

利用SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS系统建立血浆中痕量血管紧张素II的检测方法

Determination of trace angiotensin II in plasma with SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS system

刘丹 黄超 李国庆

Liu Dan, Huang Chao, Li Guoqing

SCIEX中国, 临床事业部

SCIEX China, Clinical Buessiness Unit

Keywords: angiotensin II, human plasma, LC-MS/MS

前言

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 是肾脏所产生的血压调节系统。主要功能是调节和维持人体血压、水、电解质的平衡, 维持人体内环境的相对稳定。当体内血压降低时, 肾素通过切割血管紧张素原 (Angiotensinogen, AGT) 产生血管紧张素I (Angiotensin I, Ang I), 血管紧张素I具有较弱的血管收缩作用。血管紧张素I能进一步被血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Emzyme, ACE)切割成血管紧张素II (Angiotensin II, Ang II)。血管紧张素II能收缩血管, 增加醛固酮的分泌。醛固酮可以促进远曲小管和集合管对Na⁺、水的重吸收, 最终引起血压的升高。检测Ang I和Ang II已经成为原发性和继发性高血压分型诊断、治疗以及研究的重要指标。

Ang II在体内属于痕量化合物, 在体内浓度为pg级, 是调节水盐代谢及血压的激素, 测定Ang II的变化, 对心血管、肾病、内分泌疾病的诊断和治疗有重要意义。如体内AngII水平降低, 提示可能为原发性醛固酮增多症、晚期肾衰竭等; 体内AngII水平升高, 提示可能为原发性高血压及其他类型的高血压, 分泌肾素的肾球旁器增生症或肿瘤。体内Ang II常用的分析方法为放射免疫法 (RIA) 和液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。其中LC-MS/MS方法灵敏, 特异性好。本方法采用SCIEX 液相色谱串联质谱系统, 以待测目标物的同位素标记物为内标, 测定人血浆中Ang II浓度。

1. 实验部分

1.1 血浆样品前处理

样品采集: 使用EDTA抗凝真空管采集患者静脉血。尽快 (2 h 内) 离心分离血浆。

样品处理: 取400 μL血浆分别加入65 μL抑制剂, 加入14 μL甲酸, 加入20 μL Ang II的IS溶液, 加入400 μL水, 混匀后, 室温下离心10 min。上清液经SPE萃取后进样分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18。流动相采用氟化铵水溶液和甲醇, 柱温设定为40°C。进样量为5 μL。洗脱梯度见表1。

表1. 洗脱梯度。

时间 (min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
1.00	0.4	80	20
1.50	0.4	50	50
3.30	0.4	40	60.
3.35	0.4	2	98
4.15	0.4	2	98
4.20	0.4	80	20
5.00	0.4	80	20

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为45 psi和40 psi, 脱溶剂气温度为 550°C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为8 psi; 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为5500 V。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物

监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE), 目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数。

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
血管紧张素II-1	Ang II-1	523.800	263.200	100	30
血管紧张素II-2*	Ang II-2	523.800	784.400	100	28
血管紧张素II内标-1	Ang II-IS-1	528.800	263.200	100	31
血管紧张素II内标-2*	Ang II-IS-2	528.800	794.400	100	28
* 定量离子					

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下, Ang II在15~5000pg/mL范围内线性良好, r值0.9995 (如图1); 各标曲点准确度在98%~105%之间 (如图2)。

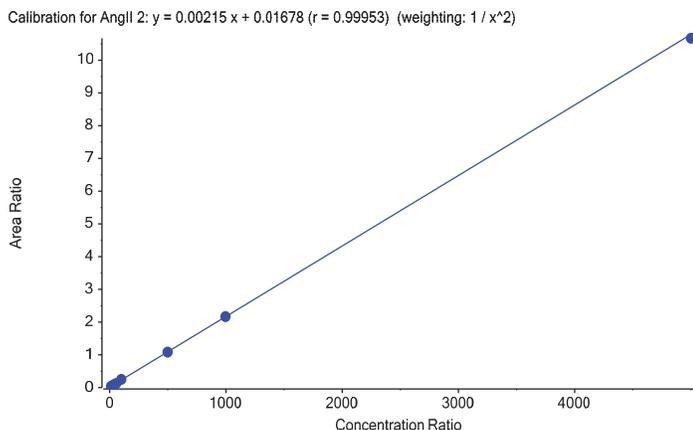


图1. Ang II的标准曲线。

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Used	Calculated Concentration	Accuracy
BL	Unknown	AngII 2	N/A	1.787e2	<input checked="" type="checkbox"/>	<0	N/A
STD-S1	Standard	AngII 2	15.00	9.570e2	<input checked="" type="checkbox"/>	15.050	100.33
STD-S2	Standard	AngII 2	30.00	1.270e3	<input checked="" type="checkbox"/>	29.783	99.28
STD-S3	Standard	AngII 2	50.00	2.174e3	<input checked="" type="checkbox"/>	48.749	97.50
STD-S4	Standard	AngII 2	100.00	4.381e3	<input checked="" type="checkbox"/>	105.383	105.38
STD-S5	Standard	AngII 2	500.00	2.300e4	<input checked="" type="checkbox"/>	498.134	99.63
STD-S6	Standard	AngII 2	1000.00	3.641e4	<input checked="" type="checkbox"/>	989.453	98.95
STD-S7	Standard	AngII 2	5000.00	2.320e5	<input checked="" type="checkbox"/>	4946.742	98.93

图2. Ang II的标曲各点的准确度。

2.2 样本采集谱图

标准曲线定量下限样品及实际人血浆样品中Ang II和IS-Ang II的色谱图能将内源性干扰物同目标物分离, 峰形和灵敏度良好 (见图2)。

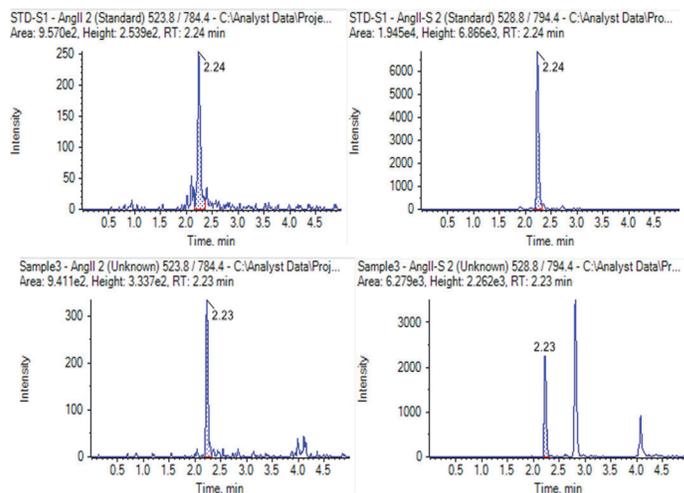


图2. 标准曲线定量下限样品及实际人血浆样品中Ang II和IS-Ang II的色谱图。(a) 定量下限样品中Ang II; (b) 定量下限样品中IS-Ang II; (c) 人血浆样品中Ang II; (d) 人血浆样品中IS-Ang II。

2.3 性能验证参数

采用低高两个浓度水平的质控品, 每个浓度平行测定12次, 得到日内精密RSD在2.5%~11.9%范围内。低高两个浓度水平质控品, 每个浓度平行测定4次, 连续测定3天, 得到日间精密RSD在5.5%~9.2%之间。日内和日间精密RSD均小于11.9% (见表3)。

表 3. Ang II的日内及日间精密度的。

ANG II		Validation-1 (n=4)	Validation-2 (n=4)	Validation-3 (n=4)	日间平均值 (pg/mL)	日间 RSD
日内 平均值 (pg/mL)	LQC	416.30	379.45	402.55	399.43	5.5%
日内RSD		2.5%	3.8%	5.7%		
日内 平均值 (pg/mL)	HQC	1050.83	1074.18	1132.60	1085.87	9.2%
日内RSD		8.2%	7.5%	11.9%		

在三个来源空白血浆中分别添加两个浓度水平的Ang II，得到两个添加浓度在三个来源血浆的回收率在85.3%~105.1%范围内，不同来源血浆的不同浓度加标回收率RSD值小于10.4%（见表4）。

表 4. Ang II的加标回收率。

Ang II		加标回收率	RSD
Sample1	加标1	95.2%	10.4%
	加标2	85.7%	3.7%
Sample2	加标1	85.3%	
	加标2	85.5%	
Sample3	加标1	105.1%	
	加标2	91.1%	

总结

Ang II作为体内极痕量内源性物质，常规的检测方法很难对其精确定量。本方法是基于Triple Quad™ 4500开发，建立了可对Ang II进行精确定量检测的液相色谱串联质谱方法。能够很好的排除内源性干扰，且灵敏度满足要求，方法稳定性好准确性高，能满足实际检测需求。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11945-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)