

# SCIEX液相色谱串联质谱法通过直接蛋白沉淀测定人血浆中肾素活性、血管紧张素 II 和醛固酮

## Simultaneous Quantitation of Renin Activity, Aldosterone and Angiotensin II 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; Angiotensin II; Aldosterone; Protein Precipitation; LC-MS/MS

### 引言

原发性醛固酮增多症 (PA) 是继发性高血压的一种常见形式, 准确测定血浆肾素活性对于制定和维持一个有效的原发性醛固酮增多症 (PA) 筛查方案至关重要。另外, 肾素活性的测定也可用于肾动脉狭窄、矿物皮质激素过量综合征、先天性肾上腺增生等疾病以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 的遗传性缺陷的研究。肾素活性可以直接测定 (DRC) 也可以通过测定血浆 37°C 孵育时血管紧张素 (Ang I) 的生成速率 (PRA) 来表示; 然而 DRC 因不同方法或试剂所得的测定结果相差甚远, PRA 是目前肾素活性的主要表示方式。

根据中华医学会内分泌学分会发布的原发性醛固酮增多症诊疗治疗的专家共识, 推荐将血浆醛固酮与肾素活性比值 (ARR) 作为原醛症首选筛查指标, 除此之外, 血管紧张素 II (Ang II) 主要用于肾性高血压的鉴别诊断, 适用于原醛症、库欣综合征、血管紧张素转化酶抑制剂治疗等人群。所以同时检测 Ang I、Ang II 和醛固酮 (ALD) 的血浆含量, 对于鉴别诊断肾性高血压与原醛症所造成的高血压具有非常重要的临床意义。

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、血管紧张素 II 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表 1。

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 <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>
醛固酮-D <sub>8</sub> *	Aldosterone-D8	ALD-IS	1261254-31-2	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> D <sub>7</sub> O <sub>5</sub>
血管紧张素 I	Angiotensin I	Ang I	70937-97-2	C <sub>62</sub> H <sub>89</sub> N <sub>17</sub> O <sub>14</sub>
血管紧张素 I- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> *	Angiotensin I - [arginine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]	Ang I-IS	N/A	C <sub>56</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>89</sub> N <sub>13</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub>
血管紧张素 II	Angiotensin II	Ang II	4474-91-3	C <sub>50</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>
血管紧张素 II- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> *	Angiotensin II - [arginine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]	Ang II -IS	N/A	C <sub>44</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>71</sub> N <sub>9</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>

\*: 商品化内标标记位点不同, 请根据具体情况调整

## 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℃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。

### 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：20.00 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	80	20
0.3	80	20
0.6	50	50
1.0	45	55
1.5	45	55
2.00	40	60
3.00	0	100
3.80	0	100
3.90	80	20
5.00	80	20

### 质谱条件

质谱平台：SCIEX Triple Quad™ 6500

电离方式：电喷雾离子源，正负离子分段模式；

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；

使用分段扫描的模式，正离子运行2.8分钟，负离子模式运行2.2分钟，对应MRM通道及参数见表3。

## 结果与讨论

本分析方法总运行时长为5min，采用分段扫描的模式，血管紧张素 I 和血管紧张素 II 采用正离子扫描模式，醛固酮采用负离子扫描模式。血管紧张素 I、血管紧张素 II 和醛固酮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。

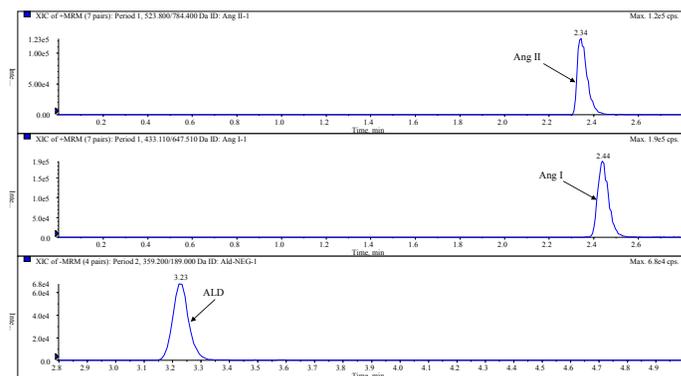


图1. 血管紧张素 I、血管紧张素 II 和醛固酮典型液相色谱图

### 标准曲线

以BSA溶液为替代基质，配制标准工作曲线，各化合物曲线范围的设定参考临床上医学决定点的需求，血管紧张素 I 的线性范围为0.300-100 ng/mL、血管紧张素 II 和醛固酮的线性范围相同，均为0.015-5.00 ng/mL。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。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数（正负离子分段扫描的模式）

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE	Dwell Time
<b>Period1</b>		<b>2.8min</b>				
血管紧张素I	Angiotensin I	433.1	647.5*	130	13	50
		433.1	619.4	130	15	50
血管紧张素I- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub>	Angiotensin I- [arginine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]	436.4	657.5	130	27	50
		436.4	629.4	130	27	50
血管紧张素 II	Angiotensin II	523.8	784.4*	100	28	50
		523.8	263.2	100	30	50
血管紧张素 II - <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub>	Angiotensin II - [arginine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ]	528.8	263.2	100	31	50
<b>Period2</b>		<b>2.2min</b>				
醛固酮	Aldosterone	359.1	189.1*	-100	-24	150
		359.1	331.1	-100	-21	150
醛固酮-D8	Aldosterone-D8	367.2	194.0	-110	-27	150
		367.2	339.3	-110	-25	150

\*: 为定量离子对

表4. 血管紧张素 I、血管紧张素 II 和醛固酮的标准曲线

化合物	斜率	截距	r <sup>2</sup>	LLOQ ng/mL	ULOQ ng/mL	拟合方程
Ang I	0.611	4.9E-003	0.9978	0.300	100	Y=0.611X+4.9E-003
Ang II	6.61E-004	2.2E-003	0.9976	0.015	5.00	Y=6.11E-004X+2.2E-003
ALD	8.1E-005	7.22E-004	0.9981	0.015	5.00	Y=8.1E-005X+7.22E-004

### 实际血浆样本检测

在临床上收集多个血浆样本进行本方案的测试，并且与原有的固相萃取法的样本预处理方法作了比较。同一批血浆样本使用本方案中的蛋白沉淀法与固相萃取法相比测得的三个化合物浓度的偏差均在15%的范围内。这也证明此方案在临床上是可以替代固相萃取法作为样本前处理的方法，且在样本处理中更加节省时间，操作更便捷，也可以节省大量的耗材，降低检测的成本。实际血浆样本中的化合物典型色谱图如图2所示。

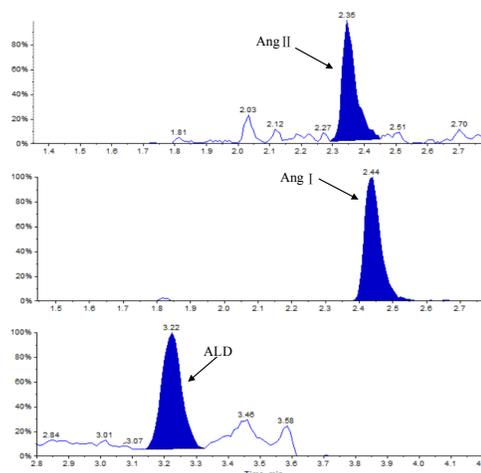


图2. 实际血浆样本中血管紧张素 I、血管紧张素 II 和醛固酮典型色谱图

## 总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了血管紧张素 I、血管紧张素 II 和醛固酮的同时检测，克服了实际血浆样本中的干扰峰带来的挑战，同时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、血管紧张素 I 和血管紧张素 II 进行定量，节约了实验成本，提高了样本检测通量。方法线性良好，满足临床实际样本的检测需求。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15356-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](http://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](#)