

# 基于同位素稀释液相色谱串联质谱技术检测血清 25 (OH) D3 的候选参考测量程序的建立及性能评价

李 敏<sup>1</sup>, 于洪远<sup>1</sup>, 李会强<sup>2</sup> (1. 北京航天总医院检验科, 北京 100076; 2. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203)

**摘要:** **目的** 建立基于同位素稀释液相色谱串联质谱技术 (liquid phase chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 的血清 25 羟维生素 D3 [25-hydroxy vitamin D3, 25(OH)D3] 的候选参考测量程序。**方法** 采用同位素标准溶液为内标, 液液萃取进行前处理, 正离子电喷雾模式进行监测。参照美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) C62-A 和 EP15-A3 等文件, 对方法的正确度、精密度、线性范围、定量限、检测下限、相对基质效应等进行验证。采用候选参考测量程序和质谱常规程序检测 40 份临床血清样本, 评价两种方法的一致性。**结果** 候选方法的分析时间为 15 min, 通过色谱的等度洗脱可有效分离同分异构体 3- $\text{epi}$ -25 (OH) D3, 特异性好。测定参考实验室室间比对 (RELA) 样本, 偏倚低于 1.5%。批内精密度和批间精密度分别为 0.75%~2.31% 和 1.28%~2.01%。定量限和检测下限分别为 0.85 ng/ml 和 1.84 ng/ml。在 2.5~220 ng/ml 浓度范围内线性良好。无相对基质效应和携带污染。质谱常规程序与候选参考程序的相关性较好 ( $r=0.982$ ), 但低浓度样本处的偏差超出卫健委临检中心室间质评的允许总误差  $\pm 25\%$ 。**结论** 成功建立了基于 LC-MS/MS 技术的血清 25 (OH) D3 的候选参考测量程序, 分析性能符合要求, 可用于临床常规方法的量值溯源。

**关键词:** 25 羟维生素 D3; 候选参考测量程序; 性能评价

中图分类号: R446.112; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 01-136-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.01.025

## Establishment and Performance Evaluation of Candidate Reference Measurement Procedures for the Detection of Serum 25 (OH) D3 Based on Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LI Min<sup>1</sup>, YU Hongyuan<sup>1</sup>, LI Huiqiang<sup>2</sup> (1. Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China; 2. School of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**Abstract: Objective** To establish a candidate reference measurement procedure for the detection of serum 25-hydroxy vitamin D3 [25 (OH)D3] based on isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Isotope standard solution was used as internal standard, liquid-liquid extraction was used for pre-treatment, and positive ion electrospray ionization mode was used for monitoring. The accuracy, precision, linear range, limit of quantitation, detection limit and relative matrix effect of method were verified based on documents of the America Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) such as C62-A and EP15-A3. Candidate reference measurement procedure and mass spectrometry routine procedure were used to detect 40 clinical serum samples, and to evaluate the consistency of the two methods. **Results** The analysis time of the candidate method was 15 min. Isometric elution of chromatography was used to effectively separate the isomer 3- $\text{epi}$ -25(OH)D3, with good specificity. RELA comparison sample was measured, with a bias of less than 1.5%. The intra-batch precision and inter-batch precision ranged from 0.75% to 2.31% and 1.28% to 2.01%, respectively. The limits of quantification and detection were 0.85 ng/ml and 1.84 ng/ml. It had good linearity in the concentration range of 2.5~220 ng/ml, and there was no relative matrix effect and carrier contamination. The correlation between the mass spectrometry routine procedure and candidate reference procedure was good ( $r=0.982$ ), while the deviation at low concentration samples exceeded the allowable total error  $\pm 25\%$  in the external quality assessment of the National Center for Clinical Laboratories. **Conclusion** A candidate reference measurement procedure for serum 25(OH)D3 technology based on LC-MS/MS was successfully established, and the analytical performance met the requirements, which could be used for quantitative traceability by clinical conventional methods.

**Keywords:** 25-hydroxyvitamin D3; candidate reference measurement procedures; performance evaluation

维生素 D (vitamin D, VD) 属于类固醇激素, 在血液循环中的主要形式为 25 羟维生素 D [25

作者简介: 李敏 (1991-), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 临床生化检验标准化, E-mail: 1140368364@qq.com。

通讯作者: 李会强, 男, 博士生导师, E-mail: lihuiqiang1965@163.com。

hydroxyvitamin D, 25(OH)D]。目前检测方法包括酶联免疫法、放射免疫法、液相色谱法及液相色谱串联质谱法 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 等<sup>[1]</sup>。LC-MS/MS 法检测人血清 25(OH)D 特异度高、抗干扰能力强, 被公认为是检测 25(OH)D 的金标准<sup>[2]</sup>。国家卫生健康委员会临床检验中心开展的 25(OH)D 室间质评结果显示, 采用 LC-MS/MS 法的实验室间检测结果仍存在较大差异。因此, 想要实现血清 25(OH)D 检测的标准化就必须建立并完善参考方法。目前, 检验医学溯源联合委员会 (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM) 认可的 25(OH)D 参考方法有 3 种, 分别为美国国家标准和技术研究院 (National Institute of Standards and Technology, NIST)、美国疾病预防控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)、比利时根特大学 (Ghent University) 建立的基于 LC-MS/MS 的参考方法, 但 3 种参考方法存在样本需求量大、色谱分离过程复杂、标准曲线需依据样本预估浓度分别配制等问题, 不便于临床实验室操作, 故本研究拟在此基础上建立 25(OH)D<sub>3</sub> 的候选参考测量程序, 为临床检测结果的可比性和准确性提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集北京航天总医院 2023 年 7 月住院患者检测剩余 40 份血清作为比对标本。

纳入标准: 无慢性肝、肾、心等严重疾病, 近期无感染性疾病史, 近期无发热史。所有标本均无溶血、乳糜和黄疸。所有研究对象的监护人对检测均知情同意, 该研究已通过北京航天总医院伦理委员会审查批准。

1.2 仪器与试剂 WatersTQD 串联 ACQUITYUPLC 液相色谱质谱联用仪 (美国 Waters 公司); Agela 氮吹仪, XSE205DU 十万分之一分析天平 (德国梅特勒托利多公司); Eppendorf 移液器, 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); MilliQ 超纯水机。Ascentis Express F5 色谱柱 (2.1mm × 150 mm, 2.7 μm, 美国 Supelco 公司)。25(OH)D<sub>3</sub> 标准品 (美国 Sigma 公司), 内标品 25(OH)D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> (Cambridge Isotope Laboratories 公司), 甲醇、正己烷、无水乙醇 (美国 ThermoFisher 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 色谱和质谱条件: 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, 采用等度模式 (73% 的甲醇水) 洗脱 15min, 流速为 0.3ml/min, 柱温 40℃, 进样体积 10 μl。采用电喷雾电离源正离子和多反应监测模式分析。离子源温度

150℃, 雾化气温度 400℃, 去簇电压 24V, 碰撞能量 10V。25(OH)D<sub>3</sub> 的定量离子对为 401.3/365.3, 25(OH)D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> 的定量离子对为 404.3/368.2。

1.3.2 标准品和内标的配制: 采用称重法分别制备出 10 μg/ml 的 25(OH)D<sub>3</sub> 储备液和内标储备液, 用无水乙醇将储备液进行稀释, 得到 250ng/ml 的 25(OH)D<sub>3</sub> 工作液和 30ng/ml 内标工作液。采用五点包括法绘制标准曲线, 25(OH)D<sub>3</sub> 与内标的质量比分别为 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5。

1.3.3 样本前处理: 采用临床常规质谱方法测得血清样本中 25(OH)D<sub>3</sub> 的大致浓度, 精确称取血清样本 0.25~1g, 加入纯水 1ml。加入内标工作液使血清中 25(OH)D<sub>3</sub> 和内标含量比值接近 1, 涡旋混匀 10min 后室温下平衡 1h。加入 0.1g/ml 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 0.1ml, 通过极端 pH 值变化使结合蛋白释放 25(OH)D 代谢物。加入 2.5ml 正己烷溶液进行萃取, 离心后取上清液, 氮气吹干。为增加提取效率, 重复液液萃取过程。加入 200 μl 73ml/dl 甲醇复溶, 涡旋混匀后再次离心取 150 μl 上清液上机检测。

## 1.3.4 方法学评价

1.3.4.1 正确度: 采用测定国际临床化学和检验医学联合会参考实验室室外质量评价计划样本 (the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine External Quality Assessment Scheme for Reference Laboratories in Laboratory Medicine, RELA) 对方法的正确度进行评价。采用本研究建立的方法测定 2022 RELA 比对样本, 每个样本测定 3 个批次, 每个批次每个浓度预处理 3 次, 重复测定 5 次。

1.3.4.2 精密度: 依据美国临床实验室标准化协会 (the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) EP15-A3 文件<sup>[3]</sup>, 对低、中、高三个不同浓度的混合血清样本进行检测, 每个批次每个浓度样本分 5 次进行处理, 连续测定 3 个批次, 分别评估每个浓度样本的批内精密度及总精密度。

1.3.4.3 基质效应: 采用混合实验的方法评估相对基质效应。选择血清基质样本、血清和溶液 80:20 混合物、血清和溶液 1:1 混合物、血清和溶液 20:80 混合物、溶液基质样本这 5 种基质样本中待测物与内标的峰面积比值来计算相对基质效应。若混合物中待测物与内标峰面积比值与理论比值的偏差 ≤ ±20%, 则视为无相对基质效应。

1.3.4.4 检测限及定量限: 以平均信噪比 (signal-to-noise ratio, S/N) = 3 时的浓度作为检测限。用生理盐水对已知浓度的血清样本 (18.42ng/ml) 进行稀释, 制备出包括预期定量限浓度在内的 3 个浓度梯度的稀释样本, 每个浓度的样本分为 5 份进行处

理,每份样本重复测定3次,分别评估每个浓度样本的变异系数(coefficient of variation,  $CV$ )及其浓度测定均值与理论值的偏差。将 $CV < 10\%$ 且偏移 $< 10\%$ 的浓度值作为定量下限。

1.3.4.5 携带污染:重复进样定量下限浓度附近的样本,交替进样高浓度和低浓度样本,比较第一次进样的低浓度样本的结果和后续进样的低浓度样本结果的差异。若差异低于20%,可认为该方法不存在明显的携带污染。

1.3.4.6 线性范围:参考美国临床实验室标准化研究所的EP-6A文件,制备一份低浓度样本(L,浓度为2.5ng/ml)和一份高浓度样本(H,浓度为220ng/ml),其中高浓度样本通过添加储备液获得。按L, 0.8L+0.2H, 0.6L+0.4H, 0.4L+0.6H, 0.2L+0.8H, H的比例配制6个浓度标本,将稀释后样本进行前处理后重复测定2次,所有数据进行拟合多项式回归分析。若 $r \geq 0.995$ 且各浓度点理论值和实测值之间的偏差 $< 15\%$ ,则认为本方法在2.5~220ng/ml范围内线性良好。

1.3.4.7 不确定度:依据不确定度评估指南,不确定度包括A类和B类不确定度。其中A类主要为重复测量引入的分量,B类包括标准物质的纯度、标准物质称量等引入的分量。将各分量计算合成不确定度,扩展因子为2,计算扩展不确定度。

1.3.4.8 方法学比对:采用候选参考测量程序和常规质谱方法测定40份新鲜冰冻人血清标本中的25(OH)D3,浓度范围为2.6~71.6ng/ml,选取最佳拟合模型,计算回归方程及各项参数并进行偏差分析。

1.4 统计学分析 采用MedCalc统计学软件和Microsoft Excel2003进行统计分析,采用Passing-Bablok线性回归分析、Bland-Altman一致性分析方法对方法比对结果进行分析。

## 2 结果

2.1 正确度 见表1。2022年RELA样本的测量偏倚均小于1.5%。

表1 2022年RELA样本的测量结果

样本	测量均值 (ng/ml)	参考值 (ng/ml)	偏倚 (%)
2022RELA-A	22.25	22.00	1.10
2022RELA-B	40.82	40.49	0.81

2.2 精密度 见表2。采用该方法检测混合血清中25(OH)D3浓度,批内和批间 $CV$ 均小于2.5%。

2.3 基质效应 血清和溶液80:20混合物、血清和溶液1:1混合物、血清和溶液20:80混合物这三种样本的平均峰面积比分别为3.39, 2.75, 2.09,计算得到相对基质效应分别为3.53%, 3.48%,

2.02%。

2.4 检测限和定量下限 见表3。该方法的检测限和定量下限分别为0.85ng/ml和1.84ng/ml。

表2 25(OH)D3的批内和批间精密度评价结果

样本	批次	均值 (ng/ml)	批内 $CV$ (%)	总均值 (ng/ml)	批间 $CV$ (%)
混合血清1	1	10.73	2.13	10.68	2.01
	2	10.69	2.08		
	3	10.63	2.31		
混合血清2	1	19.59	1.19	19.44	1.62
	2	19.40	2.07		
	3	19.33	1.79		
混合血清3	1	37.52	1.24	37.33	1.28
	2	37.06	1.80		
	3	37.41	0.75		

表3 25(OH)D3定量下限结果( $n=15$ )

样本号	理论浓度 (ng/ml)	测定均值 (ng/ml)	$CV$ (%)	偏移 (%)
1	0.92	1.06	12.38	15.22
2	1.84	2.01	8.95	9.24
3	2.76	2.92	6.59	5.80

2.5 携带污染 通过多次高值和低值样本重复进样,计算出携带污染率为-2.85%,可认为不存在明显的携带污染。

2.6 线性范围 采用最小二乘法进行线性拟合,拟合曲线的方程为 $Y=0.994X+0.471(r=0.999)$ ,各浓度点实测值与理论值的偏倚均小于10%,可认为本方法在2.5~220ng/ml范围内线性良好。

2.7 不确定度 见表4。从样本重复测量、标准品纯度、标准品配制等方面评估2022RELA样本的测量不确定度。

表4 25(OH)D3测量不确定度评定

样本	测定均值 (ng/ml)	扩展不确定度 (ng/ml)	相对扩展不确定度 (%)
2022RELA-A	22.25	0.65	2.9
2022RELA-B	40.82	0.89	2.2

2.8 方法学比对 以候选参考测量程序的测定结果为 $X$ 轴,质谱常规程序的测定结果为 $Y$ 轴,对两种方法进行Passing-Bablok回归分析,线性回归方程为 $Y=1.025X-0.349$ ,斜率的95%可信区间为0.955~1.081,截距的95%可信区间为-1.198~0.373,相关系数 $r=0.982$ 。两种方法检测结果的平均偏差为1.3%。低浓度区偏差较大,有3例样本偏差超出卫生健康委员会临检中心室内质评规定的允许总误差 $\pm 25\%$ ,随着样本浓度上升,



偏差降低,具体见图1。

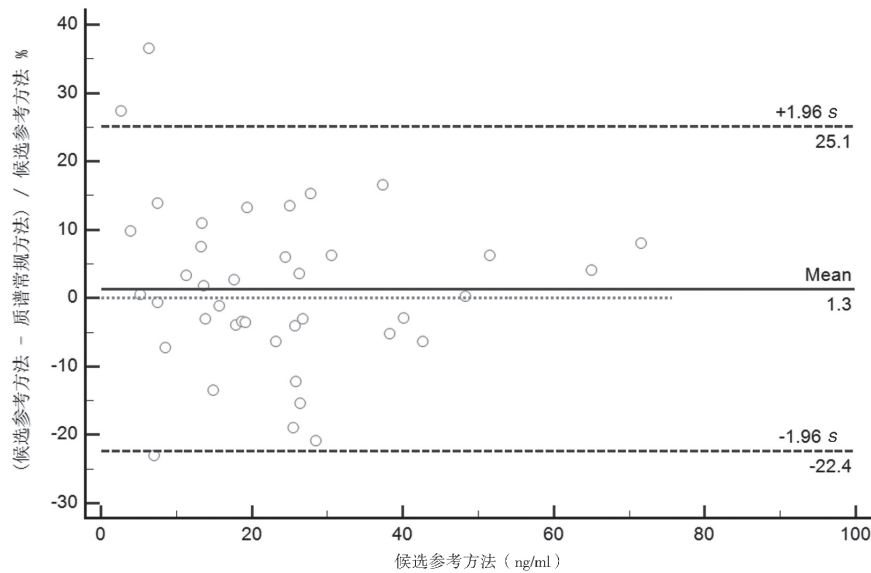


图1 质谱常规方法和候选参考方法血清25(OH)D3检测结果的Bland-Altman图

### 3 讨论

目前,VD不仅在骨骼方面,在糖尿病、心血管、肿瘤等方面都受到重视<sup>[4]</sup>,因此VD检测需求也呈不断增长趋势。随着技术的发展,LC-MS/MS法被广泛应用于生物样本中VD的检测。尽管其有灵敏度高、特异度好等优势,但LC-MS/MS法大多为实验室自建方法,由于仪器、色谱柱、试剂、校准物等因素的影响,不同实验室间检测结果可比性差。标准化是确保在不同实验室、不同仪器及时间内,获得一致性结果的必要条件<sup>[5]</sup>。

同位素稀释质谱法是国际公认的一级测量原理<sup>[6]</sup>,有灵敏度高,测量值能溯源至国际单位制物质质量的基本单位摩尔等优点,在参考体系的建设和有着广泛的应用。JCTLM数据库中已有3种25(OH)D3的参考测量程序,其中美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)的方法<sup>[7]</sup>所需样本量较大,每次需称取样本量2g左右,萃取过程中正己烷-乙酸乙酯的体积约8ml。比利时根特大学<sup>[8]</sup>的方法采用二维色谱的模式,待测物提取后先经Sephadex LH-20分离,随后依次经过C4和Zorbax SB-CN色谱柱,整体分离过程较复杂。美国CDC方法<sup>[9]</sup>所需样本量适中,其校准曲线的配制取决于待测物中25(OH)D3的浓度,若25(OH)D3浓度 $\leq 75\text{nmol/L}$ ,则校准曲线质量比范围在0.25~1.25之间。若25(OH)D3浓度 $>75\text{nmol/L}$ ,质量比范围在0.5~2.5之间。

本研究在满足正确度及精密度等要求的前提下,对样本前处理及校准曲线配制等各方面进行了优化。首先样本的加样量控制在0.25~1g之间,其次校准采用经典的五点包括法,通过在测量体系中

加入不同体积的样本,使待测物和内标的质量比控制在0.5~1.5之间<sup>[10]</sup>,以标准与内标的峰面积比值为纵坐标,标准与内标的质量比为横坐标,用最小二乘法进行拟合。本文前处理采用重复液液萃取的方式。美国CDC的研究显示,支持性液体萃取虽然可以缩短前处理时间,但需要较高的试剂成本和更大体积的有机溶剂。张丽等<sup>[11]</sup>研究采用蛋白质沉淀结合液液萃取制备样品,用于替代重复使用液液萃取,即一次性加入1ml 0.1mol/L的硫酸锌甲醇水溶液和8ml的正己烷,充分振荡混匀30min后离心取上清液。尽管该方法在操作步骤上有所精简,但后续振荡混匀的时间延长,总体的样本处理时间并没有减少。25(OH)D3的定量易受到同分异构体3-epi-25(OH)D3的干扰,两者结构上仅有一个羟基空间方向上的差异。虽然3-epi-25(OH)D3主要存在于儿童体内,成人含量较低,但若无法区分,假性增高的结果会误导临床对维生素D缺乏的患者进行正确的诊断<sup>[12]</sup>。液相条件采用等度洗脱15min的模式,可有效分离25(OH)D3的同分异构体3-epi-25(OH)D3。有研究表明<sup>[13-14]</sup>,五氟苯基丙基色谱柱以五氟苯基丙基为键合基团,苯环上的氟原子可增强键合相与分析物之间的相互作用,在流动相甲醇的梯度作用下,8min内实现25(OH)D3与3-epi-25(OH)D3的分离。本文未对此进行验证,将在后续实验中进行补充研究。

采用候选参考测量程序和质谱常规程序检测40份血清标本,两者结果的相关性较好( $r=0.982$ ),但低浓度样本检测结果的偏差较大。可能是由于常规方法采用经典的校准曲线,检测所有样本的内标浓度均不变,高浓度样本区分分析物和内标的峰面积

为低浓度区的几十倍,影响结果的准确性。参考程序采用五点包括法进行校准,可有效避免该问题。不同实验室内 LC-MS/MS 检测结果存在较大偏差。若要实现标准化,需从试剂、校准品等多方面进行规范,才能获得高质量并具有临床价值的检验结果。

综上所述,本研究建立的血清 25(OH)D<sub>3</sub> 候选参考测量程序,满足参考测量程序的性能要求,可用于 25(OH)D<sub>3</sub> 的量值溯源和标准化,在后续临床 25(OH)D<sub>3</sub> 检测质量改善中发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] 禹松林, 韩建华, 张江涛, 等. 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法快速测定血清 25-羟维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟维生素 D<sub>3</sub> 临床方法的建立 [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(8): 617-622.  
YU Songlin, HAN Jianhua, ZHANG Jiangtao, et al. Establishment of clinical methods for rapid determination of serum 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2014, 37(8): 617-622.
- [2] 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]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2013(14): 6535-6537.  
CHENG Yating, DONG Heng, LIANG Xiaocui, et al. Comparison of two human serum 25-hydroxyvitamin D testing methods[J]. Chinese Journal of Clinicians(Electronic Edition), 2013(14): 6535-6537.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias; Approved Guideline-Third Edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP15-A3, 2014.
- [4] 禹松林, 方慧玲, 张瑞苹, 等. 改良超高效液相色谱串联质谱法测定 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>[J]. 检验医学, 2015, 30(10): 1021-1026.  
YU Songlin, FANG Huiling, ZHANG Ruiping, et al. Improved method for the determination of serum 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Laboratory Medicine, 2015, 30(10): 1021-1026.
- [5] 中国老年保健医学研究会检验医学分会, 中国老年医学学会检验医学分会, 丛玉隆, 等. 液相色谱-串联质谱法检测 25-羟维生素 D 标准化专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(7): 587-595.  
Chinese Association of Geriatric Research of Laboratory Medicine, Chinese Geriatrics Society of Laboratory Medicine, CONG Yulong, et al. Expert consensus on the standardization of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the measurement of 25-hydroxyvitamin D[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2021, 44(7): 587-595.
- [6] 虞科颖, 孙贺伟, 金中淦, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清 17 $\alpha$ -羟孕酮候选参考测量程序的研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(5): 449-455.  
YU Keying, SUN Hewei, JIN Zhonggan, et al. Analytical performance of a candidate reference measurement procedure for serum 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone based on liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2022, 45(5): 449-455.
- [7] TAI S S, BEDNER M, PHINNEY K W. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(5): 1942-1948.
- [8] STEPMAN H C, VANDERROOST A, VAN UYTFANGHE K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Clinical Chemistry, 2011, 57(3): 441-448.
- [9] MINEVA E M, SCHLEICHER R L, CHAUDHARY-WE B B M, et al. A candidate reference measurement procedure for quantifying serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(19): 5615-5624.
- [10] 欧阳芬, 张乔轩, 严君, 等. 血清孕酮同位素稀释液相色谱串联质谱候选参考方法的性能评价及临床应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(5): 456-462.  
OUYANG Fen, ZHANG Qiaoxuan, YAN Jun, et al. Performance evaluation of serum progesterone measurement by ID-LC/MS/MS candidate reference methods and their clinical application value[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2022, 45(5): 456-462.
- [11] ZHANG Li, LONG Qichen, ZHANG Jiangtao, et al. A candidate reference method and multiple commutable control materials for serum 25-hydroxyvitamin D measurement[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2022, 36(12): e24756.
- [12] 周琰, 潘柏申. 维生素 D 检测标准化进程 [J]. 检验医学, 2016, 31(1): 71-75.  
ZHOU Yan, PAN Baishen. Progress of vitamin D assay standardization[J]. Laboratory Medicine, 2016(1): 71-75.
- [13] 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 4 $\beta$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2022, 57(1), e4792.
- [14] 刘浩, 彭勇, 尹一帆, 等. 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> 检测新方法及其初步应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 170-175.  
LIU Hao, PENG Yong, YIN Yifan, et al. 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[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 170-175.

收稿日期: 2023-10-08

修回日期: 2023-11-13