

LCMS检测维生素的室内质控血清制备及可行性研究

闻平*, 李翌宇, 荀丽华, 白文燕, 郑应曼

苏州豪思医学检验实验室, 江苏 苏州

收稿日期: 2022年1月11日; 录用日期: 2022年2月18日; 发布日期: 2022年2月28日

摘要

目的: 研制稳定的维生素质控血清, 用于实验室内部维生素检测的质量控制。方法: 准确称取一定量的维生素A、25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃、维生素E和维生素K₁溶于适量的二甲基亚砜中成为母液, 适量添加至基质血清中, 形成高、低质控血清。分装成1 ml/支, 分别贮存在4℃、-20℃和-80℃环境中, 以观察其在不同贮存条件下的稳定性和均一性。结果: 4℃保存的质控血清, 从第4天起维生素K₁值迅速下降, 其他维生素(A、D₂、D₃和E)在一周后检测值也明显下降, -20℃和-80℃保存的质控血清中几种维生素的检测值都均可稳定1年以上; 均一性检测表明样品间无显著性差异(F值 < F_{0.05}), 均一性良好。结论: 本研究制备的质控血清具有良好的均一性和稳定性, 可用于实验室内部维生素检测的质量控制。

关键词

维生素, 质控血清, 稳定性, 均一性, 可行性, LCMS

Preparation and Feasibility Study of Internal Quality Control Serum for Vitamins Detection in LCMS

Ping Wen*, Zhaoyu Li, Lihua Xun, Wenyan Bai, Yingman Zheng

Suzhou Haosi Medical Laboratories, Suzhou Jiangsu

Received: Jan. 11th, 2022; accepted: Feb. 18th, 2022; published: Feb. 28th, 2022

Abstract

Objective: To develop the stable vitamin quality control serum for the quality control of vita-

*通讯作者。

文章引用: 闻平, 李翌宇, 荀丽华, 白文燕, 郑应曼. LCMS 检测维生素的室内质控血清制备及可行性研究[J]. 生物医学, 2022, 12(2): 66-72. DOI: 10.12677/hjbm.2022.122008

min testing in the laboratory. Methods: A certain amount of vitamin A, 25-hydroxyvitamin D₂, 25-hydroxyvitamin D₃, vitamin E and vitamin K₁ was dissolved in the appropriate dimethyl sulfoxide to form mother liquor and added to the matrix serum into high- and low-quality control serum. Repacked into 1 ml/bottle and stored in 4°C, -20°C, and -80°C environments to observe their stability and uniformity under different storage conditions. **Results:** In 4°C environments, concentration of vitamin K₁ in the quality control serum was decreased rapidly from day 4, and other vitamins (A, D₂, D₃ and E) did so after a week. The detection values of several vitamins in the quality control serum in -20°C and -80°C were stable for more than 1 year; uniformity tests showed no significant difference between samples (F value < F 0.05), the results showed good uniformity. **Conclusion:** The quality control serum prepared in this study has good uniformity and stability, and can be used for the quality control of internal laboratory vitamin testing.

Keywords

Vitamin, Quality Control Serum, Stability, Uniformity, Feasibility, LCMS

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

维生素分为脂溶性的维生素 A、D、E、K 和水溶性的维生素 B 族、维生素 C，是人体生长和发育所必需的重要活性物质。维生素的检测方法有多种，主要有免疫法、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)等。商品化的试剂有维生素 D、B₆、B₉ 及 B₁₂ 的免疫检测法，但此类方法无法区分亚型，比如维生素 D₂ 及 D₃ 等，因而经常会出现假阳性或假阴性结果。质谱技术以其快速、高分辨率、高灵敏度、高特异性等优点成为生物样本内小分子分析的金标准方法，广泛应用于临床研究及诊断[1] [2] [3] [4] [5]。

维生素由于缺少国际或国家标准品，其日常质量监控大多使用试剂生产厂家提供的、相互间不能通用的、范围很粗的质控品。因此构建实验室内部的维生素质控品，建立维生素检测的室内质控制度是临床实验室的重要任务之一。本实验以新鲜混合血清为基质，研制了稳定的维生素质控品，用于实验室内部维生素检测的质量控制，以保证维生素检测结果的可靠性。

2. 材料与方法

2.1. 材料

标准物质：视黄醇乙酸酯(维生素 A，货号 R3250)、25-羟基维生素 D₂ (货号 17937)、25-羟基维生素 D₃ (货号 H4014)、D- α -生育酚琥珀酸酯(维生素 E，货号 95255)和维生素 K₁ (货号 V3501)，溶剂二甲基亚砜(货号 D2650)均购自 Sigma-Aldrich。

试剂：脂溶性维生素 LCMS 检测试剂盒购自江苏豪思生物科技有限公司(批号 20210112)。色谱柱为 Waters Symmetry C18 3.5 μ m, 2.1 \times 100 mm (Part No. WAT058965)。

仪器：检测系统为岛津 HPLC 串联 SCIEX Triple Quad™ 4500 MD 质谱仪；XPR 电子分析天平(称量精度为 0.01 mg, Mettler-Toledo GmbH 生产)；KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；海尔 DW-86L388J 医用低温保存箱，海尔 HYCD-290 医用冷藏冷冻箱。

基质血清：混合血清来自健康体检者，入选标准为肝、肾功能正常，HBV、HCV、HIV 和梅毒血清

标志物阴性。

2.2. 方法

2.2.1. 质控血清的制备

以 XPR 电子分析天平准确称取一定量的维生素 A、25-羟基维生素 D₂、25-羟基维生素 D₃、维生素 E 和维生素 K₁ 溶于适量的二甲基亚砷中成为母液。

严格按照试剂盒说明书和仪器操作 SOP 操作，检测混合血清的维生素 A、D、E 和 K₁ 的基础值。根据基础值的高低加入适量母液至各理论检测测量值为参考范围中位数，此为正常值质控血清；高值质控血清的理论组约为正常值质控血清的 3 倍。加入母液的血清加入终浓度为 500 mg/L NaN₃ 防腐剂后置 4℃ 避光超声混匀 30 分钟。混匀后的血清避光分装(1 ml/支)至棕色血清保存管中，分别置 4℃、-20℃ 和 -80℃ 保存备用。

2.2.2. 质控血清稳定性测试

将分装好的质控血清分别贮存在 4℃、-20℃ 和 -80℃ 环境中，每次取出 1 支以岛津 HPLC 串联 SCIEX Triple Quad™ 4500 MD 质谱仪和江苏豪思生物科技有限公司产脂溶性维生素 LCMS 检测试剂盒组成的分析系统连续监测，以观察其在不同贮存条件下的稳定性。

2.2.3. 质控血清均一性测试

在冻存的高、低值质控血清中各随机抽取 10 支，每支重复检测 3 次脂溶性维生素 A、D₂、D₃、E 和 K₁，取其均值，参照 CNAS-GL003-2018 [6] 附录 A.1 中的计算方法，用单因子方差分析法判断各管间浓度差异。

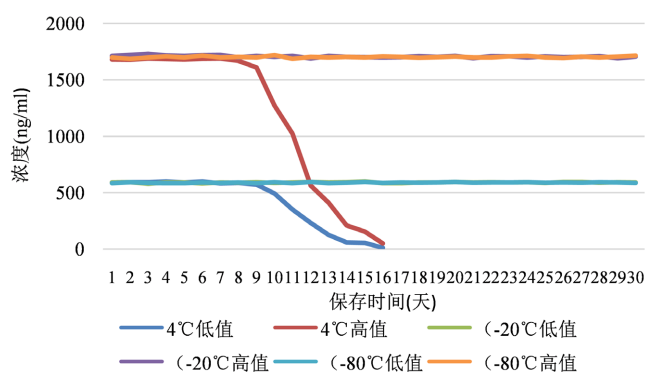
2.3. 统计学处理

所有数据均使用 SPSS 22.0 软件进行统计计算，行 F 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

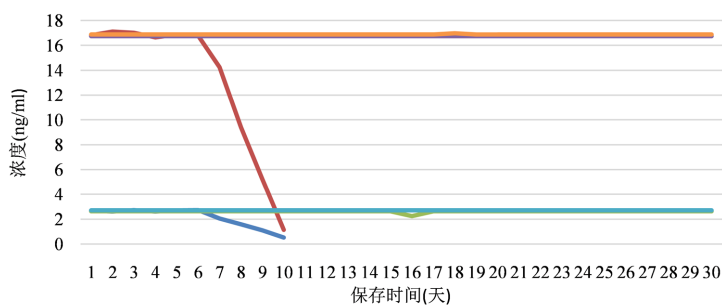
3. 结果

3.1. 质控血清的稳定性

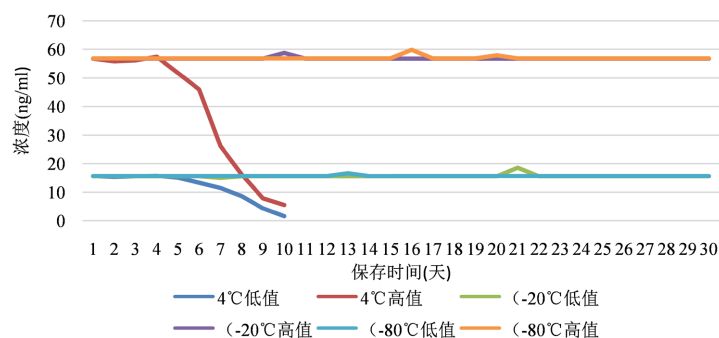
每天取 1 套 4℃、-20℃ 和 -80℃ 保存的质控血清，与日常标本平行检测，结果显示质控血清 4℃ 保存从第 4 天起维生素 K₁ 值迅速下降(图 1)，其他维生素(A、D₂、D₃ 和 E)一周后检测值也明显下降，提示 4℃ 不是本质控血清的适宜保存温度，-20℃ 和 -80℃ 保存的质控血清几种维生素的检测值都相对稳定(图 1)；我们的初步应用结果显示 -20℃ 和 -80℃ 保存均可稳定 1 年以上。故可根据实验室条件选择适宜保存温度。



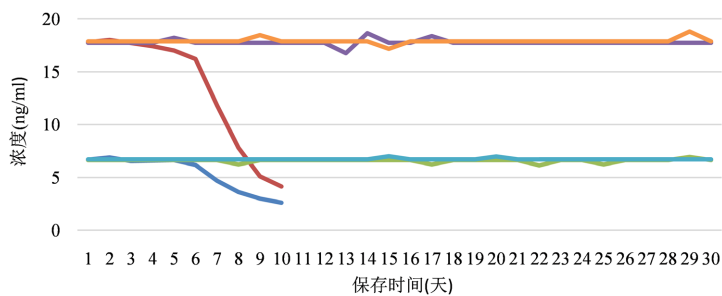
(a) 维生素 A 的稳定性



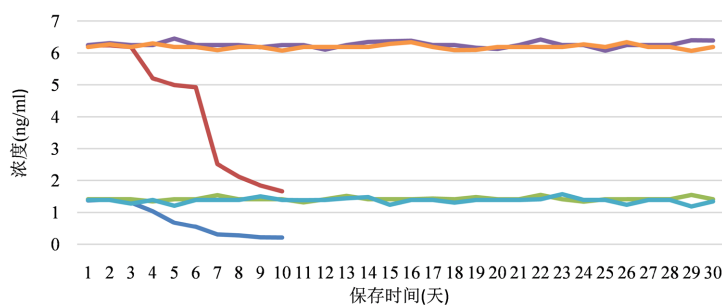
(b) 维生素 D₂ 的稳定性



(c) 维生素 D₃ 的稳定性



(d) 维生素 E 的稳定性



(e) 维生素 K₁ 的稳定性

Figure 1. Stability of various components in quality control serum. (a): Vitamin A; (b) Vitamin D₂; (c) Vitamin D₃; (d) Vitamin E; (e) Vitamin K₁

图 1. 质控血清中各种成分的稳定性。(a) 维生素 A; (b) 维生素 D₂; (c) 维生素 D₃; (d) 维生素 E; (e) 维生素 K₁

3.2. 质控血清的均一性

将在制备当日 4℃、-20℃和-80℃冻存后的高、低值质控血清中各随机抽取 10 支，做三次平行检测后取其平均值。经单因子方差分析，计算其值，对应 $F_{0.05}(9,10) = 3.02$ ， F 值 $< F_{0.05}$ 表明样品间无显著性差异，均一性良好(表 1~3)。

Table 1. Homogeneity results of quality-controlled serum on the preparation day

表 1. 质控血清制备当日的均一性结果

	维生素 A		维生素 D ₂		维生素 D ₃		维生素 E		维生素 K ₁	
	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值
1	581	1681	2.94	17.01	16.25	56.94	6.39	17.49	1.59	6.27
2	584	1685	2.98	17.11	16.34	56.92	6.45	17.29	1.62	6.23
3	579	1678	2.87	16.93	16.28	55.97	6.32	17.31	1.64	6.41
4	578	1681	2.91	17.02	16.31	56.37	6.45	17.54	1.59	6.31
5	589	1681	3.01	16.89	16.31	56.24	6.51	17.19	1.57	6.37
6	583	1675	2.86	16.83	16.34	57.12	6.31	17.34	1.66	6.29
7	576	1674	2.99	16.83	16.25	56.49	6.44	17.52	1.71	6.31
8	581	1687	2.84	16.97	16.45	57.01	6.39	17.38	1.65	6.29
9	583	1682	2.96	17.05	16.41	56.89	6.51	17.46	1.58	6.28
10	584	1684	2.95	16.89	16.32	55.89	6.48	17.51	1.59	6.27
F	2.31	1.65	2.08	1.34	1.87	1.29	2.09	1.98	2.51	2.19

注: $F_{0.05}(9,10) = 3.02$ ， $F < F_{0.05}$ 样品间无显著性差异，均一性良好。

Table 2. Homogeneity results of quality-controlled serum after preserved in -20℃

表 2. 质控血清-20℃保存后的均一性结果

	维生素 A		维生素 D ₂		维生素 D ₃		维生素 E		维生素 K ₁	
	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值
1	580	1684	3.04	17.06	16.21	56.99	6.37	17.53	1.57	6.31
2	587	1687	2.98	17.01	16.33	56.92	6.32	17.58	1.70	6.28
3	579	1682	2.97	17.11	16.58	57.16	6.19	17.27	1.61	6.38
4	587	1676	2.84	16.95	16.31	56.98	6.47	17.43	1.62	6.37
5	582	1676	2.91	17.09	16.39	55.29	6.29	17.23	1.59	6.29
6	585	1686	2.96	16.89	16.34	56.73	6.60	17.37	1.66	6.42
7	582	1679	2.99	17.13	16.15	56.46	6.52	17.62	1.51	6.34
8	578	1684	2.89	16.97	16.41	57.11	6.38	17.26	1.69	6.29
9	583	1685	3.03	17.07	16.31	55.98	6.52	17.47	1.58	6.25
10	586	1684	2.97	16.99	16.35	55.81	6.44	17.51	1.64	6.29
F	2.42	1.71	1.94	1.46	1.78	1.26	2.21	1.99	2.58	2.23

注: $F_{0.05}(9,10) = 3.02$ ， $F < F_{0.05}$ 样品间无显著性差异，均一性良好。

Table 3. Homogeneity results of quality-controlled serum after preserved in -80°C
表 3. 质控血清 -80°C 保存后的均一性结果

	维生素 A		维生素 D ₂		维生素 D ₃		维生素 E		维生素 K ₁	
	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值	低值	高值
1	582	1685	2.97	17.09	16.27	56.90	6.37	17.53	1.58	6.26
2	578	1677	2.88	16.91	16.31	56.92	6.36	17.32	1.58	6.43
3	583	1686	2.98	16.98	16.41	56.67	6.43	17.31	1.59	6.38
4	579	1681	2.92	16.92	16.38	56.73	6.49	17.57	1.63	6.35
5	586	1684	2.96	16.89	16.32	56.44	6.45	17.42	1.64	6.37
6	583	1673	3.07	16.99	16.36	57.04	6.30	17.57	1.46	6.39
7	579	1684	2.99	17.03	16.31	56.79	6.394	17.29	1.62	6.28
8	581	1685	2.81	17.07	16.43	55.96	6.54	17.31	1.75	6.29
9	589	1682	3.04	17.01	16.41	56.82	6.49	17.47	1.55	6.29
10	582	1683	2.97	16.98	16.35	56.84	6.44	17.49	1.62	6.47
F	2.14	1.35	2.37	1.43	2.27	1.38	2.05	1.91	2.64	2.25

注: $F_{0.05}(9,10) = 3.02$, $F < F_{0.05}$ 样品间无显著性差异, 均一性良好。

4. 讨论

LCMS 检测过程中的基质效应是影响检测结果准确性关键因素, 实验室室内质控可以监测整个实验过程出现的误差[7]。目前商售 LCMS 试剂盒中的质控物多为纯溶液, 少数试剂盒加入了 5% 或 10% 的牛血清白蛋白作为基质, 但也不能完全消除检测过程中的基质效应, 因此研制稳定的维生素质控血清, 建立维生素检测的室内质控制度是临床实验室的重要任务之一。CNAS-CL02-A001: 2021《医学实验室质量和能力认可准则的应用要求》[8]和 GB/T20468-2006《临床实验室定量测定室内质量控制指南》中对检验结果的质量保证提出了明确的要求[9]。检测结果的准确度与检测的正确度和精密度有关, 而质控物就是用于评估实验方法、试剂和仪器的精密度、准确度的最佳材料, 指南的 6.2 款指出质控品的成分应与检测患者样本的基质相似或一样。质控品应该均一和稳定, 条件允许下, 可储存一年的用量。瓶间变异性应小于分析系统的变异。如果没有商品的质控品, 实验室可以自制质控品[9]。

本研究中我们按 CNAS-GL05: 2016《实验室内部研制质量控制样品的指南》[10]要求用混合健康人血清为基质制备了脂溶性维生素质控血清, 满足了 GB/T20468-2006《临床实验室定量测定室内质量控制指南》6.2 款要求; 产品均一性检测结果表明, 制备当日 4°C 、 -20°C 和 -80°C 冻存后的高、低值质控血清样品间均无显著性差异, 均一性良好; 稳定性试验结果显示, 4°C 保存的质控血清从第 4 天起维生素 K₁ 值迅速下降, 其他维生素(A、D₂、D₃ 和 E)一周后检测值也明显下降, 提示 4°C 不是本质控血清的适宜保存温度, 即便是质控血清复融后也最好在 3 天内用完; -20°C 和 -80°C 保存的质控血清中的几种维生素的检测值可稳定在 1 年以上。实验室可以根据实际条件选择冷冻储存温度。

本实验室自制的维生素质控血清, 可有效地消除检测过程中的基质效应, 均一性和稳定性可满足本实验室脂溶性维生素检测室内质量控制的要求。

参考文献

[1] 袁小芬, 马金飞, 杨青青. 等液相色谱-串联质谱技术在维生素检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6):

- 479-483.
- [2] Depreter, B., Heijboer, A.C. and Langlois, M.R. (2013) Accuracy of Three Automated 25-Hydroxyvitamin D Assays in Hemodialysis Patients. *Clinica Chimica Acta*, **415**, 255-260.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.056>
 - [3] Heijboer, A.C., Blankenstein, M.A., *et al.* (2012) Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays: Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration. *Clinical Chemistry*, **58**, 543-548.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.176545>
 - [4] Chouiali, A., Mallet, P.L., Fink, G., *et al.* (2017) Comparison of Two Methods for Measuring 25-OH Vitamin D in the Follow-Up of Patients after Bilio-Pancreatic Diversion Bariatric Surgery. *Clinical Biochemistry*, **50**, 210-216.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.11.010>
 - [5] 陆彬, 闫贵贞, 戴森戈. 杭州市 5000 名孕妇维生素水平流行病学调查[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(12): 2844-2847.
 - [6] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
 - [7] Hayama, T. (2020) Matrix Effects in Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Sciences*, **36**, 1151.
<https://doi.org/10.2116/analsci.highlights2010>
 - [8] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
 - [9] 中国国家标准化委员会. 临床实验室定量测定室内质量控制指南[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
 - [10] 中国国家标准化委员会. 实验室内部研制质量控制样品的指南[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.