率。现使用 ESI 时仍一般通过在流动相中添加 0.1%甲酸或 5 mmol/L 甲胺,让分析物形成 $[M+H]^+$ 或 $[M+CH_3NH_3]^+$,以获得一个可接受的灵敏度。而在 APCI 或者 APPI 一般不添加任何电解质。

质谱法中由于同分异构体与目标物拥有一样的质荷比,质谱仪无法区分,在计算时将同分异构体含量算入目标物中,使得测量结果偏大。有文献报道 25(OH)D₃ 的差向异构体在新生儿的血浆的浓度中有显著贡献^[58]。此外一些内源性成分如: 1 α -羟基维生素 D₃、7 α -羟基-4-胆甾烯-3-酮,也会对血清中 25(OH)D 的准确测定产生影响,所以必须选择合适的洗脱溶液,设定合适的洗脱梯度以实现良好的色谱分离,确保内源性干扰物和分析物被分开。这样才能建立一个高灵敏度的人血清中的 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的色谱分析方法。

Tai 等^[59]应用同位素稀释的 LC-MS/MS,用 APCI 离子源在多反应检测扫描模式下, 25(OH)D₃ 及其内标物质荷比选择(m/z 401/383, m/z 404/386), 25(OH)D₂ 及其内标物质荷比选择(m/z 413/395, m/z 416/398)作为定量离子对进行检测,离子比为 1.4(383.2/401.3)作为阳性鉴定 25(OH)D₃ 的附加标准。该测定方法中, 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的加样回收率达到 99.0%与 101.0%,绝对回收率达到 97.0%和 92%。以信噪比为 3 时作为最低检测限约为 0.15 ng/g,该方法还具有极高精密度,当 25(OH)D > 1 ng/g 时 CV 值为 0.2%~0.6%;当 25(OH)D < 1 ng/g 时的 CV 值 < 2%。曾义^[60]建立的 LC-MS/MS 检测 25(OH)D 的方法中在 5~100 ng/mL 时线性良好,回收率在 96.19%~108.23%。最低检测限为 2 ng/mL。曾贞等^[61]用 LC-MS/MS 对 5017 例 0~6 岁儿童血清 25(OH)D 进行检测,结果显示 25(OH)D 的平均值 69.07 nmol/L。25(OH)D 缺乏(大于 25 nmol/L 且小于 50 nmol/L)939 例,占受检人数的 18.71%,测定 VD 相关化合物的 LC-MS/MS 方法汇总见表 1。

在提高该方法的检测限与灵敏度上,有学者对设备接口、联用方式等进行优化,如: Petruzzello 等^[67]对 ESI-M 接口等进行改造后实现超临界流体色谱与质谱联用,该方法能一次性测定包括 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 在内的 14 种脂溶性维生素和类胡萝卜素。Kushnir 等^[68]使用二维色谱分离再通过液相色谱-串联质谱分析样品。

表 1 测定 VD 相关化合物 LC-MS/MS 方法汇总
Table 1 Summary of LC-MS/MS methods for the quantification of VD related compounds

目标物	样品前处理	LC 条件	MS 条件	检出限 (LOD)	保留时间/min	参考文献
25(OH)D ₃ 25(OH)D ₃ -MBO TAD 25(OH)D ₃ -DME QTAD	两步溶剂萃取法 乙腈、乙酸乙酯两步萃取 MBOTAD 和 DMEQTAD 衍生化	J'Sphere ODS H-80 (150 mm×4.6 mm, 4 μm, YMC) 乙腈:水(3:2, V:V) 等度洗脱 1 mL/min	Thermo Quest LCQ positive APCI 401[M+H] ⁺ 383, [401-H ₂ O] ⁺ 和 365[401-2H ₂ O] ⁺ 723[M+H] ⁺ 和 705[723-H ₂ O] ⁺ 746[M+H] ⁺	300 fmol 30 fmol 20 fmol	5 4.4 4.6	[62]
25(OH)D ₃	在线固相萃取法 固相萃取(SPE): 自动化设备借助六通阀将目标物先吸附于萃取柱, 再洗脱	LiCrospher 100 RP-18 (125 mm×4 mm, 5 μm, Merck) 甲醇:水(90:10, V:V)含 0.5 mmol/L 乙酸铵等度洗脱 0.85 mL/min	Waters Micromass Quattro positive ESI 401[M+H] ⁺ →159 m/z 405[M+H] ⁺ →159 m/z(IS)	7.3 nmol/L	8.1	[63]
25(OH)D ₂ 25(OH)D ₃ [2H ₆ -25(OH)D ₃]	液液萃取(LLE) 正己烷萃取	BDS C8 (51 mm×2.1 mm, 3 μm, ThermoHypersil) A: 甲醇 B: 0.05%甲酸水 梯度洗脱程序详见文献 0.3 mL/min	API 3000 positive ESI 413.15[M+H] ⁺ →395.5 m/z 401.8[M+H] ⁺ →383.5 m/z 407.2[M+H] ⁺ →389.4 m/z (IS)	4.95 nmol/L 4 nmol/L	5.91 5.88 5.87	[64]
33825(OH)D ₂ 25(OH)D ₃ [2H ₃ -Δ ⁹ -THC]	液液萃取(LLE) 正庚烷萃取	XTerra (50 mm×2.1 mm, 3.5 μm, Waters) 甲醇含 2 mmol/L 乙酸铵和 1%甲酸 等度洗脱 0.1 mL/min	Waters Micromass Quattro positive ESI 413.15[M+H] ⁺ →355.20 m/z 401.15[M+H] ⁺ →365.25 m/z 3.18.15[M+H] ⁺ →196.20 m/z	0.09 ng/mL 0.06 ng/mL	2.90 2.00 2.93	[65]
325(OH)D ₂ 25(OH)D ₃ [² H ₆ -25(OH)D ₃]	在线固相萃取法(SPE): Oasis HLB(20 mm×2.1 mm, 25 μm, Waters)	Supelcosil LC-18 (30 mm×3 mm, 3 μm, Supelco) 甲醇:水 (83:17, V:V) 等度洗脱 0.5 mL/min	Micromass Quattro positive APCI 401.4[M+H] ⁺ →383.4 m/z 413.4[M+H] ⁺ →395.4 m/z 407.7[M+H] ⁺ →389.7 m/z (IS-25(OH)D ₃)	0.49 ng/ml 1.86 ng/ml	3.84 3.82 3.83	[13]
25(OH)D ₂ 25(OH)D ₃ [² H ₆ -25(OH)D ₃]	自动化固相萃取(SPE)	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters) 甲醇含 2 mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲 酸 梯度洗脱程序详见文献 0.1 mL/min	ACQUITY TQD positive ESI 413.30[M+H] ⁺ →83 m/z 401.35[M+H] ⁺ →159 m/z 407.35[M+H] ⁺ →159 m/z (IS-25(OH)D ₃)	7.5 nmol/L 4 nmol/L	2.62 2.59 2.58	[38]
25(OH)D ₂ 25(OH)D ₃ [² H ₆ -25(OH)D ₃]	高通量液液萃取(LLE) Sirocco 蛋白沉淀板 庚烷萃取	Synergi MAX-RP (50 mm×2 mm, 4 μm, Phenomenex) 甲醇-水(85:15, V:V)含 2 mmol/L 乙 酸铵 等度洗脱 0.35 mL/min	API 3000 413[M+H] ⁺ →395 m/z 401[M+H] ⁺ →365 m/z 407.4[M+H] ⁺ →371.4 m/z (IS-25(OH)D ₃)	10 nmol/L	2.62 2.68 2.60	[66]
1,25-(OH) ₂ D ₃ 1,25-(OH) ₂ D ₂ 1,25-(OH) ₂ D ₃ -d ₆ 1,25-(OH) ₂ D ₂ -d ₆	免疫亲和柱(IAC) 缀合小鼠抗 1,25 二羟 基维生素 D 单克隆抗 体的抗体珠	Onyx Monolithic C ₁₈ (100 mm×3 mm, 4 μm, Phenomenex) 流动相 A: 甲醇/水/50 mmol/L 乙酸 锂(70:29:1, V:V:V) 流动相 B: 甲醇/50 mmol/L 乙酸锂 (99:1, V:V) 梯度洗脱程序详见文献 0.5 mL/min	TSQ Quantum Vantage 429.3[M+H] ⁺ →374.3 m/z 435.3[M+H] ⁺ →381.3 m/z 423.3[M+H] ⁺ →369.3 m/z 423.3[M+H] ⁺ →349.3 m/z	0.84 pg/mL	5.43 5.52 5.43 5.52	[14]

总而言之, LC-MS/MS 检测方法满足同时测定 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 在临床上的要求, 被认为是现阶段最准确的检测方法, 结果真实可信, 因此常作为其他检测方法的参考标准。但从目前来看, LC-MS/MS 仍需要一个耗时且复杂的前处理过程, 许多手动样品制备程度限制了该方法的通量, 复杂的设备操作对操作人员有更高的要求, 昂贵的设备也使其在临床推广上存在一定局限。

6 结语与展望

综上, VD 对人体健康至关重要, 体内 25(OH)D 水平在多种在多种疾病的诊断上具有借鉴作用, 但目前缺乏规模大、范围广、时间跨度长的实验数据的支撑, 无法量化相关疾病与 25(OH)D 水平具体相关性。VD 营养状况调查显示, 在儿童、青少年、妊娠期妇女、老年人等人群中普遍存在 VD 缺乏问题, 需要在日常饮食加大蘑菇和鱼摄入, 以保证充足的 VD 的摄入。充足的 VD 水平在包括抑制自身免疫疾病、调节免疫功能、支持心血管系统功能、维持对皮肤的抗恶性细胞增殖作用及抑制癌症进展中具有积极作用。RIA、ELISA、CLIA 以及 HPL 和 LC-MS/MS 均能实现 25(OH)D 水平的测定。RIA、ELISA、CLIA 法使用的特异性结合 25(OH)D 的抗体较易受温度、基质、抗体状态等因素影响, 批内及批间 CV、精密度存在较大的偏差且特异性结合 25(OH)D 的抗体与其他的维生素羟化物存在不同程度反应, 通过该方法只能测定得 25(OH)D 的总量, 不能满足同时测定 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的需求。HPLC 对 25(OH)D₂ 的检测限不能达到临床要求, 且该方法所需的样品量大, 难以适用于临床检测。同位素稀释 LC-MS/MS 法能准确地测定血清中维生素 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃, 是公认的 25(OH)D 的检测的“金标准”, 通过该方法测定的指标有希望成为临床上的一个重要指标, 用于评估心血管疾病、高血压、肿瘤糖尿病等疾病风险, 尤其在疾病的前期诊断和预防上有重要意义。该类技术将不断成熟, 量化血清、奶粉、米糠等基质中 25(OH)D 含量, 为不同人群指导补充 VD 提供科学依据。最后借助分析技术对人不同阶段的 25(OH)D 含量进行跟踪测定, 将维生素营养代谢研究推向更深的层次。

参考文献

- [1] Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status [J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(4): 1087–1091.
- [2] Lavie CJ, Lee JH, Milani RV. Vitamin D and cardiovascular disease will it live up to its hype [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(15): 1547–1556.
- [3] 刘兴态, 杨怡, 张艳. 2 型糖尿病患者血清 25-羟基维生素 D 检测的临床意义[J]. *中国社区医师*, 2018, 34(22): 105–106.
Liu XT, Yang Y, Zhang Y. Clinical significance of detection of serum 25-hydroxyvitamin D in patients with type 2 diabetes [J]. *Chin Commun Phys*, 2018, 34(22): 105–106.
- [4] 陈道平, 吕菁菁. 高效液相色谱仪检测血清 25-羟基维生素 D 水平与肺癌的相关性研究[J]. *中国医疗器械信息*, 2016, 22(2): 9–10.
Chen DP, Lv QQ. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D level and lung cancer by high performance liquid chromatography [J]. *China Med Device Inf*, 2016, 22(2): 9–10.
- [5] 廖琪. 妊娠期糖尿病合并亚临床甲状腺功能减退孕妇检测血清 25-羟基维生素 D 的意义[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(8): 1643–1645.
Liao Q. Significance of detecting serum 25-hydroxyvitamin D in pregnant women with gestational diabetes mellitus and subclinical hypothyroidism [J]. *Chin Matern Child Health Care*, 2017, 32(8): 1643–1645.
- [6] 王茂峰, 应俊, 蒋新良, 等. 肺癌患者血浆白细胞介素 10 与 25-羟基维生素 D 检测的临床意义[J]. *温州医科大学学报*, 2014, 44(11): 829–831.
Wang MF, Ying J, Jiang XL, *et al*. Clinical significance of detection of plasma interleukin-10 and 25-hydroxyvitamin D in patients with lung cancer [J]. *J Wenzhou Med Univ*, 2014, 44(11): 829–831.
- [7] 郭守东, 崔华东, 桑慧, 等. 液相串联质谱法检测糖尿病患者血浆 25-羟基维生素 D₃[J]. *泰山医学院学报*. 2014, 35(3): 161–164.
Guo SD, Cui HD, Sang H, *et al*. Determination of plasma 25-hydroxyvitamin D₃ in diabetic patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Taishan Med Coll*, 2014, 35(3): 161–164.
- [8] 蔡叶桦, 张红河, 倪慧群, 等. 血浆 Th17 细胞相关因子与 25-羟基维生素 D 检测对宫颈癌的临床价值[J]. *全科医学临床与教育*, 2014, 12(3): 263–265.
Cai YX, Zhang HH, Ni HQ, *et al*. Clinical value of detection of plasma Th17 cell related factor and 25-hydroxyvitamin D in cervical cancer [J]. *Gen Pract Clin Educ*, 2014, 12(3): 263–265.
- [9] 曹慧, 陈小珍, 王瑾, 等. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱技术分析婴儿配方奶粉中的维生素 D[J]. *质谱学报*, 2012, 33(4): 232–236.
Cao H, Chen XZ, Wang J, *et al*. Analysis of vitamin D in infant formula by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2012, 33(4): 232–236.
- [10] Rodd C, Sokoro A, Lix LM, *et al*. Increased rates of 25-hydroxy vitamin D testing: Dissecting a modern epidemic [J]. *Clin Biochem*, 2018, (59): 56–61.
- [11] El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(1): 66–76.
- [12] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2062–2072.
- [13] Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, *et al*. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) and 25-hydroxyvitamin D₂ (25OHD₂) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method [J]. *Clin Chim ACTA*, 2008, 391(1–2): 6–12.
- [14] Yuan C, Kosewick J, He X, *et al*. Sensitive measurement of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(9): 1241–1249.
- [15] Nikam A, Ollivier A, Rivard M, *et al*. Diverse Nrf2 activators coordinated to cobalt carbonyls induce heme oxygenase-1 and release carbon

- monoxide *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(2): 756–762.
- [16] Antony P, Sigüeiro R, Huet T, *et al.* Structure-function relationships and crystal structures of the vitamin D receptor bound 2 α -methyl-(20S, 23S)- and 2 α -methyl-(20S, 23R)-epoxymethano-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(3): 1159–1171.
- [17] Brandi ML. Indications on the use of vitamin D and vitamin D metabolites in clinical phenotypes [J]. *Clin Cases Miner Bone Metab: Off J Italian Soc Osteoporos, Miner Metab, Skelet Dis*, 2010, 7(3): 243.
- [18] Tai SSC, Nelson MA. Candidate reference measurement procedure for the determination of (24R),25-dihydroxyvitamin D₃ in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(15): 7964–7970.
- [19] Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(11): 1668–1671.
- [20] 李津涛. 25-羟基维生素 D 检测方法及临床应用的研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2017, 6(3): 631–632.
- Li JH. Progress in the detection and clinical application of 25-hydroxyvitamin D [J]. *J Clin Lab*, 2017, 6(3): 631–632.
- [21] 陆媛, 刘小滨, 闫格, 等. 血清 25-羟基维生素 D-3 检测在儿童社区获得性肺炎中的应用价值[J]. *海南医学*, 2019, 30(3): 327–329.
- Lu Y, Liu XB, Yan G, *et al.* Application value of serum 25-hydroxyvitamin D-3 detection in children with community acquired pneumonia [J]. *Hainan Med*, 2019, 30(3): 327–329.
- [22] Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3): 373–381.
- [23] 何婷婷, 赵思佳, 顾海萍, 等. 白癜风患者 25-羟基维生素 D 水平检测及其影响因素分析[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2018, 34(2): 87–89.
- He TT, Zhao SJ, Gu HP, *et al.* Detection of 25-hydroxyvitamin D levels in patients with vitiligo and analysis of its influencing factors [J]. *China J Leprosy Skin Dis*, 2018, 34(2): 87–89.
- [24] 郑明阳, 孟晓东. 25-羟基维生素 D-3 检测在子痫前期患者中的临床意义[J]. *中国医学创新*, 2018, 15(27): 133–137.
- Zheng MY, Meng XD. Clinical significance of 25-hydroxyvitamin D-3 detection in patients with preeclampsia [J]. *Chin Med Innov*, 2018, 15(27): 133–137.
- [25] 顾峰. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清 25-羟基维生素 D 检测的临床意义[J]. *检验医学*, 2016, 31(7): 559–561.
- Gu F. Clinical significance of detection of serum 25-hydroxyvitamin D in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lab Med*, 2016, 31(7): 559–561.
- [26] Gupta D, Vashi PG, Trukova K, *et al.* Prevalence of serum vitamin D deficiency and insufficiency in cancer: Review of the epidemiological literature [J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(2): 181–193.
- [27] Ke P, Chen SSL. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity *in vitro* [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 37–56.
- [28] 吴刚, 吴锦瑜. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者血清 25-羟基维生素 D-3 的检测及临床意义[J]. *医学信息*, 2018, 31(19): 96–98.
- Wu G, Wu JY. Clinical significance of detection of serum 25-hydroxyvitamin D-3 in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med Inf*, 2018, 31(19): 96–98.
- [29] Querfeld U, Mak RH. Vitamin D deficiency and toxicity in chronic kidney disease: In search of the therapeutic window [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(12): 2413–2430.
- [30] Bertone-Johnson ER. Vitamin D and the occurrence of depression: Causal association or circumstantial evidence? [J]. *Nutr Rev*, 2009, 67(8): 481–492.
- [31] Bothe V, Schmidt-Gayk H. Competitive protein-binding assay for the diagnosis of hyper- and hypovitaminosis D [M]. *Calcium Regulating Hormones, Vitamin D Metabolites, and Cyclic AMP Assays and Their Clinical Application*, 1990.
- [32] Aguirre M, Manzano N, Salas Y, *et al.* Vitamin D deficiency [J]. *Aust Fam Phys*, 2015, 36(9): 680.
- [33] Lee JM, Smith JR, Philipp BL, *et al.* Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants [J]. *Clin Pediatr*, 2007, 46(1): 42.
- [34] 李晓云, 王世玉, 严汝庆. 维生素 D 临床应用研究新进展[J]. *重庆医学*, 2018, 47(21): 2844–2845.
- Li XY, Wang SY, Yan RQ. New progress in clinical application of vitamin D [J]. *Chongqing Med*, 2018, 47(21): 2844–2845.
- [35] Bikle DD, Gee E, Halloran B, *et al.* Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74(6): 1966.
- [36] Vanderjagt DJ, Brock HS, Melah GS, *et al.* Nutritional factors associated with anaemia in pregnant women in northern Nigeria [J]. *J Health Popul Nutr*, 2007, 25(1): 75–81.
- [37] Vanden-Ouweland JMW, Beijers AM, Demacker PNM, *et al.* Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(15–16): 1163–1168.
- [38] Knox S, Harris J, Calton L, *et al.* A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ and D₂ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Annals Clin Biochem*, 2009, 46(3): 226–230.
- [39] Judy S. High-throughput serum 25-hydroxy vitamin D testing with automated sample preparation [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2016, (1378): 301–320.
- [40] 韩吉春, 王小臣, 李广林, 等. 液相色谱-串联质谱法检测干血点样本中 25-羟基维生素 D-2 和 25-羟基维生素 D-3[J]. *分析化学*, 2017, 45(3): 448–454.
- Han JC, Wang XC, Li GL, *et al.* Determination of 25-hydroxyvitamin D-2 and 25-hydroxyvitamin D-3 in dried blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(3): 448–454.
- [41] Hollis BW, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status [J]. *Clin Chem*, 1985, 31(11): 1815–1819.
- [42] Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, *et al.* Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: A call for standardization [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(7): 3152–3157.

- [43] Farrell CJL, Martin S, Mcwhinney B, *et al.* State-of-the-Art vitamin D assays: A comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods [J]. Clin Chem, 2012, 58(3): 531–542.
- [44] 顿中华. 维生素 D 检测方法的研究进展[J]. 华夏医学, 2016, 29(4): 171–176.
- Dun ZH. Research progress on vitamin D detection methods [J]. Huaxia Med, 2016, 29(4): 171–176.
- [45] 高玲娟, 陈晨. 25-羟基维生素 D 检测试剂盒的性能验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21): 3640–3642.
- Gao LJ, Chen C. Performance verification of 25-hydroxyvitamin D test kit [J]. Chin J Health Insp, 2015, 25(21): 3640–3642.
- [46] 张天勇, 周雪莲. 高效液相色谱法和国产酶联免疫吸附法试剂盒检测 25-羟基维生素 D-3 的一致性比较[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(26): 4335–4336.
- Zhang TY, Zhou XL. Comparison of the consistency between 25-hydroxyvitamin D-3 detected by high performance liquid chromatography and domestic enzyme-linked immunosorbent assay kit [J]. Chin Matern Child Health Care, 2014, 29(26): 4335–4336.
- [47] 叶青, 周永贤, 洗懿雅, 等. 824 例婴幼儿血清 25-羟基维生素 D 检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(14): 2209–2211.
- Ye Q, Zhou YX, Xian YY, *et al.* Analysis of serum 25-hydroxyvitamin D test results in 824 infants [J]. Chin Matern Child Health Care, 2015, 30(14): 2209–2211.
- [48] 刘冬妹, 吴红丽, 李兰, 等. 秦皇岛地区儿童 25-羟基维生素 D₃ 检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, (24): 3480–3481.
- Liu DM, Wu HL, Li L, *et al.* Analysis of 25-hydroxyvitamin D₃ test results in children in Qinhuangdao area [J]. Int J Lab Med, 2017, (24): 3480–3481.
- [49] 桂香. 克隆酶供体免疫测定法检测 25-羟基维生素 D 试剂盒的检测意义与性能评价[J]. 华夏医学, 2017, 30(4): 86–91.
- Gui X. Detection and performance evaluation of 25-hydroxyvitamin D kit by cloning enzyme donor immunoassay [J]. Huaxia Med, 2017, 30(4): 86–91.
- [50] Ersfeld DL, Rao DS, Body J, *et al.* Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISON[®] automated analyzer [J]. Clin Biochem, 2004, 37(10): 867–874.
- [51] 宋翠翠, 李昕, 卢菲, 等. 25-羟基维生素 D 化学发光检测试剂盒的研发[J]. 生物学杂志, 2017, 34(5): 108–112.
- Song CC, Li X, Lu F, *et al.* Development of 25-hydroxy vitamin D chemiluminescence detection kit [J]. J Biol, 2017, 34(5): 108–112.
- [52] 牟夏莲. 477 例小学生血清 25-羟基维生素 D 水平检测分析[J]. 中国医院统计, 2018, 25(5): 347–348.
- Meng XL. Detection and analysis of serum 25-hydroxyvitamin D levels in 477 primary school students [J]. Chin Hosp Stat, 2018, 25(5): 347–348.
- [53] 刘肖瑛. 2877 例婴幼儿血清 25-羟基维生素 D 检测结果分析[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(14): 68–69.
- Liu XY. Analysis of serum 25-hydroxyvitamin D test results in 2877 infants [J]. Chin Mod Med Appl, 2017, 11(14): 68–69.
- [54] 周东芳, 郭永平, 范婧晖, 等. 3371 例中孕妇女血清 25-羟基维生素 D 检测结果分析[J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(3): 19–20.
- Zhou DF, Guo YP, Fang JH, *et al.* Analysis of serum 25-hydroxyvitamin D test results in 3371 pregnant women [J]. Trace Elem Health Res, 2015, 32(3): 19–20.
- [55] 阳利龙, 银雪花, 祝文兵, 等. HPLC 测定血清中 25-羟基维生素 D₃ 和维生素 A 及应用[J]. 儿科药理学杂志, 2010, 16(3): 41–43.
- Yang LL, Yin XH, Zhu WB, *et al.* Determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and vitamin A in serum by HPLC and its application [J]. Pediatr Pharm J, 2010, 16(3): 41–43.
- [56] 叶怀庄, 章殷捷. 高效液相色谱法检测晚发性佝偻病儿童血浆 25-羟基维生素 D-3[J]. 中国全科医学, 2004, (14): 1054–1056.
- Ye HZ, Zhang YJ. Determination of plasma 25-hydroxyvitamin D-3 in children with late onset rickets by high performance liquid chromatography [J]. Chin Gen Pract, 2004, (14): 1054–1056.
- [57] 胡哲益, 张梦琪, 刘海明, 等. LC-MS/MS 法分析人体内 25-羟基维生素 D-2 和 25-羟基维生素 D-3 浓度的系统综述[J]. 上海医药, 2011, 32(10): 477–480.
- Hu ZY, Zhang MQ, Liu HM, *et al.* Systematic review of the concentration of 25-hydroxyvitamin D-2 and 25-hydroxyvitamin D-3 in human by LC-MS/MS [J]. Shanghai Pharm, 2011, 32(10): 477–480.
- [58] Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, *et al.* Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D₃ C3-epimer [J]. Clin Biochem, 2013, 46(3): 190–196.
- [59] Tai SSC, 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 [J]. Anal Chem, 2010, 82(5): 1942–1948.
- [60] 曾义. 高效液相色谱-质谱法检测血清中维生素 D 含量[J]. 中国药业, 2013, 22(20): 17–18.
- Zeng Y. Determination of vitamin D in serum by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin Pharm Ind, 2013, 22(20): 17–18.
- [61] 曾贞, 郭艳, 马美美, 等. 佛山市南海区 5017 名儿童 25-羟基维生素 D 检测结果分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2015, 23(10): 1101–1103.
- Zeng Z, Guo Y, Ma MM, *et al.* Analysis of detection results of 25-hydroxyvitamin D in 5017 children in Nanhai district, Foshan city [J]. China Child Health Magaz, 2015, 23(10): 1101–1103.
- [62] Higashi T, Awada D, Shimada K. Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-Hydroxyvitamin D₃ in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a cookson-type reagent [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(7): 738–743.
- [63] Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, *et al.* Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2004, 50(8): 1415–1417.
- [64] Maunsell Z. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D₂ and D₃ [J]. Clin Chem, 2005, 51(9): 1683–1690.
- [65] Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE, *et al.* Quantification of serum

25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 125(6): 914–920.

[66] Højskov CS, Heickendorff L, Møller HJ. High-through put liquid-liquid extraction and LC-MS/MS assay for determination of circulating 25(OH) vitamin D₃ and D₂ in the routine clinical laboratory [J]. *Clin Chim ACTA*, 2010, 411(1–2): 114–116.

[67] Petruzzello F, Grand-Guillaume PA, Thorimbert A, *et al.* Quantitative profiling of endogenous fat-soluble vitamins and carotenoids in human plasma using an improved UHPSFC-ESI-MS interface [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(14): 7615–7622.

[68] Kushnir MM, Ray JA, Rockwood AL, *et al.* Rapid analysis of 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and association of vitamin D and parathyroid hormone concentrations in healthy adults [J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 134(1): 148–156.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



曾伟杰, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。

E-mail: 17888803507@163.com



时国庆, 副教授, 主要研究方向为环境与食品安全监测技术。

E-mail: shiguoqing@ustb.edu.cn



谢 洁, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为质谱应用分析。

E-mail: xiejie@nim.ac.cn