参考文献:

[1] Shen H M, Liu S J, Sun D J, et al. Geographical distribution of drinking-water with high Iodine level and association between high Iodine level in drinking -water and goitre: a Chinese National investigation[J]. Br J Nutr, 2011,106(2):243

[2] Teng W, Shan Z, Teng X, et al. Effect of Iodine intake on thyroid diseases in China[J]. N Engl J Med, 2006,354(26):2783

[3] 刘嘉玉,张墨玲,阎玉芹,等.不同碘摄入水平对大鼠甲状腺功能影响的实验研究[J]. 中国地方病学杂志, 2006,25(6):615

[4] Cornier M A, Dabelea D, Hernandez T L, et al. The metabolic syndrome [J]. Endocr Rev, 2008,29(7):777

[5] 饶小胖,徐海燕,刘燕青,等. 糖调节异常者甲状腺功能的研究[J]. 中国老年保健医学, 2010,8(4):12

[6] Agbaht K, Erdogan M F, Emral R, et al. Circulating glucagon to ghrelin ratio as a determinant of insulin resistance in hyperthyroidism [J]. Endocrine, 2014,45(1):106

[7] 姜妍芳,陈超,陈若平,等. 甲状腺功能亢进症患者糖耐量状态及胰岛B细胞功能的变化[J]. 中国临床保健杂志, 2013,16(3):271

[8] 李莉芬,高妍,张志玲,等. 甲状腺功能减退患者血糖、糖化血红蛋白的观察与分析[J]. 医学理论与实践, 2012,25(12):1466

[9] 马德佳,李燕妮,何新发. 亚临床甲状腺功能减退症患者血脂、血糖含量的变化分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(21):2534

[10] 刘薇,华琳,于湄,等. 亚临床甲状腺功能减退症对糖代谢的影响[J]. 首都医科大学学报, 2008,29(6):773

[11] 丁长霞,王艳芳,刘存杰,等. 黄骅市高碘地区甲状腺功能亢进患者血糖血脂变化[J]. 河北医药, 2013,35(7):1082

[12] 董海霞.高碘对氧化损伤的影响[R]. 山东大学: 2012

[13] Nudda A, Battacone G, Bomboi G, et al. Effect of dietary Iodine on thyroid hormones and energy blood metabolites in lactating goats[J]. Animal, 2013,7(1):60

(2015-01-15 收稿)

文章编号 1006-8147(2015)04-0348-03

论 著

高效液相色谱法测血清中 25-羟维生素 D_3

刘怡欣,赛 娜,赵世晶,李紫薇,黄国伟

(天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,天津 300070)

摘要 **目的:**建立检测血清中25-羟维生素 D_3[25(OH)D_3]的高效液相色谱分析方法。**方法:**样品用甲醇沉淀蛋白,以正己烷提取后,离心取上清液过膜。甲醇-水(95:5)为流动相,选用 Venusil MP-C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行色谱分离,流速为1.0 mL/min,紫外检测波长 265 nm,柱温 30 ℃。**结果:**25(OH)D_3 在线性范围 4.00~160.00 μg/L 内与其响应值线性关系良好(r=0.999 9),4.00、8.00、16.00、80.00 μg/L 的 25(OH)D_3 的平均回收率分别为 85.22%、92.50%、100.75%、109.50%,*RSD* 分别为 4.32%、2.91%、2.25%、1.78%(n=4),测健康成年人血清 25(OH)D_3 浓度为(38.14±14.74)μg/L。**结论:**该方法准确可靠,可用于血清中 25(OH)D_3 的检测。

关键词 高效液相色谱法;25-羟维生素 D_3;血清

中图分类号 R15 **文献标志码** A

维生素 D 是一种脂溶性维生素,也是一种类固醇衍生物,主要来源于食物及皮肤合成。近年来研究显示,维生素 D 不仅能够调节钙磷平衡和骨骼代谢,还具有调节免疫、抗肿瘤、调控细胞增殖、防治代谢综合征、抗炎、保护心血管健康等多种生物学功能[1]。临床和流行病学证据也表明,维生素 D 对胰岛具有保护作用,并且是维持正常的胰岛素分泌和糖耐量所必需的物质[2]。维生素 D 缺乏的状况在全球范围内普遍存在。按照国际上对维生素 D 状态评价的普遍标准[3],全球已有 50%的人口存在维生素 D 缺乏的风险[4]。因此,有必要探索建立一种可靠、高效的测定方法,为维生素 D 的检测、相关疾病的研究与诊断提供强有力的科学依据。目前临床上普遍接受维生素 D 的评价指标是 25-羟维生素 D_3 [25-hydroxyvitamin D, 25(OH)D_3],因为它的生物半衰期是 3 周左右,较 1,25-二羟维生素 D_3 [1,25-dihydroxyvitamin D,1,25$(OH)_2D_3$](半衰期 4~6 h)更为稳定[5]。常用的测血液中 25(OH)D_3 的方法有竞争蛋白结合法(CPBA)、放射免疫法(RIA)、ELISA、高效液相色谱法(HPLC)[6]等,本研究参考相关文献[7-8],采用 HPLC 法建立血清 25(OH)D_3 的检测方法,并应用于健康成年人的检测。

作者简介 刘怡欣(1988-),女,硕士在读,研究方向:营养与慢性病防治;通信作者:黄国伟,E-mail: huangguowei@tijmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 600E 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);BSA224S 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司,d=0.1 mg);Venusil MP-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);QL-901 漩涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂);2-16PK 型离心机(美国 Sigma 公司);超纯水系统(Mili-Q integral 10,美国密理博公司)。

25(OH)D_3 对照品(美国 Sigma 公司, 705888-1 MG),纯度>98 %(HPLC 级);人血清(天津市和平区

健康教育指导中心）；甲醇、正己烷（天津博纳艾杰尔科技有限公司，色谱纯）；高纯氮气（天津赛米气体有限公司）。

1.2　研究对象的一般情况　收集 2014 年天津市和平区健康教育指导中心的健康体检者血清样本 30 例，男、女比例为 1∶1，平均年龄（50.95±10.94）岁。所有研究对象均未患糖尿病、肥胖、甲状腺功能不全、肿瘤等疾病，近期无外伤、感染，且连续 3 个月没有服用维生素 D 及其衍生物和钙剂。研究对象均签署知情同意书。

1.3　方法

1.3.1　色谱条件与系统适用性试验　色谱柱：Venusil MP-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（95∶5）溶液；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；紫外检测波长：265 nm；进样量：20 μL。

1.3.2　对照品溶液的制备　精密称取 25（OH）D_3 对照品 5 mg，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，即为 500 μg/mL 对照品溶液，使用时用甲醇稀释。

1.3.3　血清样品处理　精密量取 0.5 mL 血清置于 15 mL 离心管中，加入 0.8 mL 甲醇，漩涡震荡 2 min，加入 4 mL 正己烷，漩涡震荡 2 min，5 000 r/min 4 ℃离心 5 min，精密吸取上层清液于室温（25 ℃）氮气吹干，吹干后残渣立即用 150 μL 甲醇溶液复溶。

1.3.4　供试品溶液的制备　准确量取按照“1.3.3”项下处理的血清样本溶液 150 μL，用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后，将液体注入样品瓶中，即得供试品溶液。

1.3.5　阴性对照溶液的制备　准确量取 0.5 mL 空白血清，按照“1.3.3”及“1.3.4”项下的步骤，制备成空白对照溶液。

1.3.6　专属性试验　分别取对照品溶液、供试品溶液各 20 μL，按“1.3.1”项下色谱条件进样测定。

1.3.7　线性关系考察　精密量取 10 μL 500 μg/mL 的对照品溶液，置于 50 mL 量瓶中，用甲醇稀释，制备成 4.00、8.00、16.00、80.00、160.00 μg/L 浓度梯度的系列对照溶液。分别按照“1.3.1”项下的色谱条件进样 20 μL，进行测定。

1.3.8　精密度试验　（1）日内精密度：取 25（OH）D_3 对照品溶液适量，按“1.3.1”项下的色谱条件连续进样测定 5 次，进样量 20 μL，记录峰面积；（2）日间精密度：取 25（OH）D_3 对照品溶液适量，按“1.3.1”项下的色谱条件分别于 0、1、2、3、4 d 进样测定，记录峰面积。

1.3.9　稳定性试验　（1）室温稳定性：取同一供试品溶液适量于室温下（25 ℃）避光放置，按“1.3.1”项下的色谱条件分别于制备后 0、2、4、6 h 进样 20 μL 测定，记录峰面积；（2）冷藏稳定性：取同一供试品溶液适量置于 4 ℃ 条件下，按“1.3.1”项下的色谱条件分别于制备后 0、1、2 d 进样测定，记录峰面积；（3）冷冻稳定性：取同一供试品溶液适量置于冰冻条件下（-20 ℃），按“1.3.1”项下的色谱条件分别于制备后 0、3、6、9 d 进样测定，记录峰面积。

1.3.10　重复性试验　精密量取同一血清样品适量，共 3 份，分别按照“1.3.3”项下供试品制备方法制备供试品溶液，按照“1.3.1”项下的色谱条件各取 20 μL 进样测定，记录峰面积。

1.3.11　加样回收率试验　精密量取同一血清样品适量，共 4 份，分别加入浓度为 4.00、8.00、16.00、80.00 μg/L 的 25（OH）D_3 对照品溶液，按照“1.3.3”项下供试品制备方法制备供试品溶液，按照“1.3.1”项下的色谱条件各取 20 μL 进样测定，记录峰面积，计算方法的加样回收率。

1.3.12　样品含量测定　取 30 例健康成年人的血清样本，分别按照“1.3.3”项下供试品制备方法制备供试品溶液，按照“1.3.1”项下的色谱条件各取 20 μL 进样测定，记录峰面积，计算 25（OH）D_3 的浓度。

1.4　统计学方法　采用 SPSS16.0 统计软件对结果进行统计分析。

2　结果

2.1　专属性试验结果　按照 HPLC 测定方法及相应浓度，绘制色谱图，见图 1。由图可知该液相条件下，25（OH）D_3 的保留时间为 12.55 min，出峰时间适宜，峰形良好，且能与其他峰有效地分离。

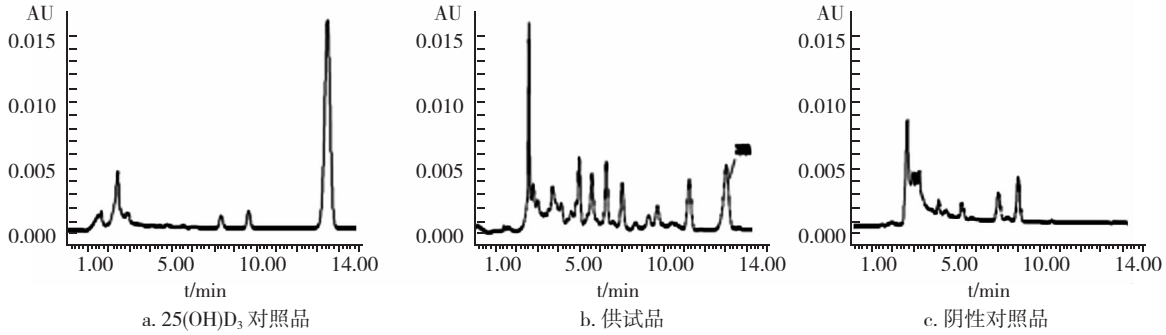

图 1　25（OH）D_3 对照品（a）、供试品（b）和阴性对照品溶液（c）的 HPLC 色谱图

2.2 线性关系考察结果 以25(OH)D_3浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标作线性回归,得线性方程为:Y=1 900.7X+67.086(r=0.999 9,n=5)。结果表明25(OH)D_3在4.00~160.00 μg/L浓度范围内与峰面积分值线性关系良好,最低定量限(LOQ)为4.00 μg/L。

2.3 精密度试验结果 血清25(OH)D_3的日内精密度*RSD*为2.00%~4.62%,日间精密度*RSD*为2.68%~5.15%,表明该方法的重现性良好,符合要求。

2.4 稳定性试验结果 (1)血清25(OH)D_3室温稳定性*RSD*为3.60%,表明血清样品在室温下6 h内稳定性良好;(2)血清25(OH)D_3冷藏定性*RSD*为3.10%,表明血清样品在4 ℃下3 d内稳定性良好;(3)血清25(OH)D_3冷冻稳定性*RSD*为2.92%,表明血清样品在-20 ℃下9 d内稳定性良好。

2.5 重复性试验结果 25(OH)D_3的血清样品溶液重复性*RSD*=0.93%(n=3),表明本方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验结果 测定结果见表1。

表1 25(OH)D_3的平均加样回收率(n=4)

检测物	样品本底值/(μg/L)	加入量/(μg/L)	测定量/(μg/L)	平均回收率/%	*RSD*/%
25(OH)D_3	29.25	4.00	32.66	85.22	4.32
		8.00	36.65	92.50	2.91
		16.00	45.37	100.75	2.25
		80.00	116.85	109.50	1.78

2.7 样品含量测定结果 30例健康成年人血清25(OH)D_3平均浓度为(38.14±14.74)μg/L,*RSD*小于4%。

3 讨论

3.1 测定方法的评价 CPBA、RIA法使用放射性核素、分析费时、不同试剂盒间存在差异,且抗体之间的交叉反应会导致免疫分析方法的特异性不足,而HPLC法不存在上述缺点,HPLC仪器复杂,但分析操作省时、省力,具有分离效能高、分析速度快、重复性好、节约成本、精确度高、可自动化等优点[9]。

3.2 色谱条件的选择 (1)测定波长的选择:对25(OH)D_3标准溶液进行波长扫描,结果表明其最大吸收在波长265 nm处,故选择在此波长下进行25(OH)D_3的测定,避免了血清内源性杂质的干扰,提高了灵敏度。(2)色谱条件的确定:有文献采用乙腈作为流动相[10],考虑到乙腈毒性较大、价格昂贵,故改用甲醇-水为流动相。经多次试验,最终将流动相比例调为甲醇-水(95:5),流速为1.0 mL/min,在此条件下,25(OH)D_3出峰时间适宜,峰形良好,待测物能与其他杂质较好地分离。(3)样品提取溶剂的选择:曾分别用氯仿、正己烷提取血清中25(OH)D_3,氯仿作为提取剂时,氮气吹干的时间较正己烷长,根据提取效果,最后确定用正己烷进行液-液萃取,血中杂质不影响被测组分的检出,同时获得了较高且稳定的提取回收率。

3.3 检测方法的应用 本研究的临床应用结果显示,健康成年人的血清25(OH)D_3的均值为(38.14±14.74)μg/L。这与相关文献[11]报道基本一致,表明本试验方法的准确性良好。

综上所述,本试验建立并验证了血清中25(OH)D_3的高效液相色谱测定方法,总体来说回收率高,精密度、准确性较好,可应用于未来血清25(OH)D_3的检测。

参考文献:

[1] Holick M F. Vitamin D: extraskeletal health[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2010, 39(2):381

[2] Kayaniyil S, Vieth R, Retnakaran R, et al. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2010, 33(6):1379

[3] Gordon C M, Feldman H A, Sinclaer L, et al. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy infants and toddlers[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2008, 162(6):505

[4] Mente A, Yusuf S, Islam S, et al. Metabolic syndrome and risk of acute myocardial Infarction a case-control study of 26903 subjects from 52 countries [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(21):2390

[5] Christakos S, Ajibade D V, Dhawan P, et al. Vitamin D[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 31(2):1

[6] 云春凤, 陈竞, 柳桢, 等. 血清中25(OH)D_3检测方法的研究进展[J]. 卫生研究, 2014, 43(4):661

[7] Kand'Ar R, Zakova P. Determination of 25-hydroxyvitamin D_3 in human plasma using HPLC with UV detection based on SPE sample preparation[J]. J Sep Sci, 2009, 32(17): 2953

[8] 王剑, 朱玮琪, 沈立松. 高效液相色谱法测定血清中25-羟基维生素D_3[J]. 检验医学, 2008(4): 380

[9] 刘春芳, 刘彦华, 汪云利, 等. 高效液相色谱法同时测定儿童血清中视黄醇、25-OH-维生素D_3和α-生育酚浓度[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(1):131

[10] 许强, 刘金生, 王轶鹏, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素D_2和维生素D_3[J]. 理化检验(化学分册), 2011(10): 1168

[11] Zhang W, Stoecklin E, Eggersdorfer M. A glimpse of vitamin D status in Mainland China[J]. Nutrition, 2013, 29(7):953

(2014-11-14收稿)