

SCIEX液相色谱串联质谱法通过直接蛋白沉淀测定人血浆中血管紧张素 I 和醛固酮

A simplified LC-MS/MS method for Quantification of Angiotensin I and Aldosterone in Human Plasma using rapid protein precipitation by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.

胡凤梅, 刘丹, 黄超

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao

Keywords: Angiotensin I; Aldosterone; Protein Precipitation; LC-MS/MS

引言

原醛症是由于人体肾上腺皮质异常分泌过量醛固酮, 造成肾素-血管紧张素系统的活性被抑制, 在临床上一般表现为低血钾伴随高血压。原醛症在高血压人群中具有相当大的占比, 与原发性高血压患者相比, 原醛症患者心脏、肾脏等高血压靶器官损害更为严重。因此, 早期诊断、早期治疗就显得至关重要。根据原醛症诊断治疗的专家共识, 推荐将ARR (血浆醛固酮与肾素活性比值) 作为原醛症首选的筛查指标。因此检测血浆醛固酮浓度和肾素活性就成为筛查原醛症的必要步骤, 其中肾素活性一般可通过体外37°C下孵育时Ang I的生成速率来表示。

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 以其卓越的特异性, 极高的检测灵敏度和高通量样本检测等优点, 得到越来越多的临床认可, 也逐步成为临床检验的一项重要手段。

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 采用同位素内标校正法, 建立了一次分析, 同时准确检测血浆中血管紧张素 I 和醛固酮的定量方法。本实验采用蛋白沉淀法进行样品前处理, 步骤较简单, 实验耗时较短, 可以满足临床检测样品的需求。检测化合物相关信息如下。

实验部分

样品前处理

本实验采用蛋白沉淀法对血浆样本进行处理, 步骤如下:

取一定体积的血浆样品加入生成抑制剂, 于37°C孵育3h后加入甲酸终止反应, 并涡流混匀; 对Ang I的本底含量的测定, 血浆不经孵育, 其他添加剂保持加入量一致; 取孵育后的血浆样本加入内标和沉淀剂进行蛋白沉淀, 涡流混匀后冰箱冷藏30 min, 将冷藏后的样本进行常温高速离心, 取上清液进样分析。

表1. 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
醛固酮	Aldosterone	ALD	52-39-1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅
醛固酮-D7*	Aldosterone-D7	ALD-IS	N/A	C ₂₁ H ₂₁ D ₇ O ₅
血管紧张素I	Angiotensin I	Ang I	70937-97-2	C ₆₂ H ₈₉ N ₁₇ O ₁₄
血管紧张素I- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄ *	Angiotensin I - [arginine ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]	Ang I-IS	N/A	C ₆₂ ¹³ C ₆ H ₈₉ N ₁₇ ¹⁵ N ₄ O ₁₄

*: 商品化内标标记位点不同, 请根据具体情况调整

色谱条件

色谱柱：Kinetex C18, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm;
 流动相：A相为含氟化铵的水溶液，B相为甲醇；
 流速：0.35 mL/min；
 柱温：50 °C；
 进样体积：10.00 μL。
 洗脱方式：梯度洗脱，见表2；

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	70	30
0.5	70	30
3.4	10	90
4.4	10	90
4.5	70	30
6	70	30

质谱条件

质谱平台：SCIEX Triple Quad™ 6500
 电离方式：电喷雾离子源，正负切换离子模式；
 检测方式：多反应监测 (MRM)；
 离子源温度 (TEM): 500°C； 雾化气 (Gas1): 70 psi；
 辅助气 (Gas2): 50 psi； 气帘气 (Gurtain Gas): 35psi；
 电喷雾电压：5500V/-4500V；
 对应MRM通道及参数见表3。

结果与讨论

醛固酮采用负离子扫描模式，血管紧张素 I 采用正离子扫描模式，醛固酮和血管紧张素 I 在各自出峰位置峰形对称，响应良好。在本方法条件下，两种化合物不存在互相干扰。典型液相色谱图如图1。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数 (正负离子同时扫描的模式)

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
醛固酮	Aldosterone	359.1	189.1*	-100	-24
		359.1	331.1	-100	-21
醛固酮-D7	Aldosterone-D7	366.2	338.2	-100	-21
血管紧张素 I	Angiotensin I	433.1	647.5*	130	13
		433.1	619.4	130	15
血管紧张素 I- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	Angiotensin I - [arginine ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]	436.4	657.5	130	27
		436.4	629.4	130	27

*: 为定量离子对

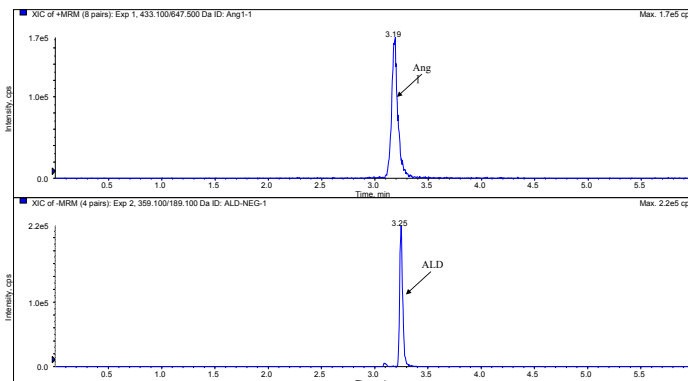


图1. 血管紧张素 I 和醛固酮典型液相色谱图

标准曲线

以BSA溶液为替代基质，配制标准工作曲线。各待测物在各自的线性范围内线性良好， $r^2 > 0.99$ ，符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

加标回收率

向实际血浆样本中分别添加低、中、高三个浓度的混标溶液，得到低、中、高三个添加浓度的加标样品。数据表明醛固酮和血管紧张素 I 两个化合物血浆的平均回收率均在85%~115%范围内，符合生物样本检测要求。具体结果见表5。

表4. 醛固酮和血管紧张素 I 的标准曲线

化合物	斜率	截距	r^2	LLOQ ng/mL	ULOQ ng/mL	拟合方程
ALD	7.44682	0.01633	0.99907	0.0150	5.00	$y=8.26377x+0.00571$
AngI	2.81E-02	4.81E-03	0.99776	0.300	100	$y=0.02813x+0.00481$

表5. 醛固酮和血管紧张素 I 的平均加标回收率

ALD			AngI		
加标1	加标2	加标3	加标1	加标2	加标3
92.9%	97.0%	96.7%	93.8%	101.3%	103.0%

重现性

为了考察系统稳定性以及色谱柱的耐受性，按照前处理步骤制备样本，连续进样500针。结果显示，进样过程中液相系统一直保持良好的压力稳定性，对醛固酮和血管紧张素 I 的峰面积进行统计，血管紧张素 I 和醛固酮 500 针的精密度均小于5.0%，如图2所示。

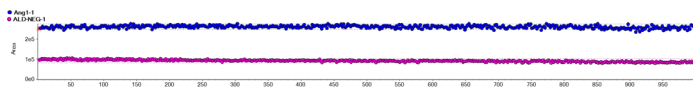


图2. 连续进样500针的血管紧张素 I 和醛固酮的峰面积变化图

总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了醛固酮和血管紧张素 I 同时检测。采用蛋白沉淀法对样本进行前处理，并加入同位素内标进行校准，对血浆中醛固酮和血管紧张素 I 进行定量。方法线性良好，加标回收率、精密度准确度均满足相关文件要求。可用于临床实际样本的检测。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15357-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: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)