

# 基于 UPLC-MS/MS 建立早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 和 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 检测新方法及临床初步应用

刘 浩, 彭 勇, 尹一帆, 叶 亮, 陈 敏, 苗静琨

(重庆市妇幼保健院 / 重庆医科大学附属妇女儿童医院儿科 / 新生儿筛查中心, 重庆 401147)

**摘要:**目的 建立血清 25-羟维生素 D<sub>3</sub>[25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>] 及 3-epi-25-羟维生素 D<sub>3</sub>[3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>] 超高效液相色谱-串联质谱检测新方法 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), 并在早产儿中开展初步应用。方法 采用液-液萃取法提取化合物, 五氟苯基丙基 (pentafluorophenyl propyl, PFPP) 色谱柱分离 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 从最低定量限、线性关系、精密度与准确度等四个方面对新建方法进行验证, 并对 134 例早产儿血清样本进行检测分析。结果 25-(OH)D<sub>3</sub> 及 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的最低定量限分别为 6.05 ± 0.78 nmol/L, 1.48 ± 0.20 nmol/L; 线性范围 3.78 ~ 480.00 nmol/L, 1.00 ~ 128.00 nmol/L; 相关系数  $r^2$  为 0.992 2, 0.992 8; 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 低、中、高浓度质控品的日内精密度和日间精密度均小于 15.00%; 回收率 109.92%, 102.25%, 98.76%; 97.75%, 95.25%, 99.80%。134 例早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 平均浓度 22.35 ± 13.28 nmol/L, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 平均浓度 5.43 ± 4.35 nmol/L; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 占总 25-(OH)D<sub>3</sub> 的平均比例为 19.96% ± 12.08%, 范围 0.00% ~ 60.62%。以 25-(OH)D<sub>3</sub> 计算, 维生素 D (Vitamin D, Vit D) 缺乏率、不足率、充足率分别为 78.36%, 19.40%, 2.24%; 以总 25-(OH)D<sub>3</sub> 计算, Vit D 缺乏率、不足率、充足率分别为 65.67%, 26.12%, 8.21%; 二者 Vit D 缺乏率及充足率的比较, 差异均有统计学意义 ( $\chi^2=5.351, 1.719, 4.823$ , 均  $P < 0.05$ )。结论 本研究建立的 UPLC-MS/MS 检测法性能良好且能精准检测早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度, 在早产儿 Vit D 评估方面具有较好的应用价值。

**关键词:** 维生素 D; 3-epi-25-羟维生素 D<sub>3</sub>; 超高效液相色谱-串联质谱; 早产儿

**中图分类号:** R714.21; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 03-170-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.031

## A Novel UPLC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Serum 25-(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> Followed by the Preliminary Application in Clinics

LIU Hao, PENG Yong, YIN Yi-fan, YE Liang, CHEN Min, MIAO Jing-kun

(Newborn Screening Center, Department of Pediatrics, Chongqing Health Center for Women and Children/Women and Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China)

**Abstract: Objective** To establish a novel ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for quantification of serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25-(OH)D<sub>3</sub>] and 3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>], and to assess the Vitamin D (Vit D) levels in premature infants. **Methods** The liquid-liquid extraction was used to extract compounds after protein precipitation, and pentafluorophenyl propyl (PFPP) column was used to resolve 25-(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Then used the established method for a clinical application in 134 premature infants after performance validation. **Results** For 25(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, the low limit of quantification (LLOQ) were 6.05 ± 0.78nmol/L, 1.48 ± 0.20 nmol/L. The linear ranges were 3.78~480.00nmol/L, 1.00~128.00nmol/L. The correlation coefficients ( $r^2$ ) were 0.992 2, 0.992 8. The relative standard deviations (RSD) of intra-day and inter-day for 25(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> with low, middle, high concentrations were all less than 15.00%. The recovery rates were 109.92%, 102.25%, 98.76% and 97.75%, 95.25%, 99.80%, respectively. The average serum concentrations of 25-(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> in 134 premature infants were 22.35 ± 13.28nmol/L and 5.43 ± 4.35 nmol/L, respectively. The percentage of 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> to total 25-(OH)D<sub>3</sub> was 19.96% ± 12.08%, ranging from 0.00% to 60.62%. Based on 25-(OH)D<sub>3</sub>, Vit D deficiency, insufficiency and sufficiency were 78.36%, 19.40% and 2.24%. While these values were 65.67%, 26.12% and 8.21%, respectively based on total 25-(OH)D<sub>3</sub>. The  $P$

**基金项目:** 重庆市卫健委资助项目 (2022WSJK018): 基于 UPLC-MS/MS 分析 VD 代谢通路新方法的建立及其临床应用研究; 重庆市妇幼保健院院级科研课题 (2019YJMS08): 维生素 A 通过肠道菌群影响妊娠期糖尿病及妊娠结局的研究。

**作者简介:** 刘浩 (1983-), 男, 医学硕士, 主管技师, 研究方向: 遗传代谢病发病机制及诊断研究, E-mail: 1320904@qq.com。

**通讯作者:** 苗静琨 (1979-), 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 遗传代谢病发病机制及诊治研究, E-mail: jennamiao@aliyun.com。

values of Vit D deficiency and Vit D sufficiency were both less than 0.05 ( $\chi^2=5.351, 1.719, 4.823$ , all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The novel UPLC-MS/MS method successfully detects the 25-(OH)D<sub>3</sub> and 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> in premature infants, which has a great value in clinical applications for Vit D assessment of premature infants.

**Keywords:** vitamin D; 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); premature infants

维生素D (vitamin D, Vit D) 是一种脂溶性维生素, 不仅具有调节钙磷吸收及保持骨骼健康的作用, 近年来还被发现具有促进细胞增殖分化及调节免疫系统的作用<sup>[1]</sup>。对于早产儿, Vit D 与新生儿呼吸窘迫综合征具有一定相关性, 研究发现早产儿血清 25-羟维生素 D[25-hydroxyvitamin D, 25-(OH)D] 降低是新生儿呼吸窘迫综合征的独立危险因素之一<sup>[2]</sup>。因此, 准确评估早产儿 Vit D 水平具有十分重要的意义。

25-(OH)D 是评估人体 Vit D 水平的理想标记物。由于新生儿体内的 25-羟维生素 D<sub>2</sub>[25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub>, 25-(OH)D<sub>2</sub>] 浓度过低, 几乎可以忽略, 因此可通过血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 来衡量其体内 Vit D 水平<sup>[3]</sup>。3-epi-25-羟维生素 D<sub>3</sub>[3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>] 是人体 25-羟维生素 D<sub>3</sub>[25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>] 的一个代谢产物, 其分子式与 25-(OH)D<sub>3</sub> 完全相同; 从空间结构来看, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 是 25-(OH)D<sub>3</sub> 的差向异构体, 由 25-(OH)D<sub>3</sub> 在肝细胞、骨细胞或皮肤细胞中差向异构酶的作用下生成, 其结构上的差异表现为其 C3 端的羟基发生了空间变化, 由  $\alpha$  方向转变为  $\beta$  方向<sup>[4]</sup>。3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的下游代谢产物为 3-epi-1 $\alpha$ , 3-epi-1 $\alpha$ , 25-双羟维生素 D<sub>3</sub>[3-epi-1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] 与 1 $\alpha$ , 25-双羟维生素 D<sub>3</sub>[1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] 相比, 其调节血钙的作用明显减弱, 与 Vit D 受体的亲和力同样明显减弱致使基因调节与骨代谢调节作用显著降低, 几乎失去生理性功能<sup>[5]</sup>。因此, 评估体内 Vit D 水平时需要区分 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>。

目前, 临床上检测血清 Vit D 的方法主要包括免疫分析法 (简称免疫法) 和液相色谱-串联质谱法 (简称质谱法)。免疫法因交叉反应无法区分 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 而质谱法如果没有经过充分的色谱分离同样不能区分 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 两种方法均可造成 Vit D 检测发生误差<sup>[6]</sup>。近年来, 虽然应用串联质谱技术检测 25-(OH)D 越来越广泛, 但多数实验室在检测 25-(OH)D<sub>3</sub> 时并没有分离 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 无法达到准确评估 Vit D 的目的。因此, 本研究拟采用超高效液相色谱-串联质谱检测新方法 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-

MS/MS) 技术, 在充分分离 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的基础上建立同时准确定量检测血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的方法, 并在早产儿中开展初步应用。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2021 ~ 2022 年重庆市妇幼保健院新生儿科住院早产儿血液样本共 134 例, 其中男性 79 例, 女性 55 例; 孕周 20 ~ 36 周; 年龄 2 ~ 31 天; 体重 820 ~ 2 810 g。纳入研究的早产儿均未补充 25-(OH)D<sub>3</sub> 制剂。本研究已通过重庆市妇幼保健院伦理委员会审查批准, 批号 (2022) 伦审 (科) 027 号。

1.2 仪器与试剂 UPLC-MS/MS 仪 (美国 Waters 公司的 UPLC Xevo TQS); 纯水仪 (美国 Millipore 公司的 Synergy UV); 色谱柱 (Shim-pack Velox PFPP, 2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m) (日本岛津公司); 25-(OH)D<sub>3</sub> 标准品及其同位素内标 d6-25-(OH)D<sub>3</sub> (上海甄准生物科技有限公司); 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 标准品及其同位素内标 d6-3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> (加拿大 Toronto Research Chemicals 公司); 空白基质血清来自华大公司脂溶性维生素试剂盒; 色谱级甲醇与异丙醇 [霍尼韦尔贸易 (上海) 有限公司]; 正己烷 (成都市科隆化学品公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 试剂的配制: 标准品与内标干粉用甲醇溶解形成高浓度储存液, 然后再用甲醇配制为相应浓度的工作液, -80℃ 保存备用。标准曲线配制: 用空白基质溶液, 采用倍比稀释法配制 8 点标准曲线, 25-(OH)D<sub>3</sub> 标准曲线的浓度分别为 3.75, 7.50, 15.00, 30.00, 60.00, 120.00, 240.00 和 480.00 nmol/L; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 标准曲线的浓度分别为 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00, 32.00, 64.00 和 128.00 nmol/L。内标沉淀剂为甲醇与异丙醇以 8:2 的比例配制, d6-25-(OH)D<sub>3</sub> 与 d6-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的浓度均为 25.00 nmol/L。质控品配制: 用空白基质溶液配制低、中、高三个浓度的质控品, 25-(OH)D<sub>3</sub> 为 5.00, 50.00 与 200.00 nmol/L; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 为 1.25, 5.00 与 20.00 nmol/L。

1.3.2 样品前处理 取 100  $\mu$ l 血清于 1.5 ml EP 管中, 加入 200  $\mu$ l 内标沉淀剂, 旋涡震荡 3 min 后加入 1 ml 正己烷, 再旋涡震荡 3 min, 然后 19 000  $\times$  g 4℃ 离心 5 min, 取上清, 室温下氮气吹干, 加入 80  $\mu$ l 50% (v/v) 甲醇水复溶液, 混匀后上机检测。

1.3.3 色谱及质谱条件: 流动相 A 为 0.1% (v/v)

甲酸水, B相为0.1% (v/v) 甲酸-甲醇。梯度洗脱条件: 0 ~ 0.5min为50% (v/v) B相, 0.5 ~ 7.5min由50%均速升高至98%B相, 7.5 ~ 7.51min为50%B相, 保持98%B相至8min, 流速0.4 ml/min。柱温温度为45℃, 进样量10  $\mu$ l。采用大气压化学电离正离子 (atmospheric pressure chemical ionization positive mode, APCI<sup>+</sup>) 模式进行电离, 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式进行采集, 离子源电压550 V, 离子源温度150℃。各种化合物的其他质谱参数见表1。

表1 待测化合物的相关质谱参数

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
25-(OH)D <sub>3</sub>	383.42	211.27	50	24
		365.4	50	16
d6-25-(OH)D <sub>3</sub>	389.48	371.43	50	18
		211.29	50	24
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	383.43	365.41	50	20
		159.2	50	25
d6-3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	389.47	371.45	50	18
		159.2	50	25

1.3.4 方法学验证: 建立的UPLC-MS/MS检测法分别从最低定量限 (lower limit of quantification, LLOQ)、线性关系、精密度与准确度等四个方面进行验证。最低定量限的信噪比大于10且变异系数 (coefficient of variation, CV)  $\leq$  20.00% 为满足

要求; 线性关系以相关系数  $r^2 \geq 0.99$  为满足要求; 精密度以相对标准差 (relative standard deviation, RSD)  $< 15.00\%$  为满足要求; 准确度以回收率在  $\pm 15.00\%$  以内为满足要求<sup>[7]</sup>。

1.3.5 早产儿血清25-(OH)D<sub>3</sub>与3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>检测: 早产儿于住院期间采集约1 ml 静脉血, 样本离心后 (2 000 r/min) 分离血清, -80℃保存。采用新建方法检测早产儿血清25-(OH)D<sub>3</sub>与3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>; 总25-(OH)D<sub>3</sub>浓度为25-(OH)D<sub>3</sub>与3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>浓度之和。参照《2016年全球营养性佝偻病管理共识》及《2021中国儿童维生素A、维生素D临床应用专家共识》提出的儿童Vit D应用状况判断标准, 本研究以血清25-(OH)D<sub>3</sub>浓度小于30.00 nmol/L为缺乏; 30.00 ~ 50.00 nmol/L为不足; 大于50.00 nmol/L为适宜<sup>[8-9]</sup>。

1.4 统计学分析 采用Excel软件与SPSS11.0统计软件, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 率的比较采用两组率比较的卡方检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 25-(OH)D<sub>3</sub>与3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>的色谱图 见图1。25-(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>及同位素内标的保留时间为5.34 min和5.44 min, 总分析时间8.0 min。25-(OH)D<sub>3</sub>与d6-25-(OH)D<sub>3</sub>的定量离子对为383.41>211.27与389.48>371.43; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>与d6-3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>的定量离子对为383.43>365.41与389.47>371.45。

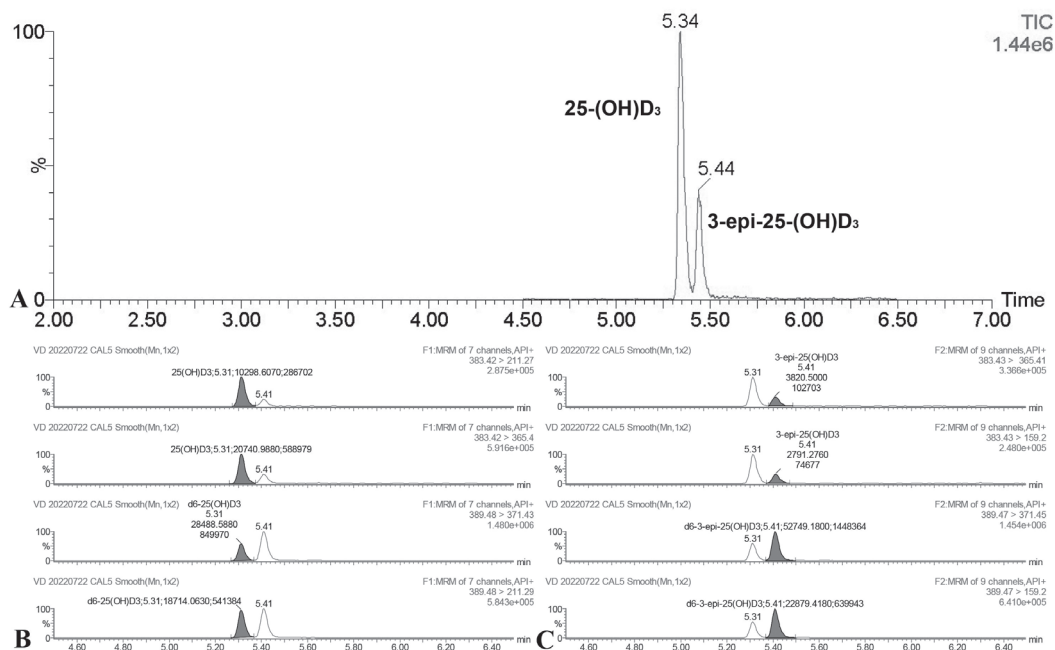


图1 25-(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>及其同位素内标的色谱图



2.2 方法学验证

2.2.1 LLOQ 及 线 性 关 系: 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的 LLOQ 见表 2。25-(OH)D<sub>3</sub> 线性范围 3.75 ~ 480.00 nmol/L, 相关系数  $r^2=0.991\ 1$ ; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的线性范围 1.00 ~ 128.00 nmol/L, 相关系数  $r^2=0.992\ 8$ 。

表 2 25-OH D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的最低定量限

项目	LLOQ ( nmol/L )	RSD ( % )	S/N
25-(OH)D <sub>3</sub>	6.05 ± 0.78	12.68	≥ 10
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	1.48 ± 0.20	12.57	≥ 10

2.2.2 日内精密密度与日间精密密度: 见表 3。25-(OH)D<sub>3</sub> 低、中、高三个浓度质控品的日内及日间精密密度均小于 15.00%; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 低、中、高三个浓度质控品的日内及日间精密密度同样均小于 15.00%。

2.2.3 准确度: 见表 4。25-(OH)D<sub>3</sub> 低、中、高三个浓度质控品的回收率分别为 109.92%, 102.25% 和 98.76%; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 低、中、高三个浓度质控品的回收率分别为 97.75%, 95.25% 和 99.80%。

2.2.4 血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 检测结果: 早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 检测结果见表 5。分别以 25-(OH)D<sub>3</sub> 与总 25-(OH)D<sub>3</sub> 评估

早产儿血清 Vit D 水平, 及二者 Vit D 缺乏率与充足率的比较见表 6。

表 3 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的日内与日间精密密度分析

项 目	浓度	日内精密密度 (nmol/L, n=10)	RSD (%)	日间精密密度 (nmol/L, n=5)	RSD (%)
25-(OH)D <sub>3</sub>	低	12.40 ± 1.48	11.84	11.08 ± 1.18	10.7
	中	51.05 ± 4.75	9.31	47.30 ± 2.98	6.31
	高	194.10 ± 10.15	5.23	203.43 ± 14.10	6.93
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	低	1.28 ± 0.18	14.65	1.43 ± 0.18	11.86
	中	4.75 ± 0.58	11.90	5.53 ± 0.80	14.36
	高	19.73 ± 1.10	5.58	20.73 ± 1.88	9.01

表 4 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的准确度分析

项目	浓度	理论浓度 (nmol/L)	实测浓度 (nmol/L)	回收率 (%)
25-(OH)D <sub>3</sub>	低	12.50	13.00 ± 1.30	109.92
	中	50.00	51.13 ± 5.98	102.25
	高	200.00	197.53 ± 12.78	98.76
3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	低	1.25	1.23 ± 0.18	97.75
	中	5.00	4.78 ± 0.70	95.25
	高	20.00	19.95 ± 1.00	99.80

表 5 早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的浓度分析 ( n=134,  $\bar{x} \pm s$ , nmol/L )

类 别	25-(OH)D <sub>3</sub>	3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub>	总 25-(OH)D <sub>3</sub>	3-epi-25-(OH)D <sub>3</sub> / 总 25-(OH)D <sub>3</sub> (%)
平均值	20.28 ± 12.55	5.68 ± 4.85	25.78 ± 15.55	21.94 ± 12.86
范围	2.33 ~ 70.88	0.00 ~ 24.73	2.33 ~ 90.85	0.00 ~ 60.62

表 6 早产儿 Vit D 水平的评估分析

Vit D 水平	25-(OH)D <sub>3</sub>			总 25-(OH)D <sub>3</sub>			$\chi$ 值	P 值
	数量	比例 ( % )	95%CI	数量	比例 ( % )	95% CI		
Vit D 缺乏	105	78.36	0.70 ~ 0.84	88	65.67	0.57 ~ 0.74	5.351	0.021
Vit D 不足	26	19.40	0.13 ~ 0.27	35	26.12	0.19 ~ 0.35	1.719	0.190
Vit D 充足	3	2.24	0.01 ~ 0.07	11	8.21	0.04 ~ 0.15	4.823	0.028

3 讨论

目前, 临床上应用串联质谱技术检测血清 Vit D 常采用 C18 色谱柱进行色谱分离, 然而 C18 色谱柱存在无法分离 25-(OH)D<sub>3</sub> 及其差向异构体 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的问题<sup>[10]</sup>。本研究采用五氟苯基丙基 ( pentafluorophenylpropyl, PFPP ) 色谱柱, 在流动相甲醇的梯度作用下, 8 min 内可对 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 进行充分分离, 从而达到准确检测血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度的目的。PFPP 色谱柱以五氟苯基丙基为键合基团, 提供了与 C18 固定相不同的结合方式, 苯环上的氟原子可增强键合相与分析物之间的  $\pi-\pi$  相互作用, 从

而提高对分析物的选择性和保留, 使 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 完全分离<sup>[11]</sup>。

本研究基于 UPLC-MS/MS 技术, 建立了准确定量检测血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的方法。该方法具有较广的线性范围和较低的定量限 ( 1.48 ± 0.20 ng/ml )。研究报道, 采用液液萃取法, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的定量限可达 3.50 nmol/L; 采用蛋白沉淀法可达 2.75 nmol/L; 采用固相萃取法可达 0.75 nmol/L<sup>[12]</sup>。本研究的定量限低于既往研究的液液萃取法与蛋白沉淀法, 略高于固相萃取法, 可能与近年来质谱仪灵敏度不断提高有关。精密密度与准确度方面, 其 RSD 与回收率均小于 15.00%, 完全

满足液相色谱串联质谱方法学验证的要求,具有良好的性能<sup>[7]</sup>;同时,该方法能完全分离 25-(OH)D<sub>3</sub>与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>,排除了 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>干扰,达到了准确定量的目的。

采用新建方法,本研究对 134 例早产儿血清 25-(OH)D<sub>3</sub>与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>进行检测,结果显示早产儿在未补充 25-(OH)D<sub>3</sub>的情况下,其浓度水平较低,仅为 22.35 ± 13.28 nmol/L, Vit D 缺乏率高达 78.36%,不足率 19.40%,而充足率仅 2.24%。原婷等<sup>[13]</sup>对大连市 158 例早产儿在出生后 24h 内采用化学发光法检测了 25-(OH)D<sub>3</sub>, 25-(OH)D<sub>3</sub>的平均浓度 43.00 ± 18.50 nmol/L, 66.50% 的早产儿存在 Vit D 缺乏 (< 50.00 nmol/L)。黄丽密等<sup>[14]</sup>对温州市 424 例早产儿出生后 2 周的 25-(OH)D<sub>3</sub>水平进行研究,发现 35.80% 的早产儿处于 Vit D 缺乏 (12.50 nmol/L ~ 37.50 nmol/L), 30.70% 的早产儿处于 Vit D 不足 (37.50 nmol/L ~ 50.00 nmol/L)。JUNG 等<sup>[15]</sup>对韩国早产儿在出生时检测了 Vit D,发现 25-(OH)D<sub>3</sub>的浓度为 45.50 ± 33.75 nmol/L, Vit D 缺乏率 82.80%。可见, Vit D 缺乏或不足在早产儿中非常普遍,然而各个实验室检测的 Vit D 平均浓度、Vit D 缺乏率与不足率却存在差异,这可能与纳入胎龄不同, Vit D 缺乏标准不一及是否补充 Vit D 制剂等因素有关。此外,不同实验室所采用的检测方法同样存在差异,或为免疫法,或为采用 C18 色谱柱的串联质谱法,而上述方法均不能排除 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>的干扰,从而导致研究结果产生差异。

本研究中的 130 例 (97.00%) 早产儿血清中均检测到了 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub>, 4 例未检测到,最高值 24.73 nmol/L,平均浓度 5.68 ± 4.85 nmol/L; 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 占总 25-(OH)D<sub>3</sub> 的比例为 21.94% ± 12.86%,最高可达 60.62%。OOMS 等<sup>[16]</sup>的研究发现,在出生时 91.50% 的早产儿体内均能检测到 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度水平较低,平均 3.00 nmol/L,浓度范围 1.00 nmol/L ~ 7.00 nmol/L,小于 10.00% 总 25-(OH)D<sub>3</sub>;在补充了 25-(OH)D<sub>3</sub>之后, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的占比增加为 15.00% ~ 55.00%。HANSON 等<sup>[5]</sup>的研究同样发现,新生儿出生时 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的平均浓度较低,为 3.25 nmol/L,仅占总 25-(OH)D<sub>3</sub> 的 7.21%;在出生后第四周,随着 25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度的增加, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的平均浓度升高至 38.75 ± 22.50 nmol/L,占比达到 41.70%。总的来说,新生儿期 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的血清浓度较低,但随着 25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度的增加, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的生成与占比均会增加,这可能与早产儿或新生儿在生命早期时肝脏未完全发育成熟有关。本研究中, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的浓度略高于上述两项研究,可能

与纳入早产儿的年龄较大, 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 随年龄逐渐增高有关。

在 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 影响下,本研究早产儿的 Vit D 缺乏率下降了 12.69%, Vit D 充足率升高了 6.21%,差异具有统计学意义,对 Vit D 的评估产生了误判。AGHAJAFARI 等<sup>[17]</sup>的研究发现,在排除 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 时, 80.00% 的新生儿 Vit D 存在不足 (< 75.00 nmol/L);而没有排除 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 时,新生儿 Vit D 的不足率显著下降至 73.00%。MYDTSKOV 等<sup>[18]</sup>同样发现在婴儿早期,如果不排除 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 的干扰,可导致对 8.00% 的婴儿 Vit D 评估产生错误 (< 75.00 nmol/L),从而引起误判。本研究结果与上述报道相似,由此可见,评估新生儿 Vit D 水平应当将 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 排除从而达到精准评估的目的。

综上所述,本研究基于 LC-MS/MS 技术建立了同时准确定量检测血清 25-(OH)D<sub>3</sub> 与 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 浓度的新方法,避免了既往方法存在差向异构体 3-epi-25-(OH)D<sub>3</sub> 对 25-(OH)D<sub>3</sub> 造成干扰的不足,达到了准确检测早产儿 Vit D 浓度的目的,对早产儿 Vit D 精准评估具有十分现实的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] MAILHOT G, WHITE J H. Vitamin D and immunity in infants and children[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1233.
- [2] 张成强, 陆澄秋, 钱蓓倩, 等. 早产儿脐血血清 25 羟维生素 D 与呼吸窘迫综合征的关联性研究 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2021, 29(5): 555-559.  
ZHANG Chengqiang, LU Chengqiu, QIAN Beiqian, et al. Association between serum 25 (OH) D level in cord blood and respiratory distress syndrome among preterm neonates [J]. *Chinese Journal of Child Health Care*, 2021, 29(5): 555-559.
- [3] HANSON C, JONES G, LYDEN E, et al. Vitamin D metabolism in the premature newborn: A randomized trial[J]. *Clinical Nutrition*, 2016, 35(4): 835-841.
- [4] AL-ZOHILY B, AL-MENHALI A, GARIBALLA S, et al. Epimers of vitamin D: A review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 470.
- [5] HENNING P, CONAWAY H H, LERNER U H. Stimulation of osteoclast formation and bone resorption by glucocorticoids: Synergistic interactions with the calcium regulating hormones parathyroid hormone and 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> [J]. *Vitamins and Hormones*, 2022, 120: 231-270.
- [6] BIKLE D D. Vitamin D assays[J]. *Frontiers of Hormone Research*, 2018, 50: 14-30.
- [7] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证 [J]. *检验医学*, 2019, 34(3): 189-196.  
Clinical Mass Spectrometry Committee, Chinese Medical Doctor Association of Laboratory Medicine. Consensus of method development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical laboratories [J]. *Laboratory Medicine*, 2019,

- 34(3): 189-196.
- [8] MUNNS C F, SHAW N, KIELY M, et al. Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2016, 101(2): 394-415.
- [9] 中华预防医学会儿童保健分会. 中国儿童维生素A、维生素D临床应用专家共识[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(1): 110-116.  
Society of Child Health, Chinese Preventive Medicine Association. The expert consensus of Vitamin A and Vitamin D application in Clinics [J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2021, 29(1): 110-116.
- [10] 卢山, 董辉苒, 任文华, 等. 自动化磁珠法标本制备联合液相色谱串联质谱检测人血清中 25-羟基维生素D的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(10):1234-1237, 1243.  
LU Shan, DONG Huiran, REN Wenhua, et al. Performance evaluation of automated magnetic bead-based specimen preparation combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of 25-hydroxyvitamin D in human serum [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2022, 43(10): 1234-1237, 1243.
- [11] WANG Danchen, YU Songlin, ZHANG Qi, et al. A robust method for simultaneous measurement of serum 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, and 24,25(OH)<sub>2</sub>D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with efficient separation of 3-epi analogs, 23R,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and 4β,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2022, 57(1): e4792.
- [12] KOWALÓWKA M, GŁÓWKA A K, KARAŻNIEWICZ-ŁADA M, et al. Clinical Significance of analysis of vitamin D status in various diseases [J]. Nutrients, 2020, 12(9):2788.
- [13] 原婷, 李宇丹, 孔琦, 等. 早产儿 25-羟基维生素D水平和围生期相关因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(15):3574-3577.  
YUAN Ting, LI Yudan, KONG Qi, et al. Analysis of 25-(OH)D level in premature and associated factors in perinatal period [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2021, 36(15): 3574-3577.
- [14] 黄丽密, 池美珠, 周恩敏, 等. 住院早产儿维生素D水平及相关因素分析[J]. 浙江医学, 2019, 41(7):683-685, 690.  
HUANG Limi, CHI Meizhu, ZHOU Enmin, et al. Serum vitamin D level and related factors in hospitalized preterm infants [J]. Zhejiang Medical Journal, 2019, 41(7): 683-685, 690.
- [15] JUNG J H, KIM E A, LEE S Y, et al. Vitamin D status and factors associated with vitamin D deficiency during the first year of Life in preterm infants[J]. Nutrients, 2021, 13(6): 2019.
- [16] OOMS N, VAN DAAL H, BEIJERS A M, et al. Time-course analysis of 3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> shows markedly elevated levels in early life, particularly from vitamin D supplementation in preterm infants[J]. Pediatric Research, 2016, 79(4): 647-653.
- [17] AGHAJAFARI F, FIELD C J, RABI D, et al. Plasma 3-epi-25-hydroxycholecalciferol can alter the assessment of vitamin D status using the current reference ranges for pregnant women and their newborns [J]. The Journal of Nutrition, 2016, 146(1): 70-75.
- [18] MYDTSKOV N D, LYKKEDEGN S, FRUEKILDE P B N, et al. S-25-hydroxyvitamin D and C3-epimers in pregnancy and infancy: An odense child cohort study[J]. Clinical biochemistry, 2017, 50(18): 988-996.  
收稿日期: 2022-11-29  
修回日期: 2023-02-15

(上接第133页)

- [18] BAE J, SAMUR M, RICHARDSON P, et al. Selective targeting of multiple myeloma by B cell maturation antigen (BCMA)-specific central memory CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes: immunotherapeutic application in vaccination and adoptive immunotherapy[J]. Leukemia, 2019, 33(9): 2208-2226.
- [19] DONG Yuhang, MA Tiejun, ZHANG Xiaoxiao, et al. Incorporation of CD40 ligand or granulocyte-macrophage colony stimulating factor into Hantaan virus (HTNV) virus-like particles significantly enhances the long-term immunity potency against HTNV infection[J]. Journal of Medical Microbiology, 2019, 68(3): 480-492.
- [20] SUN Mengyao, BAI Yang, ZHAO Song, et al. Gram-negative bacteria facilitate tumor progression through TLR4/IL-33 pathway in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(17): 13462-13473.
- [21] SKJESOL A, YURCHENKO M, BÖSL K, et al. The TLR4 adaptor TRAM controls the phagocytosis of Gram-negative bacteria by interacting with the Rab11-family interacting protein 2[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(3): e1007684.
- [22] 卢秋维, 廖美娟, 林雪珍. 5种炎症指标对革兰阴性菌和革兰阳性菌所致脓毒症的早期诊断及鉴别诊断价值比较[J]. 山东医药, 2019, 59(17):79-82.  
LU Qiuwei, LIAO Meijuan, LIN Xuezheng. Comparison of five inflammatory markers in early diagnosis and differential diagnosis of sepsis caused by Gram-negative and Gram-positive bacteria[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(17): 79-82.
- [23] 秦云. 肺炎患者血液PLT、PA/Fig和NGAL联合检测在不同类型病原菌感染鉴别及疗效评估中的价值[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(5): 83-89.  
QIN Yun. Value of combined detection of PLT, PA/Fig and NGAL in the blood of patients with pneumonia in the identification of different types of pathogenic infections and the evaluation of therapeutic effects[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(5): 83-89.  
收稿日期: 2022-06-14  
修回日期: 2022-01-06