

利用SCIEX 液质联用系统建立血浆中醛固酮、肾素活性和血管紧张素II同时测定的分析方法

Simultaneous Determination of Plasma Aldosterone, Renin Activity and Angiotensin II from Human Plasma Using LC-MS/MS

黄超 刘丹 李国庆

Huang Chao, Liu Dan, Li Guoqing

SCIEX中国

SCIEX China

Key Words: angiotensin II, aldosterone, plasma, renin activity

Abstract

This application technical note is about the simultaneous determination of aldosterone (Ald), angiotensin I (Ang I) and angiotensin II (Ang II) from human plasma using the solid phase extraction plate prior to LC-MS/MS analysis.

ALD is secreted by the zona glomerulosa of adrenal cortex and plays an important role in sodium and potassium homeostasis. Renin is an enzyme that is primarily produced in the juxtaglomerular apparatus of kidney and acts on the conversion of angiotensinogen to angiotensin I. Ang I is the peptide precursor and further cleaved by angiotensin converting enzyme into Ang II. Renin, angiotensin (including Ang I and Ang II) and ALD together make up the RAAS system, which plays an important role in the balance of water-electrolyte metabolism in human body. This technical note describes the simultaneous extraction of aldosterone and angiotensin from plasma, with the potential to improve throughput and reduce costs.

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），Ang I在血管紧张素转化酶抑制剂的作用下，生产血管紧张素II（angiotensin, Ang II），进而促进醛固酮（aldosterone, Ald）的生成。肾素、血管紧张素I、血管紧张素II及醛固酮一起共同构成了RAAS系统。该系统能通过调节血容量维持体液水盐平衡，调节血压。

临床上推荐使用醛固酮/肾素活性比值作为PA的初筛方法，其中肾素活性可通过测定一定时间内Ang I的生成的量来表征。在这一筛查过程中，准确检测RAAS系统各要素的含量至关重要。基于质谱技术的高灵敏度和高特异性的特点，本文采用质谱技术，有力的克服了微量标志物检测的难点，建立了RAAS系统（ALD、Ang I和Ang II）的分析测定方法，结合多重反应监测技术，能够实现一针进样同时分析Ang I、Ang II和Ald的含量，为早期快速判定PA及其他高血压疾病提供了技术支撑。

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℃孵育3 h，加入甲酸终止反应。在上述体系中加入含Ang I、Ang II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℃。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 | 35 |
| 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℃，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。

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，Ang II和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 |
| Ang II-1 | 523.8 | 263.2 | 100 | 30 |
| Ang II-2 | 523.8 | 784.4 | 100 | 28 |
| Ang II-IS-1 | 528.8 | 263.2 | 100 | 31 |

表3. Ang I、Ang II及Ald的线性回归方程

| 分析物 | 线性回归方程 | 相关系数 | 批次 |
|--------|----------------------|--------|------|
| Ald | $y=0.00212x+0.00090$ | 0.9997 | 第1批次 |
| Ald | $y=0.00235x+0.00404$ | 0.9997 | 第2批次 |
| Ang I | $y=0.35550x-0.00481$ | 0.9966 | 第1批次 |
| Ang I | $y=0.38095x+0.01761$ | 0.9993 | 第2批次 |
| Ang II | $Y=0.00262X+0.0102$ | 0.9978 | 第1批次 |
| Ang II | $Y=0.00248X+0.0043$ | 0.9986 | 第2批次 |

2.2 样本采集谱图

人血浆样品中Ang I、Ang II和醛固酮的色谱图能将内源性干扰物同目标物分离，峰形良好 (见图1)。

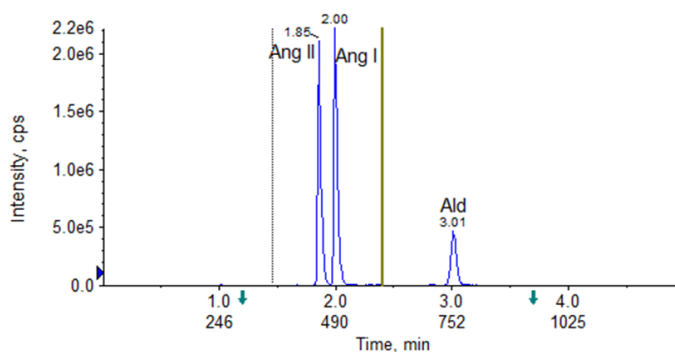


图1. Ang I、Ang II 和Ald 图谱

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RSD值均小于7.50%。

表4. 不同浓度样品的日内和日间精密度结果

| 精密度 (n=5) | Ald | Ang I | Ang II |
|-----------|-------|-------|--------|
| LQC日内RSD | 4.90% | 3.80% | 5.93% |
| HQC日内RSD | 5.30% | 1.20% | 6.81% |
| LQC日间RSD | 7.50% | 1.76% | 5.93% |
| HQC日间RSD | 6.80% | 6.20% | 7.34% |

在三个来源空白血浆中分别添加两个浓度水平的Ang I、Ang II和ALD，结果表明两个添加浓度在三个来源血浆的回收率在87.55%-110.63%，不同来源血浆加标回收率RSD值小于8.15%（见表5）。

表5. 不同浓度样品的加标回收率结果

| 样品 | Ang I | Ang II | ALD |
|----------------|---------|----------|---------|
| Sample1 加标1回收率 | 94.72% | 100.51 % | 95.20% |
| Sample1 加标2回收率 | 91.83% | 91.82 % | 89.72% |
| Sample2 加标1回收率 | 92.44% | 97.73% | 88.52% |
| Sample2 加标2回收率 | 95.51% | 93.86 % | 87.55% |
| Sample3 加标1回收率 | 110.63% | 98.75% | 105.18% |
| Sample3 加标2回收率 | 96.83% | 99.63% | 91.12% |
| 加标1 RSD | 8.09% | 1.15% | 6.85% |
| 加标2 RSD | 2.12% | 3.31% | 1.47% |

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、Ang II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。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13254-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：SCIEX-China