

利用SCIEX 液质联用系统建立血浆中血管紧张素I和醛固酮同时测定的分析方法

Simultaneous Determination of Aldosterone and Angiotensin I from Human Plasma Using LC-MS/MS

黄超, 刘丹, 李国庆

Huang Chao, Liu Dan, Li Guoqing

SCIEX中国, 临床事业部

SCIEX China, Clinical Business Unit

Keywords: angiotensin I, aldosterone, plasma

前言

中国高血压患者总人数已突破3.3亿, 高血压按病因可分为原发性和继发性高血压。其中原发性醛固酮增多症 (primary aldosteronism, PA) 是继发性高血压中最常见的病因, 在年轻高血压人群中约占10%。PA临床表现为高血压和 (或) 低血钾的临床综合征, 其作为一种“可治愈的高血压”, 若能早期诊断, 可通过手术或药物治疗使血压回到正常水平, 改善患者预后。

肾素是由肾小球旁器释放的一种蛋白水解酶, 能催化肝脏分泌进入血浆中的血管紧张素原转变成血管紧张素I (angiotensin, Ang I), 从而增加醛固酮 (aldosterone, Ald) 的生成。醛固酮是由肾上腺皮质球状带分泌的盐皮质激素, 主要生理功能是保钠排钾, 通过调节血容量维持体液水盐平衡。临床上推荐使用醛固酮/肾素活性比值作为PA的初筛方法, 在这一过程中准确检测肾素活性-醛固酮浓度至关重要。

Ang I和Ald在体内的含量比较低, 其中醛固酮含量为皮克级, 对检测方法的灵敏度要求很高。本文采用质谱技术建立了检测PA的方法, 结合多重反应监测技术, 能够实现一针进样同时分析Ang I和Ald的含量, 为早期快速筛查PA提供了技术支撑。

1. 实验部分

1.1 血浆样品预处理

样品处理: 取一定量的血浆和抑制剂混合, 混匀后于37°C 孵

育3 h, 加入甲酸终止反应。在上述体系中加入含Ang I和Ald内标的溶液, 混匀后, 室温下离心取上清。对Ang I的本底含量的测定, 不经孵育, 具体同上。

采用基于反相的微孔板进行固相萃取, 最后采用甲醇洗脱, 洗脱液中加入水, 混匀后进样分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18 2.1 × 100 mm, 2.6 μm。流动相采用甲酸水溶液和甲醇, 柱温设定为50°C。进样量为25 μL。梯度洗脱, 具体见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0.30	0.35	80	20
0.60	0.35	55	45
2.80	0.35	32	68
2.90	0.35	0	100
3.80	0.35	0	100
3.85	0.35	80	20
5.00	0.35	80	20

1.3 质谱条件

采用LC-MS/MS系统, 结合电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 和多反应监测 (multiple reaction monitoring,

MRM) 模式进行质谱扫描。本实验采用正负切换的方式进行扫描, 该扫描模式可以是分段扫描也可以正负同时扫描。其中: 雾化气45 psi, 辅助加热器 40 psi, 气帘气30 psi, 离子源温度 500°C, 正离子模式喷雾电压5500, 负离子模式-4500, Ang I使用正离子模式, Ald用负离子模式监测。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和调整, 离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数。

化合物	母离子	子离子	DP	CE
Ald-1	359.2	331.1	-100	-21
Ald-2	359.2	189.0	-100	-24
Ald-IS-1	367.1	194.0	-110	-27
Ald-IS-2	367.1	339.3	-110	-25
Ang I-1	433.1	647.5	60	13
Ang I-2	433.1	619.4	60	15
Ang I-IS-1	436.4	657.5	46	27
Ang I-IS-2	436.4	629.4	46	27

2. 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

出于涵盖医学决定点的需求, Ang I的定量下限为0.3 ng/mL, 线性范围为0.3-100 ng/mL, Ald的定量下限为15 pg/mL, 线性范围为15-5000 pg/mL。在该范围内, 无论是正常水平还是异常样品均可被定量检测到。具体见表3。

表3. Ang I及Ald的线性回归方程 (三个分析批)。

分析物	线性回归方程	相关系数	批次
Ald	$y=0.00279x+0.00265$	0.9968	第一批次
Ald	$y=0.00212x+0.00090$	0.9997	第一批次
Ald	$y=0.00235x+0.00404$	0.9997	第二批次
Ang I	$y=0.33628x+0.01484$	0.9990	第二批次
Ang I	$y=0.35550x-0.00481$	0.9966	第三批次
Ang I	$y=0.38095x+0.01761$	0.9993	第三批次

2.2 样本采集谱图

人血浆样品中Ang I和醛固酮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1)。

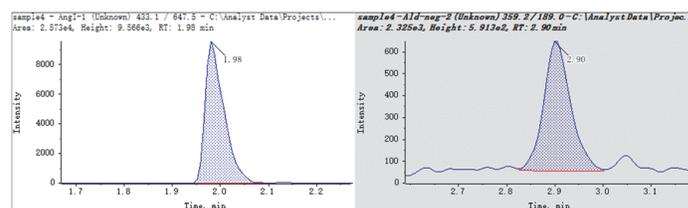


图1. 人血浆实际样品的Ang I和Ald图谱。

2.3 性能验证参数

通过配置一定浓度的质控样品来检测该方法的日内和日间精密度, 结果见表4, 结果表明日内和日间精密度CV值均小于11.60%。

表4. 不同浓度样品的日内和日间精密度结果。

精密度	低值样品 (n=12)			高值样品 (n=12)		
Ald批次	1	2	3	1	2	3
日内CV%	4.90	11.60	6.40	6.50	5.30	5.20
日间平均值 (pg/mL)	101.41			596.42		
日间CV%	7.50			6.80		
Ang I批次	1	2	3	1	2	3
日内CV%	8.90	9.70	3.80	1.20	5.50	2.40
日间平均值 (ng/mL)	1.76			12.64		
日间CV%	11.60			6.20		

通过外添加回收率试验, 考察方法的准确度, 其中加标回收率Ald为91.82%-100.51%, Ang I为91.83%-110.63%, 结果见表5。

表5. 不同浓度样品的加标回收率结果。

Ang I	回收率	RSD	Ald	回收率	RSD
Sample1 加标1	94.72%	10.01%	Sample1 加标1	100.51%	7.23%
加标2	91.83%	7.85%	加标2	91.82%	3.75%
Sample2 加标1	92.44%		Sample2 加标1	97.73%	
加标2	95.51%		加标2	93.86%	
Sample3 加标1	110.63%		Sample3 加标1	98.75%	
加标2	96.83%		加标2	93.63%	

3. 总结

本方案采用固相萃取来进行样品前处理，无需复杂的净化提纯步骤，结合LC-MS/MS，可以一针进行同时分析Ang I和Ald，能很好服务于临床样品的检验。该检测方式检验特异性好，灵敏度高，并且整个流程时间短，通量高，能极大的节约耗材和时间成本。

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-02-12061-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)