

使用Immundiagnostik铁调素-25 LC-MS/MS试剂盒(Ruo)定量血浆中铁调素的临床研究方法

Davor Fielitz, Fabian Simon, Anne Arnold, Max Diesner, Stefanie Wernisch

Waters Corporation, Immundiagnostik AG

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

由于血浆中的小分子肽铁调素含有多个分子内二硫键、容易发生非特异性吸附且具有多个电荷态，通过LC-MS/MS法定量存在挑战。

本应用纪要介绍了一种测量柠檬酸盐血浆中低浓度铁调素的临床研究方法。样品前处理很简单，利用Immundiagnostik的铁调素-25 LC-MS/MS试剂盒(RUO)中提供的试剂结合Waters™ OASIS™ HLB 96孔板完成。LC-MS/MS分析在ACQUITY™ UPLC™ I-Class流通针式(FTN)系统上进行，该系统与Xevo™ TQ-S micro串联四极杆质谱仪联用并在ESI正离子模式下运行。

该方法可以定量血浆中的铁调素，线性表现良好($R^2 > 0.99$)，精密度高($CV < 10\%$)。分析4+和5+电荷态测得的准确度分别为95%和98%。基于最低浓度标曲溶液的信噪比外推测得检测限低于2 ng/mL。

优势

- Immundiagnostik铁调素-25 LC-MS/MS试剂盒(RUO)可用于简单的样品前处理和LC-MS/MS设置

- Waters OASIS HLB μ Elution提取板和QuanRecovery™收集板可大幅减少吸附损失并促进铁调素的低浓度定量
- Waters ACQUITY I-Class UPLC (FTN)和TQ-S micro质谱仪能够以出色的精密度和准确度定量血浆中的铁调素

简介

铁调素(Hepcidin)是一种富含半胱氨酸的小分子信号肽，由25个氨基酸组成并含有四个内部二硫键。它首先从人尿液中分离出来，并以合成部位肝脏(hep-)及其体外抗菌特性(-cidin)命名¹。铁调素参与哺乳动物的铁代谢²⁻⁴。

在测量血浆中铁调素的临床研究中，可以还原二硫键。由于存在许多带电位点，完整肽仍然易于在带电表面上发生非特异性吸附，尤其是在低浓度时。在本应用纪要中，我们展示了具有低结合表面的消耗品对于获得稳定结果的实用性。固相萃取可去除样品中潜在的基质干扰，并为稳定的色谱程序奠定基础。优化质谱参数，包括选择要监测的母离子电荷态和碎片离子，有利于在低ng/mL范围内定量柠檬酸盐血浆中的低浓度铁调素。

实验

Immundiagnostik铁调素-25 LC-MS/MS试剂盒（Immundiagnostik部件号KM4000 RUO）按照使用说明书(IFU)进行样品前处理和LC分离设置。其中包含所需的试剂和溶液：流动相A和B、内标、活化溶液、样品缓冲液、清洗溶液1和2、洗脱缓冲液以及稀释和复溶溶液。

根据Immundiagnostik 25-铁调素LC-MS/MS试剂盒手册，临分析前激活流动相、样品缓冲液、清洗溶液2以及稀释和洗脱溶液。为避免蛋白质-表面相互作用，使用Sørensen低结合吸头（Sigma-Aldrich，部件号：Z719579-1000EA）和15 mL Protein LoBind管（Eppendorf，部件号：0030122216）处理样品。

样品描述

Immundiagnostik的铁调素-25 LC-MS/MS试剂盒中提供了六个浓度水平的标曲溶液(CAL 1–6)和三个浓度水平的质量控制样品(QC 1–3)。Immundiagnostik还提供了19份柠檬酸盐血浆样品。

使用正压萃取装置和QuanRecovery收集板，在OASIS HLB μ Elution 96孔板上按照简单的固相萃取(SPE)方案（见下文）进行样品前处理。分析物的色谱分离需要5.5分钟。在MRM（多反应监测）模式下通过四倍或五倍电荷

态以及相应的特征碎片离子定量多肽。

固相萃取：在进行SPE之前，将柠檬酸盐血浆样品以13,400 rpm的转速离心5分钟。用200 µL甲醇清洗并用200 µL水(Milli-Q Ultrapure)平衡µElution提取板。向每个孔中加入200 µL样品、CAL或CTRL，并加入200 µL内标。分别用200 µL清洗液1、清洗液2和清洗液1清洗µElution提取版。安装QuanRecovery收集板后，使用2 x 25 µL洗脱液洗脱样品。SPE洗脱液用稀释液按1:2稀释。UPLC进样体积为20 µL。

液相色谱条件

液相色谱系统：	带柱温箱(CH)的ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
进样针：	10 µL标准进样针和50 µL扩充定量环
色谱柱：	XSelect™ CSH C ₁₈ , 3.5 µm, 2.1 x 100 mm
保护柱：	XSelect CSH C ₁₈ VanGuard™柱芯, 130 Å, 3.5 µm, 2.1 mm x 5 mm
柱温：	50°C
进样体积：	20 µL
流速：	0.4 mL/min
流动相	Immundiagnostik (专有)
梯度：	15–98% B

质谱条件

MS系统：	Xevo TQ-S micro
MS模式（分辨率）：	MS1和MS2 (0.75 FWHM)

采集模式：	多反应监测(MRM)
电离模式：	ESI+
离子源温度：	150°C
脱溶剂气温度：	650 °C
脱溶剂气流速：	1200 L/h
锥孔气流速：	0 L/h
锥孔电压：	见表1
碰撞能量：	见表1

数据管理

质谱软件：	带TargetLynx™ XS的MassLynx™ 4.2
-------	-------------------------------

结果与讨论

利用IntelliStart™优化MS母离子

试剂盒手册建议，采用来自四倍电荷态的铁调素母离子 $[M+4H]^{4+}$ 的 $698 > 354$ （定量离子通道）和 $698 > 1040$ （定性离子通道）离子对进行铁调素分析。但是，MassLynx中的自动IntelliStart™样品调谐功能发现 $[M+5H]^{5+}$ 母离子的离子强度更高。IntelliStart™重新调整了质量数位置、锥孔电压和碰撞能量。

本实验记录并比较了母离子信号及其相应的MRM离子对。对于4+电荷态， $698 > 1040$ 和 $698 > 354$ 离子对产生了几乎相等的信号强度，但前者产生的噪音值略低。由于低噪音水平在低丰度情况下可能至关重要，因此我们偏离了

Immundiagnostik建议的测试方案，指定698 > 1040离子对为定量离子通道，指定698 > 354离子对为定性离子通道。

线性

校准范围为3.5–132.7 ng/mL。每个校准水平制备两个独立样品，每个样品重复测量两次（总共四次重复），确定方法的线性。 $[M+4H]^4+$ 物质的相关系数(R^2)高于0.993（图1）， $[M+5H]^5+$ 物质的相关系数(R^2)高于0.990（图2）。每个单独测量点的变化都低于15%，因此在可接受标准内。

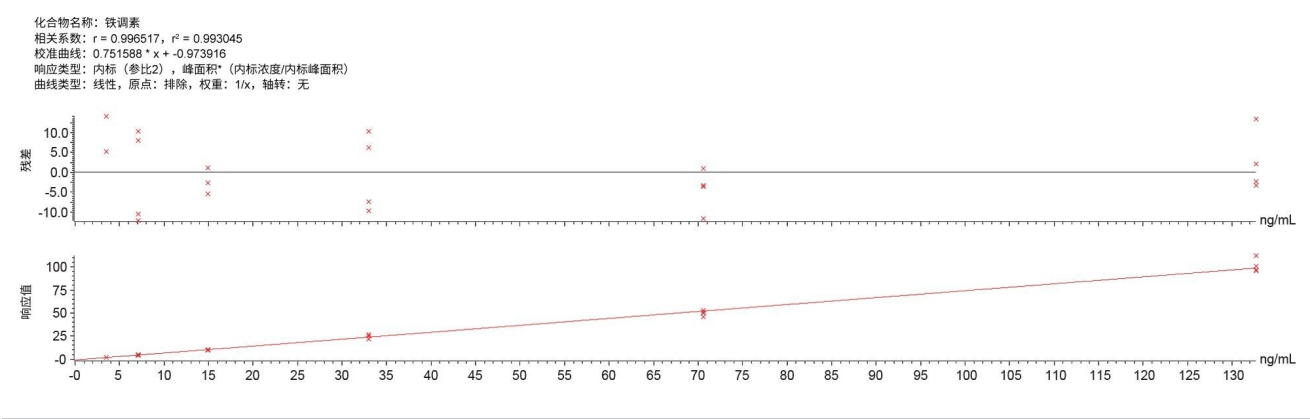


图1：铁调素4+ (698.2>1040.1)的校准曲线和残差图。

精密度

每个QC浓度（低、中、高）测定八次来确定批次内精密度。对于所有三个QC浓度，使用两个不同的QC样品（不同的样品容器；相同的材料批次）制备两个重复样。每个样品进样两次，每个水平进样八次。结果用表2中的变异系数(CV)表示。

准确度

通过提取和定量所有QC样品中的铁调素浓度来确定准确度。将计算的样品浓度与Immundiagnostik在试剂盒IFU中提供的设定值进行比较。所有QC样品与预期值的偏差小于15%，均在可接受标准范围内（表3）。

	准确度[%]			
	低浓度QC	中浓度QC	高浓度QC	总体
铁调素4+	98.8 ± 8.5	98.8 ± 8.5	98.8 ± 8.5	98.8 ± 8.5
铁调素5+	98.1 ± 6.9	98.1 ± 6.9	98.1 ± 6.9	98.1 ± 6.9

表3：三个QC浓度的准确度（按每个浓度水平八次进样的平均值估算）和总体准确度。

分析灵敏度和选择性

铁调素估计浓度为2.9 ng/ml的血浆样品的色谱图如图3a和3b所示。即使在低浓度水平下，定量离子对698 > 1040（铁调素4+，3a）和559 > 354（铁调素5+，3b）也能使血浆中的内源性铁调素实现可重现的峰积分和定量。使用这两种方法，在低浓度水平下也可以检测到定性迹线，且离子丰度比（定量离子:定性离子）始终符合可接受标准。

通过计算最低浓度校准点(CAL 1)的信噪比(S/N)并外推到10:1的S/N值来确定定量限(LOQ)。铁调素4+和铁调素5+的LOQ分别估计为1.4 ng/mL和1.8 ng/mL。Immundiagnostik的铁调素试剂盒中现在提供了一个更低浓度水平的CAL 1（LOQ为1.9 ng/mL），但在进行本实验时尚不可用。

定量离子对比较（铁调素4+与铁调素5+）

用于血浆中铁调素定量的两个离子对在精密度、准确度、LOQ和线性方面显示出相似的结果。存在两种电荷态，并且在误差范围内具有相同的结果，两者都可以正常使用，不会影响性能。

柠檬酸盐血浆样品的分析/方法比较

Immundiagnostik AG提供了19份血浆样品（每份700 µL）用于定量。每个样品根据测试程序制备三次。每次单独制备的样品进样一次。使用试剂盒IFU中描述的原始方法，将铁调素4+和铁调素5+的定量结果与Immundiagnostik AG获得的结果进行了比较（见图4）。

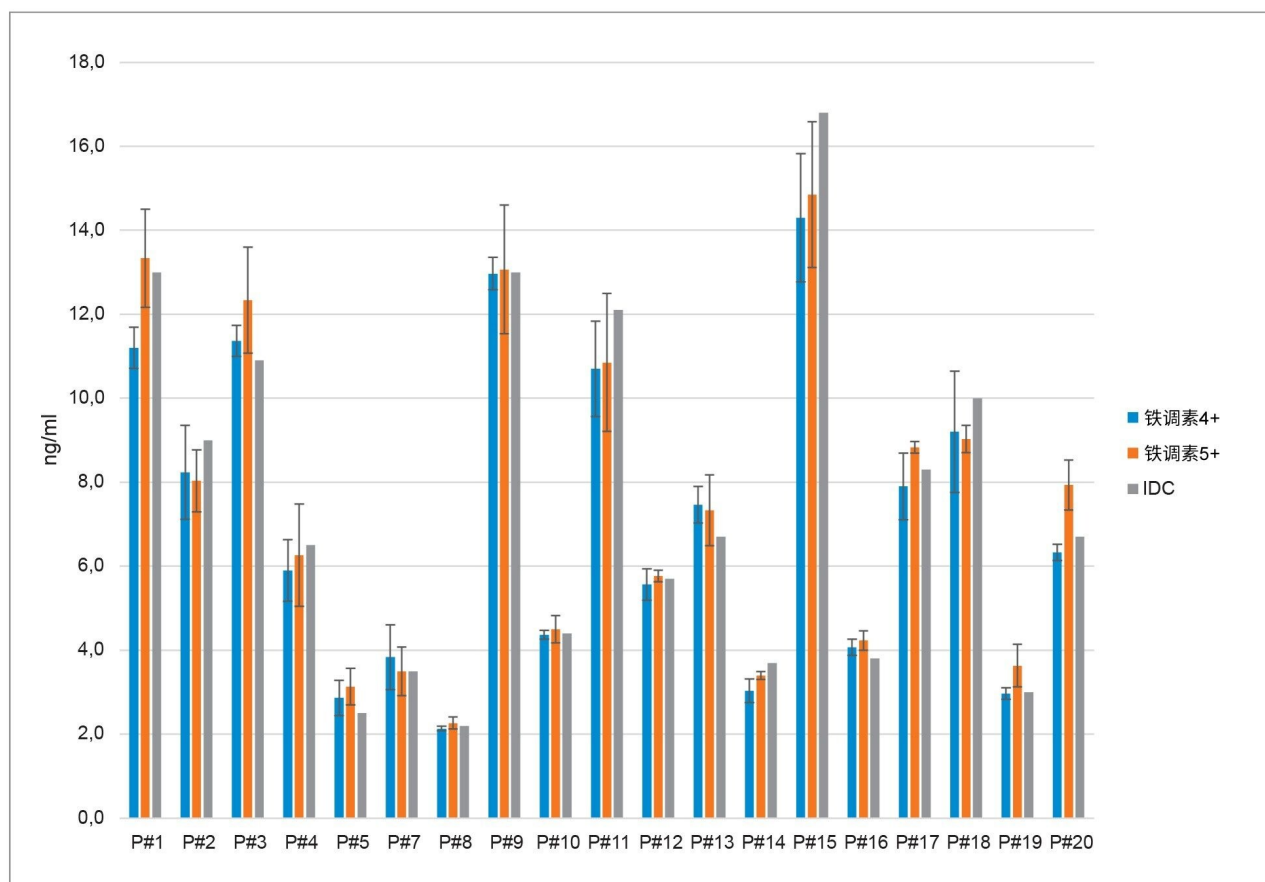


图4：19份不同样品的铁调素4+（蓝色）、铁调素5+（橙色）的血浆浓度计算值和95%置信区间与 Immundiagnostik对照值（IDC；灰色）相比较。

Bland-Altman分析显示，铁调素4+和铁调素5+的计算浓度与Immundiagnostik AG提供的原始方法相比，结果非常匹配。铁调素4+和5+的计算浓度与原始方法得出的结果相比，平均偏差分别为-0.4和0.03（图5）。

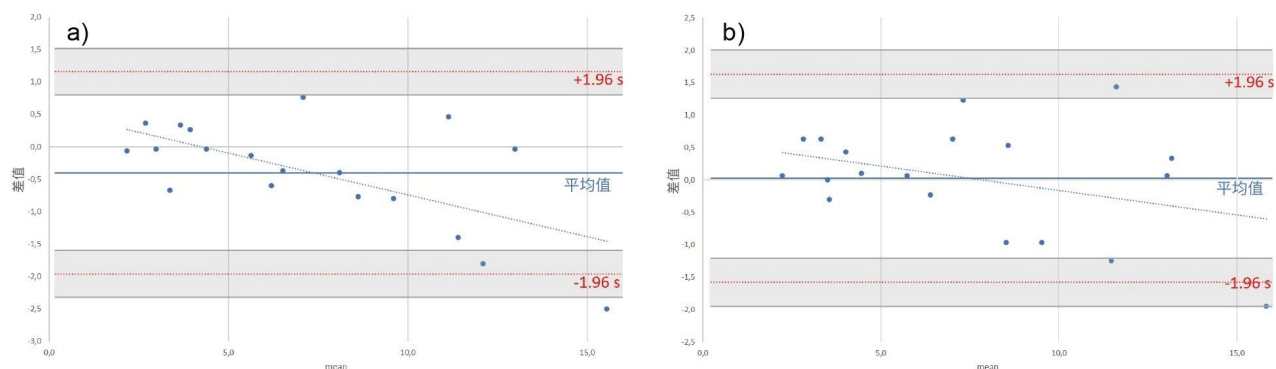


图5: Bland-Altman分析, 对比了使用铁调素4+ (5a)和5+ (5b)离子对开发的方法与Immundiagnostik描述的现有方法。

本研究开发的LC-MS/MS铁调素分析和定量方法显示出良好的线性($r^2 > 0.99$)、精密度($CV < 10\%$)和准确度(铁调素4+为 $95 \pm 7\%$; 铁调素5+为 $98 \pm 7\%$)。两种电荷态及其相应的MRM离子对均可用于准确定量。与原始结果相比, 柠檬酸盐血浆样品的定量分析结果均未超过一致限。

结论

本研究证明, Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro系统能够使用Immundiagnostik铁调素-25 LC-MS/MS RUO试剂盒高灵敏度、高选择性地分析铁调素, 而且具有优异的精密度和准确度。

参考资料

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240030/>.
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855274/>.
3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01294/full>.
4. <https://www.haematologica.org/article/view/9512>.

特色产品

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007796ZH, 2022年12月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)