

SCIEX LC-MS/MS测定人血浆中痕量血管紧张素II浓度

Determination of Trace Angiotensin II in Human Plasma by SCIEX LC-MS/MS

张卫卫, 林泽彬, 李国庆

Zhang Weiwei, Lin Zebin, Li Guoqing

SCIEX China Clinical BU

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

前言

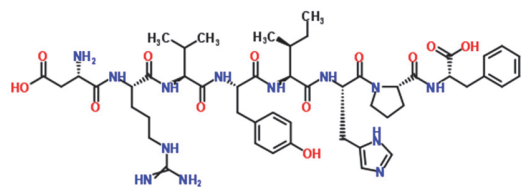
肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 是一个激素系统。当大量失血或血压下降时, 这个系统会被启动, 用以协助调节体内的长期血压与细胞外液量 (体液平衡)。当血压降低时, 肾脏分泌肾素。肾素催化血管紧张素原水解产生血管紧张素I (Angiotensin I, AngI)。AngI基本没有生物学活性, 而是经血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Emzyme, ACE)剪切C-末端两个氨基酸残基而形成血管紧张素II (Angiotensin II, Ang II)。AngII具有高效的收缩血管作用, 从而使血压升高, 血管紧张素II也能刺激肾上腺皮质分泌醛固酮。醛固酮能促进肾脏对水和钠离子的重吸收, 继而增加体液容量, 升高血压。检测血浆中AngI 和AngII 的含量, 可辅助原发性和继发性高血压分型诊断、治疗及研究。对一些有关肾脏疾病的诊断、治疗及发病机理的探讨有重要意义。

AngII在体内属于痕量化合物, 常用的分析方法为放射免疫法和液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。其中LC-MS/MS具有方法灵敏, 特异性好, 检测时间短, 适合较大通量样本的分析。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AngII浓度。

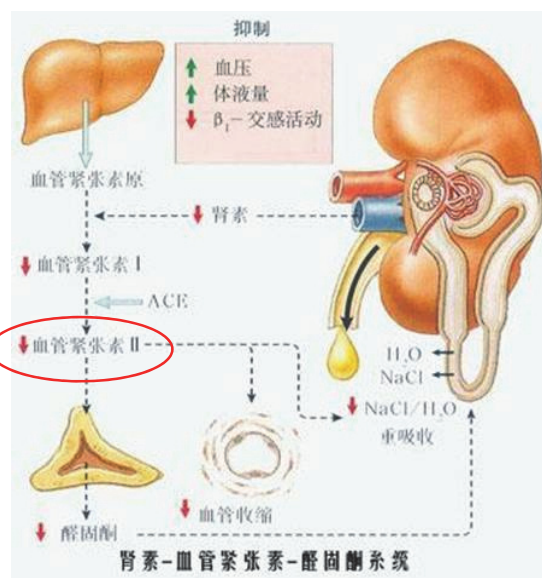
1 实验部分

1.1 血浆样品前处理

采血管加入10.8 mg EDTA, 采集4-5 ml血液, 离心后分离血浆, 取抗凝血浆250 μ L分别加入50 μ L generation buffer和300 μ L Ang II SIS内标工作液 (10%甲酸水溶解) 混匀后加载至预处理 (1mL 甲醇和1mL 5%甲酸水活化) 的SPE萃取板中进行固相提取, 提取过程中流速控制在5~10滴/min, 避免流速过快, 导致目标物严重损失。随后依次用1 mL 5%甲酸水和1 mL 20%甲醇淋洗, 最后采用100 μ L 甲醇洗脱并收集洗脱液。



血管紧张素 II 结构式



Generation Buffer: 分别取121.1 g Tris Base, 74 g EDTA, 加入900 mL去离子水后超声30 min直至完全溶解后再用去离子水定容至1000 mL。最后用冰醋酸调节pH 5.45-5.50。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18 3.0*100 mm, 2.6 μ m。流动相采用0.2%甲酸水和0.2% 甲酸甲醇, 柱温设定为55 $^{\circ}$ C。进样量为20 μ L。洗脱梯度表见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件。

时间 (min)	流速 (ml/min)	A (%)	B (%)
0.00	0.5	90	10
0.50	0.5	90	10
1.50	0.5	5	95
3.50	0.5	5	95
3.60	0.5	90	10
5.00	0.5	90	10

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50 psi和50 psi, 脱溶剂气温度为500 $^{\circ}$ C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为35 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. ESI+ 模式下MRM离子对监测通道。

化合物	离子对 Q1>Q3 (m/z)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (V)
AngII	523.8>263.2 ^a	100	30
	523.8>784.4 ^b	100	28
AngII-SIS	528.8>263.2 ^a	100	31
	528.8>794.4 ^b	100	28

注: ^a 定量离子对; ^b 定性离子对

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

采用以上前处理和仪器方法, 得到的标准曲线方程见表3。

表3. 回归方程和线性范围。

分析物	线性方程	相关系数r	权重	线性范围 (pg/mL)
Ang II	$y=0.00125x+0.00427$	0.997	1/x	11.25-1000

2.2 样本采集谱图

标准曲线样及实际人血浆样品中AngII离子流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)。

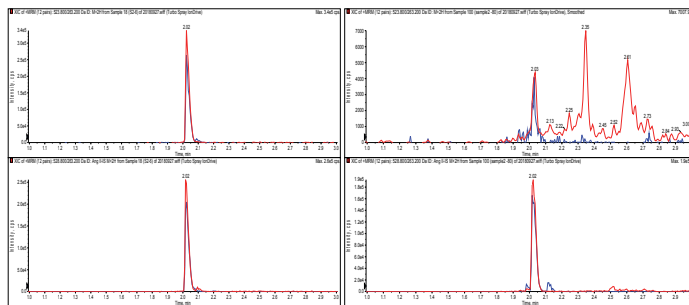


图1. 标准曲线样 (左侧) 及实际人血浆样品 (右侧) 中AngII色谱图。

2.3 性能验证参数

采用高中低三个浓度水平的质控品, 每个浓度平行测定21次, 得到批内精密性RSD在2.36%~7.51%范围内。高中低三个浓度水平质控品, 每个浓度平行测定7次, 连续测定3天, 得到批间精密性RSD在3.05%~8.77%之间。批内和批间精密性RSD均在10%以内 (见表4、5)。

表4. 批内精密性数据结果。

	低浓度 (n=21)	中浓度 (n=21)	高浓度 (n=21)
理论浓度 (pg/mL)	50	800	500
平均值 \bar{x} (pg/mL)	47.66	841.29	469.43
标准差 (SD)	3.58	19.83	23.41
相对标准偏差 (RSD)	7.51%	2.36%	4.99%

表5. 批间精密度数据结果。

	低浓度 (n=21)	中浓度 (n=21)	高浓度 (n=21)
理论浓度 (pg/mL)	50	800	500
平均值 \bar{x} (pg/mL)	47.77	839.45	466.15
标准差 (SD)	4.19	25.64	21.60
相对标准偏差 (RSD)	8.77%	3.05%	4.63%

在空白血浆中分别添加三个浓度水平的AngII，每个浓度平行测定7次，得到三个添加浓度的平均回收率在95.31%~105.16%范围内（见表6）。

表6. 加标回收率数据结果。

编号	未加标	加标1	加标2	加标3
1	0	45.7	814	477
2	0	53.8	821	428
3	0	44.4	841	477
4	0	47.6	849	494
5	0	42.4	870	490
6	0	50.2	865	480
7	0	49.5	829	440
平均值 \bar{x}	0	47.65	841.28	469.42
回收率 (RE)	-	95.31%	105.16%	104.31%

总结

AngII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。本方法采用高灵敏度、高特异性、高通量的LC-MS/MS液相色谱串联质谱系统对血管紧张素II进行精确定量检测。能够很好的排除内源性干扰，且灵敏度可达pg级，完全能满足实际检测需求。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9479-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：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
全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：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
网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835
微博：@SCIEX