



# 团 体 标 准

T/CAMDI 165—2025

## 液相色谱用于临床维生素A、维生素E、25-羟基维生素D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>检测 通用技术要求

General technical requirements for measurement of

Vitamin A、Vitamin E、25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> by High performance liquid  
chromatography

2025-12-31 发布

2025-12-31 实施

中国医疗器械行业协会 发布

## 目 次

前 言 .....	IV
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
3.1 液相色谱 High performance liquid chromatography, HPLC .....	1
3.2 选择性 Selectivity .....	1
3.3 残留 Residue .....	1
3.4 定量下限 Lower limit of quantification .....	1
3.5 线性 Linearity .....	1
3.6 正确度 Accuracy .....	2
3.7 精密度 Precision .....	2
3.8 稀释可靠性 Dilution reliability .....	2
3.9 可报告范围 Reportable range .....	2
3.10 信噪比 Signal-to-Noise Ratio; SNR .....	2
3.11 基质 Matrix .....	2
3.12 稳定性 Stability .....	2
3.13 脂溶性维生素 fat-soluble vitamins; FSV .....	2
4 实验基本要求 .....	2
4.1 实验室基本要求 .....	2
4.2 人员要求 .....	3
4.3 液相色谱设备的基本要求 .....	3
4.4 样品采集、运输和存储要求 .....	3
4.4.1 样品采集 .....	3
4.4.2 样品运输 .....	3
4.4.3 样品的保存 .....	3
4.5 试剂和耗材 .....	3
5 方法学建立 .....	3
5.1 概述 .....	3
5.2 标准品的选择 .....	4
5.3 色谱条件建立与优化 .....	4
6 方法学评价 .....	4
6.1 选择性 .....	4
6.2 残留 .....	4
6.3 定量下限 .....	4
6.4 线性 .....	4
6.5 正确度 .....	4
6.6 精密度 .....	4
6.6.1 批内精密度 .....	4
6.6.2 批间精密度 .....	5
6.7 可报告范围验证 .....	5
6.7.1 低值样本准备 .....	5
6.7.2 高值样本准备 .....	5
6.7.3 样本测试 .....	5
6.7.4 结果计算 .....	5

6.7.5 可接受标准 .....	5
6.8 稀释可靠性 .....	5
6.9 稳定性考察 .....	5
6.9.1 样本稳定性考察 .....	5
6.9.2 系统稳定性考察 .....	6
6.10 交叉验证 .....	6
6.10.1 验证条件 .....	6
6.10.2 验证方案 .....	6
7 质量管理 .....	6
7.1 室内质控 .....	6
7.1.1 质控品 .....	6
7.1.2 质控浓度范围 .....	6
7.1.3 质控频率 .....	6
7.1.4 质控规则 .....	6
7.1.5 质控的接受标准 .....	7
7.1.6 质控失控处理 .....	7
7.2 室间质量评价 .....	7
7.3 其他质量保证和质量控制措施 .....	7
8 结果报告 .....	7
8.1 制定标准 .....	7
8.2 不符合标准的处理 .....	7
8.3 警戒值报告 .....	7
附录 A .....	8
血液中维生素A、维生素E、25-羟基维生素D2/D3液相色谱法 .....	8
A.1.1 标准储备液的制备 .....	8
A.1.2 标准溶液的制备 .....	8
A.1.3 质控溶液的制备 .....	8
A.2.1 液相色谱柱 .....	8
A.2.2 流动相 .....	8
A.3.1 蛋白沉淀法 .....	9
A.3.2 磁性固相萃取法 .....	9
A.4.1 色谱条件 .....	9
A.4.2 系统适用性测试 .....	9
A.4.3 样品检测 .....	9
A.5.1 工作曲线的建立 .....	9
A.5.2 浓度计算 .....	9
参考文献 .....	10

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国医疗器械行业协会归口。

本文件起草单位：首都医科大学附属首都儿童医学中心、首都儿科研究所、解放军第九六〇医院、中国科学院重庆绿色智能技术研究院、北京市丰台区妇幼保健院、重庆医疗器械质量检验中心、南京艾迪迈科技有限公司、中国岛津、苏州纳微生命科技有限公司。

本文件主要起草人：王晓燕、张敏、郭晋敏、杨晓洪、相蕾、杨丹、石功名、刘麟、赵光耀等。

# 液相色谱用于临床维生素 A、维生素 E、25-羟基维生素 D2/D3 检测通用技术要求

## 1 范围

本文件规定了采用高效液相色谱法（HPLC）检测血清/血浆/末梢血中脂溶性维生素（维生素 A、维生素 E、25-羟基维生素 D2/D3）的实验要求、方法验证、质量管理及结果报告。

本文件适用于 HPLC 检测体系建立与实施、试剂盒的研发的技术要求。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 26792-2019 高效液相色谱仪

生物样品定量分析方法验证指导原则 中国药典

生物分析方法验证及样品分析 M10 国际人用药品注册技术协调会 ICH 协调指导原则

WS/T408—2024 定量检验程序分析性能验证指南

GB/T20469-2006 临床实验室设计总则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 液相色谱 High performance liquid chromatography,HPLC

高效液相色谱法（HPLC）基于色谱分离原理，通过高压输液泵系统将特定流动相持续输送至填充固定相的色谱柱中，实现对样品的高效分离与检测。根据分离维度可分为：

一维色谱法：采用一根柱子进行分析，适用于常规成分分析；

二维色谱法：是将分离机理不同而又相互独立的两支色谱柱串联起来构成的分离系统。样品经过第一维的色谱柱进入接口中，通过浓缩、捕集或切割后被切换进入第二维色谱柱及检测器中。显著提升复杂混合物的分辨能力。

### 3.2 选择性 Selectivity

该方法应有选择性（Selectivity），确保目标分析物在复杂基质（如生物体液或组织提取物）中与内源性干扰物质（如结构类似物、蛋白质）及外源性共存组分（如药物联用及其代谢物）有效分离，分离度（Resolution,  $R_s$ ）应满足药典或方法验证指南要求（通常  $R_s \geq 1.5$ ）。

### 3.3 残留 Residue

应在方法建立中考察残留并使之最小。残留不影响准确度和精密度。

### 3.4 定量下限 Lower limit of quantification

定量下限是指在样品中能够实现可靠定量的分析物最低浓度，应有可接受的准确度与精密度。该定量下限应与标准曲线的最低点相一致，并且必须与预期的浓度范围以及试验目的相适应，以确保检测结果的有效性和可靠性。

### 3.5 线性 Linearity

在给定的分析测量范围内，检验程序使其检验结果与样品分析物浓度直接成比例的能力。

注 1：检验结果是指最终结果，而非仪器输出的原始信号。

注 2：非线性对分析测量范围内的单一浓度点表现为系统效应，对全部浓度点的影响可按随机效应处理。[来源：WS/T 408—2024，3.5]

### 3.6 正确度 Accuracy

分析方法的正确度是指该方法测得值与分析物标示浓度之间的接近程度，反映了方法的可靠性和可信性。正确度越高，测得值与标示浓度的偏差越小，表明方法在实际应用中越能真实反映分析物的浓度。

### 3.7 精密度 Precision

分析方法的精密度用于描述在重复测定分析物时，测得值之间的接近程度，通常以相对变异系数表示。精密度的评估应基于与准确度验证相同的分析批样品结果，以确保数据的一致性。应使用与证明准确度相同分析批样品的结果，获得在同一批内和不同批间定量下限以及低、中、高浓度质控样品的精密度。

### 3.8 稀释可靠性 Dilution reliability

样品稀释操作应确保不影响分析方法的准确度和精密度，以保证测定结果的可靠性和一致性。稀释过程需严格控制，避免因稀释倍数、稀释剂性质或操作条件的变化对分析结果产生偏差。

### 3.9 可报告范围 Reportable range

体外诊断医疗器械性能特征已被验证的测量区间。[来源：CNAS-GL037,2019，3.1]

### 3.10 信噪比 Signal-to-Noise Ratio; SNR

信噪比是色谱系统适用性试验中评价方法灵敏度的重要参数，通常用于确定方法的检测限和定量下限。

### 3.11 基质 Matrix

基质是指样本中除分析物以外的其他成分，这些成分可能会影响分析结果的准确性。

### 3.12 稳定性 Stability

分析方法或样本在指定储存条件及时效范围内保持其特性不变的能力，包括：样本稳定性和系统稳定性。

### 3.13 脂溶性维生素 fat-soluble vitamins; FSV

不溶于水而溶于脂肪及非极性有机溶剂的一类维生素。

注：本文件涉及的脂溶性维生素特指 25-羟基维生素 D3、25-羟基维生素 D2、 $\alpha$ -生育酚、视黄醇。下列符号与缩略语适用于本文件：

VA：视黄醇（vitamin A）

VE： $\alpha$ -生育酚（vitamin E）

25-OHD3：25 羟基维生素 D3（25-Hydroxyvitamin D3）

25-OHD2：25 羟基维生素 D2（25-Hydroxyvitamin D2）

## 4 实验基本要求

### 4.1 实验室基本要求

从事脂溶性维生素检测的实验室应符合 GB/T 20469 临床实验室设计总则的要求，实验室环境条件符合：

环境温度：10℃~30℃；

环境湿度：20%~80%；

大气压力：75kpa~106kpa；

供电电源：交流电压 220V±22V，频率 50Hz±1 Hz；

接地电阻≤4Ω；

室内应避免易燃、易爆和强腐蚀性气体及强烈的振动、电磁干扰和空气对流等；

室内应有良好的通风。

相关计量器具的检定。

## 4.2 人员要求

实验室技术人员应具备医学检验、分析化学、药学、生物化学等相关教育背景或工作经历，经培训、考核合格后上岗。

## 4.3 液相色谱设备的基本要求

HPLC 设备应符合 GB/T 26792 的要求。

## 4.4 样品采集、运输和存储要求

### 4.4.1 样品采集

样品采集注意以下事项：

a)一般情况下，测试样本为血清、血浆、全血或末梢血样本；

b)应考虑样本采集容器等的影响，如评估所使用的采样管中是否有目标脂溶性维生素的干扰。

### 4.4.2 样品运输

样本采集后应 2 h 内常温送达实验室，离心检测。如外送样本，宜离心后，分离血清或血浆，并在 2℃-8℃避光条件下尽快送检。

### 4.4.3 样品的保存

新鲜样本若不立即检测，应离心后分离血清，放于 2℃-8℃避光保存。2℃-8℃避光可稳定保存 7 d；-20℃及以下可稳定保存 28 d。

## 4.5 试剂和耗材

试剂和耗材的选择一般需满足下列要求：

a)试剂选择：优先选择色谱级试剂，并严格按照产品说明书的要求进行保存和使用，以确保试剂的纯度和稳定性。

b)试验用水：实验过程中使用的水应为超纯水，以避免杂质对检测结果的干扰。

c)耗材选择：选用样品采集管、加样枪头等耗材时，需评估其可能析出的杂质对检测结果的影响，确保耗材的纯净性和适用性。

d)更换验证：更换试剂或耗材的种类或供应商时，应进行性能验证，以确保新试剂或耗材的兼容性和可靠性。

通过严格遵循以上要求，可以有效提高实验的准确性和可靠性，确保检测结果的科学性和一致性。

## 5 方法学建立

### 5.1 概述

在分析之前，应全面评估目标分析物现有检测方法的局限性，并明确选择高效液相色谱（HPLC）检测的必要性。基于评估结果，可根据实际需求开发针对单种或多种脂溶性维生素的联合检测方法，以确保检测的准确性和可靠性。

## 5.2 标准品的选择

一般情况下纯度应 $\geq 98.5\%$ ，使用有证参考物质除外。

## 5.3 色谱条件建立与优化

可参考附录 A，对色谱条件进行优化。

## 6 方法学评价

### 6.1 选择性

应评价潜在的干扰物对脂溶性维生素的影响，应使用至少 6 个受试者的适宜样本来证明选择性，如结构类似物、高浓度血红蛋白、胆红素或脂质、抗凝剂、分离胶、防腐剂等。加入干扰物的定量下限附近的样本与未加入干扰物的定量下限附近的样本偏倚应小于 $\pm 20\%$ 。

### 6.2 残留

高浓度样品分析后，空白样品中的残留量应控制在定量下限的 20% 以内。

### 6.3 定量下限

应对标准曲线定量下限附近的样品，进行精密度及准确度验证，满足以下要求：

a) 定量下限不精密度（变异系数） $CV \leq 20\%$ ；计算公式如公式（1）；

b) 定量下限相对偏差 $\leq 20\%$ ；计算公式如公式（2）；

c) 信噪比 $\geq 10$ 。

$CV = SD/MN \times 100\% \dots \dots \dots (1)$

式中：

CV—变异系数；

SD—标准偏差；

MN—平均值；

相对偏差 =  $\frac{|\text{测得值} - \text{参考值}|}{\text{参考值}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$

### 6.4 线性

线性验证程序如下：

a) 应该使用至少 6 个校正浓度水平，不包括空白样品（不含分析物和内标的处理过的基质样品）和零浓度样品（含内标的处理过的基质）。

b) 在标示线性范围内，线性相关系数  $r > 0.990$ ，以验证线性关系的可靠性；

c) 考察不同天内至少 3 个独立批的校准曲线，定量下限的测得值应在标示值的 $\pm 20\%$ 以内，其他水平应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 以内。

d) 定量下限和定量上限均符合准确度要求，且 75% 的标准曲线样品需符合上述标准，且至少 6 个浓度水平需满足要求。如果某个校正标样结果不符合这些标准，应该拒绝这一标样，不含这一标样的标准曲线应被重新评价，包括回归分析。

### 6.5 正确度

应按照有证参考物质、正确度验证室间质评样品、正确度质控品的优先顺序进行准确度评价。定量下限附近的浓度准确度验证结果在靶值 $\pm 20\%$ 范围内，其他浓度准确度验证结果在靶值 $\pm 15\%$ 范围内。

### 6.6 精密度

#### 6.6.1 批内精密度

在不同工作日，开展至少连续 3 个独立分析批的精密度评价实验。每个分析批应包含 2 个不同

浓度水平的待测样本（如低值与高值质控品），每个浓度水平需进行 10~15 次重复检测。在每一批次测量过程中，应同时插入质控样品进行监测，确保分析系统的受控状态与数据可靠性。[来源：CNAS-GL037，6.3.3]

评估实验室内精密度。依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的精密度进行验证，定量下限浓度附近低值  $CV \leq 20\%$ ，其余浓度  $CV \leq 15\%$ 。[来源：生物分析方法验证及样品分析 M10]

## 6.6.2 批间精密度

至少连续检测 3 个分析批，每批检测 2 个水平的样本，每个样本重复检测 10~15 次。在每一批次测量中，应同时测量质控品。

评估批间精密度。依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的精密度进行验证，定量下限浓度附近低值  $CV \leq 20\%$ ，其余浓度  $CV \leq 15\%$ 。

## 6.7 可报告范围验证

可报告范围验证包括可报告低限（定量下限）与可报告高限（定量上限×样品最大稀释倍数）。稀释的验证按下述程序进行：

### 6.7.1 低值样本准备

将待测样本（含被分析物）用混合人血清（含被分析物浓度水平较低）或 5%牛血清白蛋白生理盐水溶液进行稀释，产生接近于方法测量区间低限（定量下限）浓度水平的样本，通常为 3~5 个浓度水平，浓度间隔应小于测量区间低限的 20%。

### 6.7.2 高值样本准备

使用混合血清或 5%牛血清白蛋白生理盐水溶液或测定方法要求的稀释液对高值待测样本（必要时可添加被分析物，并计算出理论值）进行稀释，使其接近于线性范围的上 1/3 区域内，并记录稀释倍数。至少选用 3 个高浓度样本，稀释倍数应为方法性能标明的最大稀释倍数并适当增加或减小稀释比例。

### 6.7.3 样本测试

在一次运行中将每个低值样本重复测定 5~10 次，每个高值样本重复测定 3 次。[来源：CNAS-GL037，6.5.3]

### 6.7.4 结果计算

分别计算每个低值样本的均值、SD、CV 值。对高值样本，计算乘以稀释倍数后的还原浓度和相对偏差。

### 6.7.5 可接受标准

低值样本的变异系数(计算公式如公式 1) $CV \leq 20\%$ ，高值样本的偏差(计算公式如公式 3) $\leq 15\%$ 。

$$B = (C \times d - C_0) / C_0 \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

式中：

B—偏差；

C—测定浓度（均值）；

d—稀释倍数；

$C_0$ —理论浓度。

## 6.8 稀释可靠性

通过向基质中加入分析物至高于定量上限浓度，并用空白基质稀释该样品（每个稀释因子至少 5 个测定值），来证明稀释的可靠性。准确度和精密度应在  $\pm 15\%$  之内，稀释的可靠性应该覆盖试验样品所用的稀释倍数。

## 6.9 稳定性考察

### 6.9.1 样本稳定性考察

考察至少 15 个临床血清样本在预处理、储存（常温/冷藏/冷冻）、冻融循环等条件下分析物浓度的保持能力。

## 6.9.2 系统稳定性考察

考察至少 30 天色谱系统连续运行期间保留时间、峰面积响应等参数的波动范围。

## 6.10 交叉验证

### 6.10.1 验证条件

对于同一分析物（检验项目），当实验室存在以下情况时，需验证不同检验程序在临床适用范围内患者样本检验结果的一致性：

- a) 检验的样品类型不同但临床预期用途相同，且测量单位相同或可换算时；
- b) 不同的人员检测。
- c) 使用不同的检测系统；
- d) 使用多套相同的检测系统；
- e) 多地点或场所使用的检测系统。

### 6.10.2 验证方案

#### 1) 样本要求

a) 患者或受试者样本数量应不少于 20 份（优先选择新鲜样本），被测物浓度在测量区间内应均匀分布，并涵盖医学相关水平的样本。

b) 若使用室间质评样本，样本数量应不少于 5 份。

c) 若使用质控测试，质控应包含高、中、低三个水平，且每个水平样本不少于 5 份。

#### 2) 实验室可根据实际使用情况，选择使用与参比系统比对的方法或均值法进行可比性验证：

a) 当实验室使用的检测系统数量 $\leq 4$ 时，可选用与参比系统比对的方法。检测结果与参比系统的测量结果进行比对，计算偏差，其中 5 份样品中 4 份或 90% 以上结果应符合实验室的接受标准；

b) 当实验室使用检测系统数量 $> 4$ 时，可选用均值法。以全部系统结果的均值为参考值，计算全部检测系统结果的极差，其中 5 份样品中 4 份或 90% 以上结果应符合实验室的接受标准；

c) 接受标准：待测目标物的相对偏差应小于 15%。

## 7 质量管理

### 7.1 室内质控

用于方法精密度的长期监测、反映检测结果的波动，质控数据结合各方面信息的回顾将有助实验室分析并提升方法性能。

#### 7.1.1 质控品

质控品根据基质不同分为冻干质控品、纯溶液基质和混合血清/血浆等。质控品应满足以下要求：

- a) 质控品尽量选用与待测样品具有相同或相似的基质。质控品应均一、稳定。
- b) 自配质控品时，实验室应确定其适用性，至少应评价均一性、稳定性等指标。

#### 7.1.2 质控浓度范围

质控浓度范围宜满足以下要求：

a) 应设置至少 2 个浓度水平的质控品，建议其中 1 个在 3 倍定量下限附近，1 个在定量上限的 75%-80% 附近；如增加质控浓度水平应在线性范围的中间位置。

b) 设置质控品浓度水平时宜考虑所选质控品的浓度应综合考虑参考区间范围，如缺乏及中毒附近等。

#### 7.1.3 质控频率

质控频率满足以下要求：

- a) 一个分析批内必须检测质控品进行质量控制；
- b) 应在每个分析批检测前检测质控品，宜在分析批结束时也进行质控品检测。根据具体情况，可适当增加或减少质控品频率。

#### 7.1.4 质控规则

室内质控的方法包括基于统计学的质量控制、控制限控制等。

基于统计学的质量控制，应对产生客观结果/数据的检验过程进行监测和评估，要求：

- a)质控品应当在常规标本检测前或与常规标本一同检测（相同条件、相同检测次数）；
- b)对于定量试验将质控结果绘制 Levy-Jennings 质控图，并通过多规则以判定在控或失控。

### 7.1.5 质控的接受标准

应依据所选质控规则，对质控结果进行判读，一个分析批内质控品在控时，发布临床样品检测结果。

### 7.1.6 质控失控处理

质控失控处理按以下程序进行：

- a)应绘制质控图，并通过适当的质控规则进行检测程序状态的判断；
- b)质控失控后，应先增加一个质控测试，同时调查质控失控原因并记录采取的所有措施；
- c)失控处理应至少考量峰型、干扰峰、基线噪音、保留时间漂移、携带污染、信号强度改变、干扰等因素。
- d)评估质控失控后对样本检测结果的影响：如质控配制或进样错误等导致质控失控，不影响样本检测结果，重测质控合格后，可以正常出报告；如系统问题（进样针堵塞、流速异常、流路污染等）导致质控失控，需维护系统，重测质控合格后，重新检测样本再出具报告。

## 7.2 室间质量评价

室间质量评价（external quality assessment, EQA）宜按以下程序进行：

- a)通过参加 EQA 来评价实验室检测能力，对能力验证结果进行分析总结，及时采取纠正或预防措施；
- b)无适用的 EQA 项目时，宜与外部实验室进行比对；

## 7.3 其他质量保证和质量控制措施

应同时选用其他质量保证程序用以保障检测结果的准确性，如实验室内部比对方案等方法进行质量保证。实验室内部比对方法可参照 6.10 执行。

## 8 结果报告

在出具检测结果报告时，实验室应遵循以下要求：

### 8.1 制定标准

实验室应明确制定接受或拒绝某一分析批或检测结果的标准，包括但不限于以下内容：

- a)室内质控是否符合要求；
- b)系统适用性是否符合规范；
- c)患者信息是否完整且与样本匹配；
- d)样本检测结果及参考范围；

### 8.2 不符合标准的处理

若检测结果不满足上述标准，该分析批不得出具正式检测报告。实验室应立即重新测定，并及时通知临床科室说明原因，确保后续检测结果的可靠性。

### 8.3 警戒值报告

当检测结果达到实验室设定的警戒值时，实验室应在第一时间将结果报告给临床科室，并确保信息传递的准确性和及时性。同时应明确，检测结果仅对测试样本在检测时的状态负责，不涉及样本采集前或采集后的其他状态。

## 附录 A

### 血液中维生素 A、维生素 E、25-羟基维生素 D2/D3 液相色谱法

#### A.1 标准溶液的制备

##### A.1.1 标准储备液的制备

配置方法如下：

- a) 0.02 % 抗坏血酸 (VC) 甲醇溶液 (现配现用)：准确称量约 2mg VC，加入 100 mL 甲醇，充分混匀；
- b) 准确称量 25-OHD2、25-OHD3 各约 10mg，于 10 mL 容量瓶中，加入甲醇溶解定容。
- c) 准确称量约 VE 10 mg，取 100 $\mu$ L 浓度为 5mg/mL 的 VA，取 50 $\mu$ L b) 项下配制的 25-OHD2、25-OHD3 溶液于 5 mL 容量瓶中，加入 0.02 % VC 定容；
- d) 上下颠倒混匀不少于 15 次；
- e) 标准溶液储备液的浓度分别为：VA 100 $\mu$ g/mL、VE 2000  $\mu$ g/mL、25-OHD2. 10 $\mu$ g/mL、25-OHD3 10 $\mu$ g/mL、
- f) 分装于玻璃小瓶-70 $^{\circ}$ C 及以下避光至少可保存 6 个月。

##### A.1.2 标准溶液的制备

配置方法如下：

- a) 0.02 % 抗坏血酸 (VC) 甲醇溶液 (现配现用)：准确称量 2 mg VC，加入 100 mL 甲醇，充分混匀；
- b) 取上述标准品储备液 50  $\mu$ L，加入 950  $\mu$ L 0.02 % 抗坏血酸 (VC) 甲醇溶液，充分混匀，得到标准品工作液 1 (S1)；
- c) 替代基质 (BSA 稀释液)：称取 2g BSA、0.5g 氯化钠、2g 甘露醇，加入 100mL 的纯水中溶解混匀即可。
- d) 用替代基质将 S1 进行稀释分别得到浓度范围为：25OHD2 和 25OHD3:5 ng/mL~100 ng/mL、VA: 50 ng/mL~1000 ng/mL、VE:1000 ng/mL~26000 ng/mL。

##### A.1.3 质控溶液的制备

- a) 低值质控：用替代基质将标准溶液进行稀释，得到浓度范围为：25OHD2 和 25OHD3:15ng/mL、VA: 150 ng/mL、VE:3000 ng/mL。
- b) 高值质控：用替代基质将标准溶液进行稀释，得到浓度范围为：25OHD2 和 25OHD3:80ng/mL、VA: 800 ng/mL、VE:16000 ng/mL。

#### A.2 色谱参数的建立和优化

##### A.2.1 液相色谱柱

液相色谱柱应满足以下要求：

- a) 根据脂溶性维生素的理化性质，选择具有良好稳定性及重现性的 C18 色谱柱 (如 C18-H 4.6\*100mm,5 $\mu$ m)；也可根据实验室情况选取合适的色谱柱。
- b) 色谱峰应左右对称性良好，无拖尾、前沿峰。拖尾因子应在 0.85-1.15。
- c) 系统适用性测试时，目标峰理论塔板数不低于 3000，目标峰与相邻峰分离度大于 1.5。

##### A.2.2 流动相

流动相 A：可采用乙腈-甲醇作为流动相 A，现用现配。

流动相 B：可采用纯水作为流动相 B，现用现配。

可根据使用色谱柱匹配相应的流动相。

### A.3 样本前处理（包括标准品工作液和血液样本）

根据实验情况选择合适的前处理方法：不同仪器选择不同的前处理方法。二维液相色谱可选用蛋白沉淀法；一维液相色谱可选用磁性固相萃取法。

#### A.3.1 蛋白沉淀法

- a)加样：移取标准品工作液或血液样本 100~300 $\mu$ L，加入蛋白沉淀管中；
- b)移液：移取蛋白沉淀剂（如乙腈）300~900 $\mu$ L，加入蛋白沉淀管中；
- c)沉淀：充分混匀，13000rpm 离心 10min 或磁珠吸附分离上清液；或正压过滤分离过滤液。

#### A.3.2 磁性固相萃取法

- a)加样：移取标准品工作液或血液样本 100~300 $\mu$ L，再移取稀释剂（如纯水）150 $\mu$ L，辅助提取剂（如甲醇）450 $\mu$ L 加入到处理管中，充分混匀；
- b)吸附：利用磁棒移取活化后的 C18 磁性固相萃取微球 5 mg，加入处理管中，40 $^{\circ}$ C 加热混匀 2min，利用磁棒吸附磁珠，弃掉液体；
- c)淋洗：移取淋洗液（如纯水）300~900 $\mu$ L，加入处理管中，充分混匀 20s，利用磁棒吸附磁珠，弃掉淋洗液；
- d)洗脱：移取洗脱液（如甲醇）150~900 $\mu$ L，加入处理管中，40 $^{\circ}$ C 加热混匀 2min，利用磁棒吸附磁珠，收集洗脱液即可。

### A.4 样品检测

#### A.4.1 色谱条件

- 色谱柱：C18-H（4.6\*100mm,5 $\mu$ m）；柱温：40 $^{\circ}$ C；  
 进样量：400 $\mu$ L(全自动二维液相色谱系统)；运行时间：8min  
 流动相：流动相 A：流动相 B=7：3（可根据实验室仪器和色谱柱调整流动相比例）

#### A.4.2 系统适用性测试

取系统适用性溶液，进样结果中 25-OHD2、25-OHD3、VA、VE 与相邻峰的分离度 $>1.5$ ，保留时间不超过 $\pm 20\%$ ，信噪比  $S/N > 5$ 。如系统适用性溶液测试结果不满足上述要求，可重复进样。

#### A.4.3 样品检测

取处理好的校准品、质控品和血液样本注入液相色谱仪进行检测，记录色谱图与待测样品中各化合物的峰面积。

### A.5 结果计算

#### A.5.1 工作曲线的建立

分别取标准物质由低至高进行测定。以标准曲线样品的标示浓度为横坐标（ $x$ ），以标准曲线样品的实际检测峰面积为纵坐标（ $y$ ），权重根据情况选择，推荐  $1/x$  或  $1/x^2$ ，绘制标准曲线，进行加权线性回归（ $r \geq 0.990$ ）。在每次开机时进行一次质控物的检测，允许定量下限的检测浓度在靶值浓度的 80.0%~120.0%，其余样品的检测浓度在靶值的 85.0%~115.0%之间，标准曲线样品和质控样品浓度水平不能被移除。

#### A.5.2 浓度计算

根据工作曲线计算血清样本中 25-OHD2、25-OHD3、VA、VE 的含量。

## 参 考 文 献

- [1]GB/T29791.1—2003 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示）第1部分：术语、定义 和通用要求
- [2]GB/Z35959—2018 液相色谱-质谱联用分析方法通则
- [3]WS/T356-2024 参考物质互换性评估指南
- [4]WS/T408-2024 定量检验程序分析性能验证指南
- [5]WS/T478—2024 血清 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 D<sub>3</sub> 的检测同位素稀释液相色谱串联质谱法
- [6]WS/T492—2016 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证
- [7]WST402—2024 临床实验室定量检验项目参考区间的制定
- [8]国家卫生健康委临床检验中心维生素 D 全国室间质量评价（external quality assessment, EQA）
- [9]邱玲等，医疗机构临床质谱实验室建设共识，中华检验医学杂志，2023，46(08)：783-791.
- [10]叶圆圆等，临床检验液相色谱-质谱检验中质量控制[J]. 国际检验医学杂志，2016，37(24)：3514-3516
- [11]中国药典 2020 年版 第 4 部 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则
- [12]中华医学会检验医学分会，卫生计生委临床检验中心.液相色谱—质谱临床应用建议[J].中华 检验医学杂志，2017，40(10)：770-779
- [13]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
- [14]CNAS-CL02-A001 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求
- [15]CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南
- [16]CNAS-GL047 医学实验室定量检验程序结果可比性验证指南
- [17]d Estimation of Bias;Approved Guideline—Third Edition.The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
- [18]EP14-A3—Evaluation of Commutability of Processed Samples ; Approved Guideline—Third Edition
- [19]EP15-A3 User Verification of Precision an