

• 短篇论著 •

## 液质联用定量血清中维生素 D、A、E 的方法\*

李金蓉<sup>1</sup>, 阮亮亮<sup>1,2,3△</sup>, 杨文初<sup>1</sup>

(1. 上海枫林医药医学检验有限公司特检部, 上海 200031; 2. 上海医药临床研究中心, 上海 200031; 3. 上海生物样本库工程技术研究中心, 上海 200031)

**摘要:**目的 本文旨在建立并验证一种准确、方便、快速同时定量人血清中四种脂溶性维生素 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> (25OHVD<sub>2</sub>)、25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (25OHVD<sub>3</sub>)、维生素 A、维生素 E 的液质联用方法, 以满足临床研究、临床诊断对其检测的需求。方法 100 μL 血清样品经液-液萃取纯化, 4 种分析物经反相色谱分离、质谱 MRM 扫描模式下检测。采用自配并经验证的替代基质, 对内源性分析物进行准确的标准曲线定量。分离定量在 5 min 的时间里完成。结果 提出并成功验证了代替基质法为基础的 LC-MS/MS 4 种内源性维生素的定量方法。代替基质容易配制, 性能优越, 定量方便。方法的检测线性范围分别为 25OHVD<sub>2</sub>: 0.5~50.0 ng/mL, 25OHVD<sub>3</sub>: 2~200 ng/mL, 维生素 A: 100~10 000 ng/mL, 维生素 E: 300~30 000 ng/mL。四种分析物的日内及日间精密度和准确度偏差均在 ±20% 以内。血清样品室温、冻融及 1 个月长期稳定性均满足评判标准。结论 实验结果说明此方法具有准确、可靠, 稳定、耐用性及快速等优点, 适用于临床样本的分析。

**关键词:**脂溶性维生素; 液相色谱串联质谱法; 替代基质**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.028**中图法分类号:**R446.11+2**文章编号:**1673-4130(2019)07-0876-06**文献标识码:**B

脂溶性维生素是人体必需的营养成分, 在人体的生理、病理上起着至关重要的作用。越来越多的研究证据表明, 脂溶性维生素 A、D、E 与人体多种生理代谢性疾病相关联。最近的大量研究表明, 维生素 D 缺乏除会引起传统认识到的儿童佝偻病外<sup>[1]</sup>, 还与冠心病, 糖尿病, 小儿头疼, 癌症等众多疾病关系密切<sup>[2-5]</sup>。维生素 D 的检测已成为目前最为活跃的疾病标志物检测领域之一。维生素 A 除与视力的发育及功能, 性功能等有关外<sup>[6-7]</sup>, 最新研究表明, 维生素 A 在慢性的移植抗宿主疾病中具有改善皮肤的纤维化的功效<sup>[8]</sup>。维生素 E 作为抗氧化剂, 普遍认为具有抗衰老的作用, 最新发现维生素 E 缺乏也会导致卵巢激素的缺乏, 从而会引起相关的疾病<sup>[9-10]</sup>。目前, 检测维生素的方法主要有免疫分析法、高效液相色谱法、液质联用 LC-MS/MS 法等<sup>[11-13]</sup>。LC-MS/MS 方法相比于免疫分析法具有特异性和灵敏度高优点。因此, 液质联用的方法已经广泛被运用在测量生物标记物方面。现今, 已经有部分研究运用液质联用的方法同时分析脂溶性维生素 A、D、E<sup>[14-16]</sup>。这些方法, 在分析时间、灵敏度、方法成本等方面尚有诸多不足。此外, 这些维生素是人血清内源物质, 无法找到不含这些分析物的人空白血清配制校正标准做定量标准曲线, 从而增加了一般方法的临床应用难度。本文首次提出

并验证了以代替基质为基础的 LC-MS/MS 法, 在 5 min 时间里完成了四种成分的同时准确定量, 节省了试剂成本和时间成本。通过方法学验证, 证明了方法适用于人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> (25OHVD<sub>2</sub>)、25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (25OHVD<sub>3</sub>)、维生素 A、维生素 E 的同时定量。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 液相色谱为 LC20AD XR HPLC pumps 及 SIL-20AC XR 自动进样器; 质谱为 AB Sciex QTrap5500 型质谱仪。分析天平为赛多利斯公司 CPA225D 型; 氮吹仪为 Zymark 公司 Turbo Vap 型; 多管涡旋振荡器为 Scientific Industry 公司产品; 离心机为 Thermoscientific 公司 CL31R 型。25OHVD<sub>2</sub>、25OHVD<sub>3</sub>、2H3-25-Hydroxy 维生素 D<sub>2</sub>、2H6-25-Hydroxy 维生素 D<sub>3</sub> 购买自 IsoSciences 公司; 维生素 A 购买自 Sigma-Aldrich; 维生素 E 购买自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 2H6-Retinol, 购买自 ISOREAG 公司; 维生素 E-d6: 购买自 Toronto Research Chemicals 公司。试剂如环己烷、甲醇、甲酸, 甲酸铵均购买自 sigma-Aldrich 公司。水为 Millipore 生产双蒸水。

## 1.2 方法

**1.2.1 工作液的配制** 四种化合物的标准曲线工作液 (SWS1~SWS8) 及最低检测线、低、中、高 4 个水平

\* 基金项目: 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金重点资助项目 (201701-XHA2023-004); 国家重点研发计划 (2016YFC1201804); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (18DZ2294100)。

△ 通信作者, E-mail: liangliang\_ruan@srcnet.org。

本文引用格式: 李金蓉, 阮亮亮, 杨文初. 液质联用定量血清中维生素 D、A、E 的方法[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(7): 876-881.

的质控工作液 (QWS-LL、QWS-L、QWS-M、QWS-H),按表 1 中浓度由高浓度逐级溶剂稀释配制。

表 1 标准曲线工作液和质控工作液名称和浓度 (ng/mL)

| 工作液名称  | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 A  | 维生素 E   |
|--------|---------------------|---------------------|--------|---------|
| SWS 8  | 200                 | 800                 | 40 000 | 120 000 |
| SWS 7  | 180                 | 720                 | 36 000 | 108 000 |
| SWS 6  | 140                 | 560                 | 28 000 | 84 000  |
| SWS 5  | 100                 | 400                 | 20 000 | 60 000  |
| SWS 4  | 50                  | 200                 | 10 000 | 30 000  |
| SWS 3  | 10                  | 40                  | 2000   | 6 000   |
| SWS 2  | 5                   | 20                  | 1000   | 3 000   |
| SWS 1  | 2                   | 8                   | 400    | 1 200   |
| QWS-H  | 150                 | 600                 | 30 000 | 90 000  |
| QWS-M  | 30                  | 120                 | 6 000  | 18 000  |
| QWS-L  | 6                   | 24                  | 1 200  | 3 600   |
| QWS-LL | 2                   | 8                   | 400    | 1 200   |

1.2.2 代替基质及其效能的平行试验验证

1.2.2.1 代替基质及其配制按本实验室自行开发的方法配制 代替基质由实验室易得的化学品配制而成。

1.2.2.2 平行试验验证 (1)取 6 份至少 6 个不同来源的混合血清,添加工作液,对得到的样品进行标准加入法分析,外推得到本底浓度,从而得到各点的理论浓度,此数据用作为浓度的参照值。(2)用代替基质做标准曲线,对上述样品进行定量,测得浓度;(3)计算代替基质测定结果的准确度,从而验证代替基质的可行性。

1.2.3 质控样品的配制

1.2.3.1 分析批代替基质质控的配制 分析批质控样品包括最低检测线质控 (LLOQ)、低浓度质控 (LQC)、中浓度质控 (MQC) 和高浓度质控 (HQC) 4 个水平,由表 1 中各质控工作液 25 μL 依次加入到 100 μL 替代基质中配制而成。每个分析批次均新鲜配制。

1.2.3.2 血清质控样品的配制 高血清质控样品 (HQC-Sr)是将标曲工作液中的最高浓度点以工作液:血清=1:20 的比例加入血清中混匀所得。中血清质控样品 (MQC-Sr)为血清样品测试得到的本底浓度。

1.2.4 样品处理

1.2.4.1 校准曲线及批内质控品的处理方法 25 μL 标曲工作液,或代替基质质控工作液分别加入 100 μL 替代基质中,加入 200 μL 内标溶液,涡旋混匀,加入 900 μL 环己烷,涡旋 5 min,高速离心 5 min;转移 800 μL 上清至另一离心管,氮气吹干;加入 100 μL 80% 甲醇水溶液复溶,涡旋离心后,取上清进样分析。

1.2.4.2 血清样品的处理方法 25 μL 甲醇加入

100 μL 血清样本中,加入 200 μL 内标溶液,涡旋 10 s,加入 900 μL 环己烷,涡旋 5 min,高速离心 5 min;转移 800 μL 上清至另一离心管,氮气吹干后加入 100 μL 80% 甲醇水溶液进行复溶,涡旋离心后,取上清进样分析。

1.2.5 LC-MS/MS 方法参数 实验使用 APCI 离子源,多反应监测模式 (MRM) 进行选择离子扫描定量,质谱参数如下。雾化气 (Gas 1):70 psi;喷雾电压:3 V;气帘气 (CUR):25 psi;碰撞气 (CAD):Medium;离子源温度 (TEM):550 ℃。各化合物及其内标的过渡离子对如下,25OHVD<sub>3</sub>:383.4→365.3,25OHVD<sub>2</sub>:395.3→209.1,维生素 A:269.0→93.0,维生素 E:431.4→165.2;d3-25OHVD<sub>2</sub>:398.3→230.2,d6-25OHVD<sub>3</sub>:389.4→371.3,维生素 E-d6:437.5→171.1,维生素 A-d6:275.1→175.8。液相分离选用 Thermo scientific 公司 Accucore 色谱柱 C18,50×2.1 mm,2.6 μm;流动相 A 为 0.2% 甲酸-1 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液,流动相 B 为 0.2% 甲酸-1 mmol/L 甲酸铵水溶液;流速:0.5 mL/min;柱温:40 ℃,自动进样器温度:4 ℃。洗脱步骤如下:0~1.5 min 有机相比例从 70% 升至 95%,保留 1.8 min,然后在 0.2 min 时间内升至 100% 有机相,保留 1.6 min,之后回到初始有机相比例,停留 0.5 min。最终在 5 min 时间里完成分析。代表性的图谱见图 1。样品浓度分别为 25OHVD<sub>2</sub>:20 ng/mL,25OHVD<sub>3</sub>:80 ng/mL,维生素 A:4 000 ng/mL,维生素 E:12 000 ng/mL。

2 结 果

2.1 代替基质的可行性平行试验验证 如表 2 所示。内源性物质常规的定量方法为标准加入法,此测定结果在这里作为参照标准。用代替基质所做的标曲,得到相关系数  $r>0.990 0$ 。用此标曲定量标准添加法的样品,得到的值与标准加入法对比,以评价代替分析物的可用性。4 种化合物的用替代基质测定的偏差均在 ±20% 以内。由此证明所配制的替代基质可以作为定量真实血清样本的替代基质,结果可靠。

2.2 血清基底值测试 方法的可靠性必须通过真实的血清质控品来验证。本实验中以替代基质配制四个水平 LLOQ、LQC、MQC、HQC 的质控和两个水平的真实血清质控 MQC-Sr (混合血清本底值)/HQC-Sr (标准加入一定量的混合血清值)各平行 6 份,按照样品前处理方法处理。上机测试得到血清 MQC/HQC 的实测浓度值。此值作为后期日内及日间准确度与精密度及稳定性测试的标准值。加入此两个水平的质控样本的目的一是为了说明方法适用于临床真实样本的测试,另一方面也说明了混合了不同来源的人血清样本中几乎不含对定量有干扰的物质。说明方法具有特异性。各化合物血清本底测试值由于篇幅限制未呈现。

2.3 日内及日间准确度与精密度 为了考察方法的

日内及日间准确度与精密度,配制了 6 个水平的质控品考察实测值与理论值之间的偏差。分别在 3 个不同的分析批及不同天对 6 个水平的质控品进行比较。

根据测试结果,准确度与精密度的偏差均在±20%以内,符合生物样本分析的评判标准。见表 3。

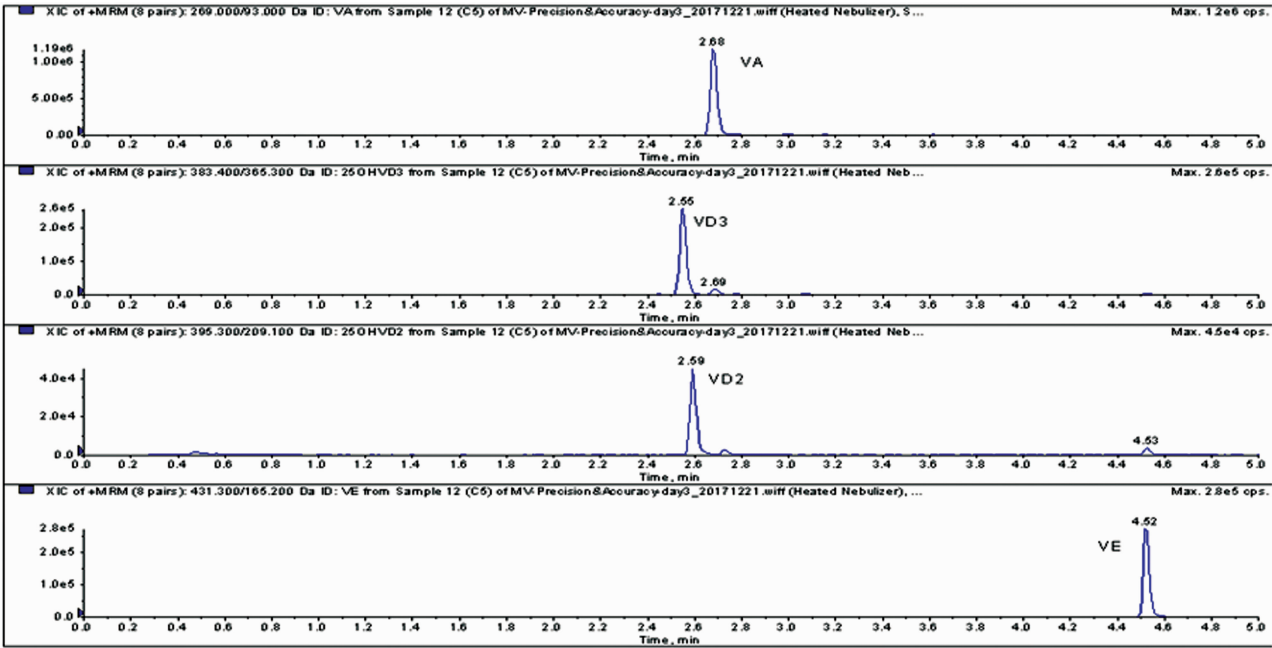


图 1 4 种化合物在 5 min 的 LC-MS/MS 的代表性色谱图

表 2 替代基质可行性的平行实验数据

| 样品名称  | 标准加入后的理论值 A(ng/mL)  |                     |        |        | 替代基质标曲测量值 B(ng/mL)  |                     |        |        | 使用替代基质的误差(%)        |                     |       |       |
|-------|---------------------|---------------------|--------|--------|---------------------|---------------------|--------|--------|---------------------|---------------------|-------|-------|
|       | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 A  | 维生素 E  | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 A  | 维生素 E  | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 A | 维生素 E |
| SAS 0 | 1.25                | 32.2                | 4 780  | 7 310  | 1.11                | 25.6                | 4 500  | 8 640  | -11.1               | -20.1               | -5.9  | 18.2  |
| SAS 1 | 46.30               | 212.0               | 13 800 | 34 300 | 44.90               | 202.0               | 12 900 | 34 200 | -2.9                | -4.8                | -6.4  | -0.3  |
| SAS 2 | 36.30               | 172.0               | 11 800 | 28 200 | 37.70               | 146.0               | 10 800 | 32 200 | 4.0                 | -15.2               | -8.3  | 13.7  |
| SAS 3 | 26.30               | 132.0               | 9 780  | 22 300 | 28.60               | 123.0               | 9 160  | 23 700 | 9.0                 | -7.0                | -6.4  | 6.2   |
| SAS 4 | 13.80               | 82.2                | 7 280  | 14 800 | 15.50               | 65.7                | 7 360  | 14 800 | 12.7                | -20.1               | 1.1   | -0.1  |
| SAS 5 | 3.75                | 42.2                | 5 280  | 8 810  | 4.03                | 38.5                | 4 910  | 9 200  | 7.5                 | -8.9                | -7.1  | 4.4   |

2.4 稳定性

2.4.1 储备液稳定性 实验中考察了储备液在-20℃冰箱 1 个月的稳定性,结果符合新旧比对偏差在±10%以内的评判标准。此外,还考察了储备液在室温放置 6 h 的稳定性,结果也符合差异±10%以内的评判标准,说明使用的储备液在一个月的时间内是保持稳定的,且室温放置 6 h 及以内不会影响检测结果。

2.4.2 工作液的室温稳定性 接近 LLOQ 的浓度点放置在室温 6 h,与新鲜配制的相同浓度点比较,结果符合偏差在±10%以内的评判标准。本实验中使用的的工作液自开始验证配制后储存在-20℃冰箱到完成验证实验 1 个月的时间里保持稳定,说明工作液在 1 个月的时间里是稳定的。由此,方法中使用的工作液放置在室温 6 h 及以内,以及储存在-20℃冰箱 1 个月时间均不会对结果产生显著影响。

2.4.3 短期稳定性 考察替代基质质控 LQC 和 HQC 及血清质控 MQC-Sr 和 HQC-Sr 共四个水平在室温放置 24 h 的稳定性。由实验结果得知,

250HVD<sub>2</sub>,25OHVD<sub>3</sub> 及维生素 E 三种成分的替代基质质控和血清质控在室温放置 24 h 均稳定。维生素 A 替代基质质控在室温放置 24 h 不稳定,每次分析需要新鲜配制。而血清质控是稳定的,说明真实样本即使在室温放置 24 h 依然呈稳定状态。限于篇幅,数据未列出。为了考察维生素 A 替代基质质控品的稳定性状态,接着又考察了其 2、4、6 h,稳定性。由数据发现,维生素 A 在 2 h 里都会有近 30%的降解,进一步说明维生素 A 的替代基质质控需新鲜制备,不适用于室内保存。

2.4.4 冻融稳定性 考察了血清 MQC-Sr 和 HQC-Sr 两个浓度水平,将早先配制好储存在冰箱的 HQC-Sr 及 MQC-Sr 放置室温解冻后,再次存储回-20℃冰箱冷冻至少 12 h 以上再次解冻,依次循环 3 次考察其经过 3 次冻融循环后浓度与理论浓度之间的偏差。经过试验,得知血清在经过 3 个冻融循环后,依然可以保持稳定。不影响检测结果。满足生物分析方法学±20%以内的评判标准。限于篇幅,数据未列出。

**2.4.5 长期稳定性** 考察了真实的血清质控品放置在一20℃冰箱1个月的稳定性状态。由于短期稳定性考察中维生素A替代基质质控品在室温放置不稳定,这里还考察了替代基质质控品在一20℃冰箱放置

3 d 的稳定性。由表4得到,血清质控在一20℃冰箱放置1个月的时间里仍然稳定,且4种成分的替代基质质控放置在一20℃冰箱3 d 时间里也是稳定的。

表 3 日内及日间准确度与精密度(%)

| 化合物名称及质控名称          | 日内准确度( <i>n</i> =6) |       | 日内精密度( <i>n</i> =6) |      | 日间准确度( <i>n</i> =18) |      | 日间精密度( <i>n</i> =18) |      |
|---------------------|---------------------|-------|---------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| 25OHVD <sub>2</sub> |                     |       |                     |      |                      |      |                      |      |
| LLOQ                | −11.3               | 7.2   | 11.3                | 16.0 | 9.2                  | 2.2  | 2.4                  | 9.6  |
| LQC                 | −3.0                | 9.3   | −2.1                | 7.6  | 13.5                 | 9.0  | 1.4                  | 14.6 |
| MQC                 | −1.7                | −7.2  | −6.7                | 9.2  | 6.7                  | 9.2  | −5.2                 | 6.6  |
| HQC                 | −0.3                | −4.4  | 1.5                 | 6.0  | 6.9                  | 7.2  | −1.1                 | 6.7  |
| MQC-Sr              | −3.9                | 3.0   | 15.6                | 15.0 | 18.8                 | 10.0 | 4.9                  | 18.4 |
| HQC-Sr              | −1.7                | −1.6  | 5.8                 | 4.8  | 4.5                  | 12.3 | 0.8                  | 4.4  |
| 25OHVD <sub>3</sub> |                     |       |                     |      |                      |      |                      |      |
| LLOQ                | −2.0                | 6.3   | 13.9                | 10.7 | 9.7                  | 7.3  | 6.1                  | 9.7  |
| LQC                 | 18.7                | 14.7  | 15.4                | 9.2  | 5.7                  | 9.1  | 16.2                 | 5.7  |
| MQC                 | 5.6                 | 3.3   | 4.9                 | 9.1  | 11.6                 | 10.9 | 4.6                  | 11.4 |
| HQC                 | −0.3                | −1.8  | 2.3                 | 9.8  | 5.3                  | 5.9  | 0.1                  | 5.2  |
| MQC-Sr              | 0.7                 | −5.2  | 9.2                 | 7.4  | 8.2                  | 9.4  | 1.6                  | 7.7  |
| HQC-Sr              | −2.3                | −5.8  | 0.5                 | 10.4 | 13.6                 | 6.5  | −2.6                 | 13.1 |
| 维生素 A               |                     |       |                     |      |                      |      |                      |      |
| LLOQ                | 19.5                | 2.8   | −20.2               | 11.2 | 12.1                 | 19.2 | 0.7                  | 5.8  |
| LQC                 | −0.7                | −8.7  | −1.8                | 13.5 | 7.0                  | 26.0 | −3.7                 | 3.4  |
| MQC                 | −8.9                | −4.3  | −16.6               | 4.5  | 6.9                  | 10.4 | −9.9                 | 7.7  |
| HQC                 | −1.9                | −6.5  | −9.6                | 5.7  | 7.2                  | 10.5 | −6.0                 | 7.0  |
| MQC-Sr              | 1.4                 | 1.2   | −8.1                | 4.8  | 16.1                 | 9.7  | −1.8                 | 9.3  |
| HQC-Sr              | 0.5                 | −10.1 | −12.7               | 6.2  | 7.6                  | 9.3  | −7.4                 | 7.1  |
| 维生素 E               |                     |       |                     |      |                      |      |                      |      |
| LLOQ                | 4.1                 | −6.4  | 4.6                 | 9.9  | 6.3                  | 9.3  | 0.7                  | 12.3 |
| LQC                 | 4.9                 | 3.0   | 0.9                 | 9.6  | 3.4                  | 12.0 | 2.9                  | 6.6  |
| MQC                 | −1.6                | 0.7   | −5.0                | 6.2  | 7.5                  | 7.2  | −2.0                 | 7.3  |
| HQC                 | 1.0                 | 1.3   | 0.6                 | 8.0  | 6.9                  | 6.1  | 1.0                  | 7.2  |
| MQC-Sr              | −1.1                | 2.5   | −6.9                | 6.0  | 8.9                  | 5.5  | −1.8                 | 16.6 |
| HQC-Sr              | 5.3                 | 0.8   | −6.4                | 11.1 | 7.1                  | 6.8  | −0.1                 | 7.3  |

表 4 4 种化合物的长期稳定性(n=6)

| 样品名称                                   | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 E   | 维生素 A |
|----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------|-------|
| 质控品理论值(ng/mL)                          |                     |                     |         |       |
| LQC                                    | 1.50                | 6.00                | 900     | 300   |
| HQC                                    | 37.5                | 150                 | 22 500  | 7 500 |
| MQC-Sr                                 | 0.800               | 27.6                | 9 520   | 6 760 |
| HQC-Sr                                 | 11.5                | 72.4                | 15 000  | 9 120 |
| 替代基质质控放置 3 d 及血清质控放置 1 个月后测量平均值(ng/mL) |                     |                     |         |       |
| LQC                                    | 1.42                | 6.35                | 920     | 256   |
| HQC                                    | 41.3                | 157                 | 25 400  | 6 740 |
| MQC-Sr                                 | 0.77                | 26.3                | 8 930   | 6 400 |
| HQC-Sr                                 | 11.6                | 69.4                | 14 000  | 8 040 |
| 标准偏差(ng/mL)                            |                     |                     |         |       |
| LQC                                    | 0.204               | 0.28                | 59.2    | 15.3  |
| HQC                                    | 1.100               | 3.22                | 1 150.0 | 130.0 |
| MQC-Sr                                 | 0.067               | 1.43                | 552.0   | 93.0  |
| HQC-Sr                                 | 0.779               | 3.00                | 412.0   | 230.0 |
| 准确度(%)                                 |                     |                     |         |       |
| LQC                                    | −5.2                | 5.9                 | 2.3     | −14.8 |
| HQC                                    | 10.1                | 4.7                 | 12.8    | −10.1 |
| MQC-Sr                                 | −4.0                | −4.7                | −6.2    | −5.3  |
| HQC-Sr                                 | 1.7                 | −4.1                | −6.6    | −11.8 |

续表 4 4 种化合物的长期稳定性 (n=6)

| 样品名称    | 25OHVD <sub>2</sub> | 25OHVD <sub>3</sub> | 维生素 E | 维生素 A |
|---------|---------------------|---------------------|-------|-------|
| 精密度 (%) |                     |                     |       |       |
| LQC     | 14.4                | 4.5                 | 6.4   | 6.0   |
| HQC     | 2.7                 | 2.1                 | 4.5   | 1.9   |
| MQC-Sr  | 8.7                 | 5.5                 | 6.2   | 1.5   |
| HQC-Sr  | 6.7                 | 4.3                 | 2.9   | 2.9   |

3 讨 论

同时高效、精确定量人血清中 25OHVD<sub>2</sub>、25OHVD<sub>3</sub>、维生素 A、维生素 E 四种脂溶性维生素是一挑战性课题。原因一,四种物质在血清中含量分布很宽,从 25OHVD<sub>2</sub> 的纳克级以下,到维生素 E 的微克级以上,因此要求方法的线性范围宽。本方法即可灵敏地定量到低浓度的 25OHVD<sub>2</sub>,也可检测到高浓度维生素 E;原因二,作为内源性化合物的空白基质的不可得到性。市面上尚无包含这四种维生素的标准品和质控品,即使有,方法的成本也会很高,直接影响方法的广泛应用性。对内源性生物标志物的定量,如果空白基质无法得到,通常采取代替分析物或代替基质法。以同位素为基础的代替分析物法,尽管方法发展较容易,但成本较高,而且后续样品分析因不可用标曲直接定量而较麻烦。选用代替基质法,一旦代替基质的可用性得到证明,方法应用到样品分析则如常规定量分析一样,无附加步骤。但代替基质需反复筛选,以期其性能满足分析要求。经过大量筛选优化实验,本实验室制得了一种易得且性能可靠的代替基质。通过实验,其可用性得到证实。该方法使用了自配易得的替代基质来制备校准品和质控品,缩减了成本,提高了经济效益,使得方法更加实用。其三是方法的灵敏度和样品用量。由于 25OHVD<sub>2</sub> 的浓度很低,为达到准确定量,一般报道的方法样品用量都较大。而本方法只需 100 μL 血清就能达到较低的检测限,完全满足临床样本的分析要求,减轻了患者的痛苦。经过方法学验证,证明了该方法具有灵敏度高、可靠、稳定、耐用、快速等优点。本方法适用于临床样本的分析。目前该方法已在本实验室服务于临床样品分析。

参考文献

[1] WACKER M, HOLICK M F. Vitamin D-effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation [J]. *Nutrients*, 2013, 5(1): 111-148.

[2] LEILA H, SZABOLCS V, ESZTER M H, et al. Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency; Vascular consequences[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2018, 15(4): 294-301.

[3] ALAM U, FAWWAD A, SHAHEEN F, et al. Improvement in neuropathy specific quality of Life in patients with diabetes after vitamin D supplementation [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 7928083.

[4] DONMEZ A, ORUN E, SONMEZ F M. Vitamin D status in children with headache: A case-control study [J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2018, 23(1): 222-227.

[5] HU M J, ZHANG Q, LIANG L, et al. Association between vitamin D deficiency and risk of thyroid cancer: a case-control study and a meta-analysis [J]. *J Endocrinol Invest*, 2018, 41(10): 1199-1210.

[6] STEPHENSEN C B. Vitamin A, infection, and immune function [J]. *Annu Rev Nutr*, 2001, 21(1): 167-192.

[7] JIANG Y W, CHEN L, TAYLOR R N, et al. Physiological and pathological implications of retinoid action in the endometrium [J]. *J Endocrinol*, 2018, 236(3): 169-188.

[8] YAMAKAWA T, OHIGASHI H, HASHIMOTO D, et al. Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2018, 131(13): 1476-1485.

[9] POURAFSHAR S, JOHNSON S A, KESHAVARZ B, et al. The effects of supplemental vitamin E on hematological parameters in a rat model of ovarian hormone deficiency [J]. *Menopause*, 2018, 25(3): 336-342.

[10] HAHN H, JUNG H, SCHRAMMEK-DUSIOS M, et al. Instrumental evaluation of anti-aging effects of cosmetic formulations containing palmitoyl peptides, Silybum marianum seed oil, vitamin E and other functional ingredients on aged human skin [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(2): 1171-1176.

[11] GUO M, ZHU J, YANG T, et al. Vitamin A and vitamin D deficiencies exacerbate symptoms in children with autism spectrum disorders [J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 16(1): 1-11.

[12] ETIENNE C, PIERRE L, ANNE-CATHERINE B, et al. Analytical and clinical validation of the new Abbot Architect 25(OH)D assay: fit for purpose [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(3): 378-384.

[13] FERNANDEZ V P, VENTURA S T, et al. Determination of target fat-soluble micronutrients in rainbow trout's muscle and liver tissues by liquid chromatography with diode array-tandem mass spectrometry detection [J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(6): 886-896.

[14] PRIEGO C F, RUIZ J J, MATA GRANADOS J M, et al. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(11): 1745-1754.

- [15] ØIVIND M, MCCANN A, AARSETH O, et al. Combined measurement of 6 fat-soluble vitamins and 26 Water Soluble functional vitamin markers and amino acids in 50  $\mu$ L of serum or plasma by high-throughput mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2016, 88(21):10427-10436.
- [16] ØIVIND M, PER M U. Determination of vitamins A, D • 短篇论著 •

and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011, 25(14):1942-1948.

(收稿日期:2018-09-21 修回日期:2018-12-27)

## 尿毒症维持性血液透析患者血清 MMP-10 水平和心血管事件的相关性

李红艳, 凌 凯, 徐月霞, 徐红芳, 张 琴, 徐 燕  
(苏州市吴江第一人民医院肾内科, 江苏苏州 215200)

**摘 要:**目的 探讨终末期尿毒症维持性血液透析患者血清基质金属蛋白酶 10(MMP-10)水平与心血管事件的相关性。方法 选取行维持性血液透析的终末期尿毒症患者 80 例,采集患者空腹静脉血,采用酶联免疫吸附法检测血清 MMP-10 水平,并行血红蛋白(Hb)、清蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)及血脂检测;所有患者随访 24~36 个月,观察心血管事件发生情况。结果 80 例患者中 35 例发生心血管事件,发生率为 43.75%。与无心血管事件组比较,心血管事件组年龄明显增大,血清 MMP-10 水平明显增高,Hb、ALB 水平明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。Pearson 相关性分析显示,血清 MMP-10 水平与年龄呈正相关( $r=0.389, P<0.05$ );与 Hb、ALB 等呈负相关( $r=0.521, 0.389, 0.311, P<0.05$ )。多因素 Logistic 回归分析显示,年龄增大、血清 MMP-10 水平增高是终末期尿毒症患者心血管事件的独立危险因素( $P<0.05$ ),而 Hb、ALB 水平增高是终末期尿毒症患者心血管事件的独立保护因素( $P<0.05$ )。结论 终末期尿毒症患者血清 MMP-10 水平增高与心血管事件发生密切相关。

**关键词:**终末期尿毒症; 血液透析; 基质金属蛋白酶 10; 心血管事件

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.029

**中图法分类号:**R692.5

**文章编号:**1673-4130(2019)07-0881-04

**文献标识码:**B

心血管事件是行维持性血液透析(MHD)的终末期尿毒症患者主要死亡原因,其中透析血压波动、钙磷代谢紊乱、容量负荷重、血管钙化是 MHD 患者发生心血管事件的重要危险因素<sup>[1]</sup>。基质金属蛋白酶-10(MMP-10)是参与细胞外基质降解的重要因子,在心力衰竭发病中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。研究发现,终末期肾病患者 MMP-10 水平增高与钙磷代谢紊乱、血管钙化密切相关<sup>[3]</sup>。另有研究表明,MMP-10 水平与心脏功能有着紧密联系,是透析患者发生心室肥厚的独立危险因素<sup>[4]</sup>。然而,目前关于尿毒症患者 MMP-10 水平与心血管事件的关系尚不明确。因此,本研究对 2013 年 6 月至 2015 年 6 月本院 80 例终末期尿毒症患者血清 MMP-10 水平进行了检测,并分析了该指标与心血管事件发生的关系,旨在为早期预测尿毒症患者心血管事件发生提供一定依据,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 病例来源于 2013 年 6 月至 2015 年 6 月在本院肾内科行 MHD 治疗的终末期尿毒症患者。纳入标准:(1)均处于尿毒症期,肾小球滤过率(eGFR) $<15$  mL/min;(2)规律透析治疗 $>3$  个月;

(3)签署研究知情同意书。排除标准:(1)入组前 1 个月内有发生过心力衰竭、心律失常等急性心血管事件者;(2)急慢性感染者;(3)恶性肿瘤患者;(4)伴有自身免疫性疾病者;(5)先天性心脏病患者;(6)随访资料不齐全者。共纳入 80 例,其中男 43 例,女 37 例;年龄 21~85 岁,平均(60.24 $\pm$ 16.25)岁;透析月龄 7~122 个月,平均(94.36 $\pm$ 31.42)个月;80 例患者根据原发病情况分为慢性肾小球肾炎 53 例,高血压肾病 12 例,糖尿病肾病 8 例,多囊肾病 5 例,痛风性肾病 2 例。所有患者均采用瑞典 AK90 透析机及 F6 或 F8 聚砜膜透析器,以反渗水和碳酸氢盐为透析液。每周透析 3 次,每次透析时间为 4 h,透析液流量为 500 mL/min,血流量为 250~300 mL/min。

### 1.2 方法

**1.2.1 资料收集** 收集所有患者性别、年龄、体质量指数(BMI)、吸烟史、合并疾病(高血压、糖尿病)及原发病等情况。

**1.2.2 血清 MMP-10 及常规生化指标检测** 入组时(透析前),所有患者均抽取空腹状态下外周静脉血,采用酶联免疫吸附法检测血清 MMP-10 水平,试剂盒