

在临床研究中使用Xevo™ TQ Absolute质谱仪同时分析醛固酮和血浆肾素活性的LC-MS/MS方法

Dominic Foley, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在维持血压体内平衡方面起着重要作用，该系统可通过盐皮质激素类固醇激素醛固酮的作用增加血容量，或通过激活肾素-血管紧张素通路增加血管收缩作用。通过分析醛固酮和血浆肾素（或称血浆肾素活性(PRA)，用于衡量血管紧张素I的生成速率）来评估RAAS的状态，尤其是在临床研究中评价新疗法时。

过去，醛固酮和血浆肾素活性的评估是使用免疫分析方法单独进行的，而最近开始使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)平台。在临床研究中使用LC-MS/MS的优势之一是，能够使用同一系统甚至在同一分析中测定蛋白质组和代谢组中的多种分析物，从而在更短的时间内以更低成本提供更多信息。本研究评估了在临床研究中联合测定血浆醛固酮和肾素活性的单一LC-MS/MS方法。

优势

- 仅用一种方法即可测定醛固酮和血浆肾素活性，大幅缩短分析时间和减少成本

- 所用方法对醛固酮和血浆肾素活性分析具有优异的灵敏度
- 实验所采用的萃取方法适合使用移液机器人实现自动化

简介

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在维持血压体内平衡方面起着重要作用，该系统可通过盐皮质激素类固醇激素醛固酮的作用增加血容量，或通过激活肾素-血管紧张素通路增加血管收缩作用。通过分析醛固酮和血浆肾素（或称血浆肾素活性，用于衡量血管紧张素I的生成速率）来评估RAAS的状态，尤其是在临床研究中评价新疗法时。

醛固酮和血浆肾素（或称血浆肾素活性）的分析历来采用单独的方法，通常使用配体结合技术。最近，LC-MS/MS已成为一种受到追捧的类固醇分析技术，该方法已被证实，在提供相似水平分析灵敏度的同时，还能够克服配体结合方法所存在的局限性。在临床研究中使用LC-MS/MS的优势之一是，能够使用同一系统甚至在同一分析中测定蛋白质组和代谢组中的多种分析物，从而在更短的时间内以更低成本提供更多信息。我们使用Oasis™ MAX 96孔μElution板和配备Xevo™ TQ Absolute质谱仪的ACQUITY UPLC I-Class FL系统开发出一种方法，可以萃取和分析类固醇激素醛固酮以及肽血管紧张素I，从而评估RAAS在临床研究中的状态。



图1. Waters Xevo TQ Absolute质谱仪

实验

使用含2% (w/v)牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)制备醛固酮和血管紧张素I（血浆肾素活性）的标曲溶液，浓度范围分别为28 – 6940 pmol/L和0.23–58 nmol/L (0.08–19 nmol/L/h)。使用含2% (w/v) BSA的PBS制备

醛固酮和血管紧张素I（血浆肾素活性）的多组内部质控品(QC)，并使用混合人血浆(BioIVT, UK)制备醛固酮质控品。购买Lyphochek高血压标志物质控品（Bio-Rad，英国沃特福德）来评估血浆肾素活性的精密度。

醛固酮的数据除以2.774（ pmol/L 转换为 pg/mL ），血管紧张素I的数据除以0.771（ nmol/L 转换为 ng/mL ），可将SI单位转换为传统的质量单位。

快速解冻样品，尽量避免血浆肾素原冷冻活化为肾素。样品临用前充分混合并离心。

血管紧张素I的生成：取125 μL 血浆，用新制的缓冲液按1:1的比例稀释。将样品密封、混合，并在37 °C下温育3 h。加入内标(SIL)，然后加入1% (w/v)氨水溶液。

醛固酮和血管紧张素I的固相萃取：分别使用甲醇和1% (w/v)氨水溶液活化和平衡Oasis MAX $\mu\text{Elution}$ 板。取650 μL 上清液上样至SPE板。用1% (w/v)氨水的20%甲醇水溶液清洗样品。用30%乙腈水溶液将醛固酮洗脱到1 mL 96孔收集板中，然后用0.5% (v/v)甲酸的5%乙腈水溶液将血管紧张素I洗脱到同一收集板中。将样品密封、混合并离心，然后进样至LC-MS/MS系统。

LC-MS/MS分析：使用ACQUITY UPLC I-Class FI系统在部分定量环模式下进样。使用XBridge™ Premier BEH C₁₈, 130 Å, 2.5 μm , 2.1 x 50 mm肽分析专用柱，以0.2 mM氟化铵水溶液和乙腈作为流动相，在3.2分钟的运行时间内分离醛固酮和血管紧张素I。利用Xevo TQ Absolute质谱仪在MRM模式下的极性切换检测醛固酮(ESI-)、血管紧张素I (ESI+)及其各自的内标。

结果与讨论

使用XBridge Premier BEH C₁₈肽分析专用柱进行色谱分离，醛固酮和血管紧张素I在进样后2分钟内洗脱（图2）。

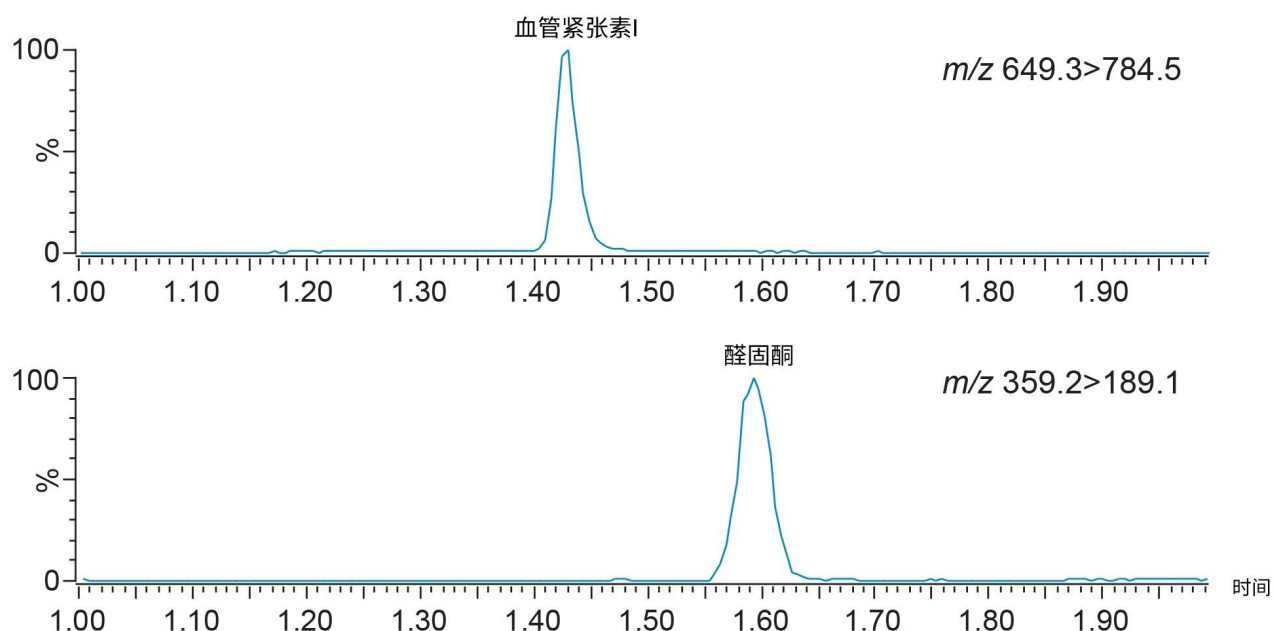


图2.使用XBridge Premier BEH C_{18} 肽分析专用柱分离醛固酮和血管紧张素I

分析高浓度样品之后，在后续的空白进样中未观察到明显的系统残留污染（小于最低浓度校准品的20%）。使用2% (w/v) BSA的PBS溶液按1:5稀释样品，成功分析了25,700 pmol/L和73 nmol/L/h的高浓度醛固酮和血浆肾素活性样品，平均准确度分别为93%和94%。

单独检测具有相似极性的其他结构相关化合物以及其他高丰度内源性化合物时，在醛固酮和血管紧张素I的保留时间处未观察到明显干扰物（回收率偏差在 $\pm 15\%$ 范围内）。

将含有2% BSA的PBS作为替代基质，使用此替代基质制备醛固酮和血管紧张素I在线性范围浓度以下的加标样品（每个浓度水平 $n=30$ ）并独立测定3次，以此评估分析方法的灵敏度。该方法可精确定量28 pmol/L浓度的醛固酮和0.08 nmol/L/h浓度的血浆肾素活性（ $RSD < 20\%$ ， $S/N(PtP) > 10:1$ ）。

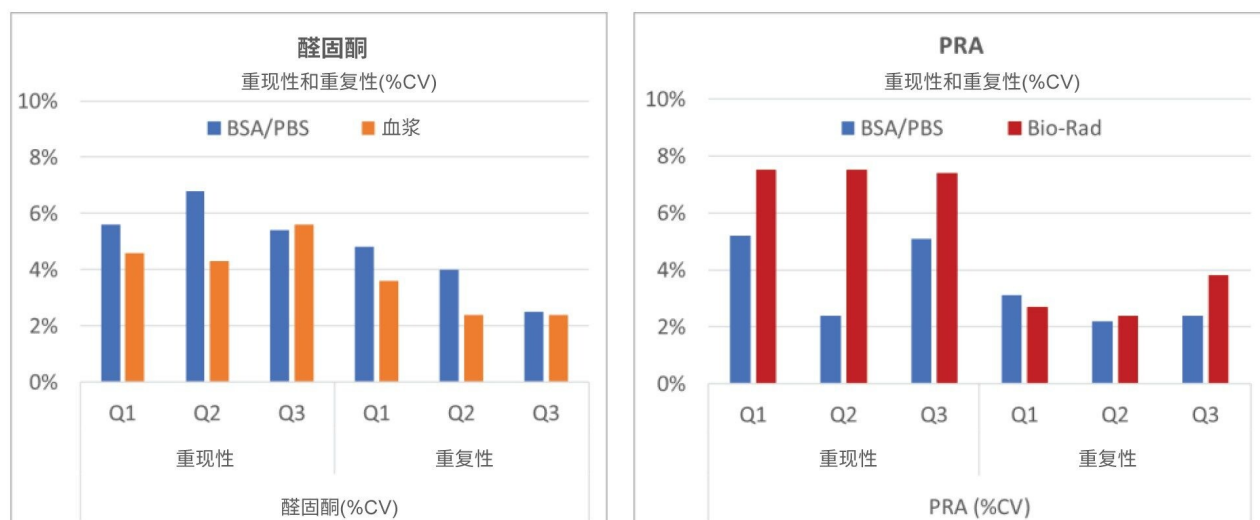


图3.用含2% (w/v) BSA的PBS和人血浆（仅用于制备PRA的Bio-Rad质控品）制备的醛固酮和血浆肾素活性质控品的分析重现性和重复性。

我们对三个浓度的质控品每天进行五次萃取和定量分析（每个浓度五个重复样， $n=25$ ），以此确定该方法的重现性和重复性。用含2% (w/v) BSA的PBS制备的83、833和5553 pmol/L醛固酮质控品以及0.23、2.3和15.4 nmol/L/h血浆肾素活性质控品的重现性和重复性均为 $CV \leq 6.8\%$ 。用人血浆制备的133、963和5450 pmol/L醛固酮质控品的重现性和重复性均为 $CV \leq 5.6\%$ 。2.0、5.7和12.7 nmol/L/h血浆肾素活性Bio-Rad质控品的重现性和重复性均为 $CV \leq 7.5\%$ （图3）。

将高浓度和低浓度分析样品按不同比例混合，所得样品的分析结果表明，各分析物在如下的浓度范围内呈线性：醛固酮：22–8328 pmol/L，血管紧张素I（血浆肾素活性）：0.18–70 nmol/L (0.06–23 nmol/L/h)。此外，在所有分析中，使用含有2% (w/v) BSA的PBS制备的质控品绘制的校准曲线均呈线性，且确定系数(r^2) > 0.995。

使用单个供体血浆样品研究了醛固酮的基质效应。基于分析物:内标响应比率计算归一化的基质因子，结果表明内标可以补偿观察到的所有离子抑制效应，醛固酮的基质因子范围为89%~99%，血浆肾素活性的基质因子范围为96%~105%。

通过分析英国NEQAS的39个醛固酮EQA样品评估本方法结果与EQA方案平均LC-MS结果的一致性，并通过Deming拟合和Altman-Bland一致性分析评估数据。Deming拟合的一致性为 $y=0.93x+2.14$ ，Altman-Bland一致性分析的平均方法偏差为-6.1%，表明醛固酮的分析结果与EQA LC-MS平均值具有良好的一致性（图4a–b）。

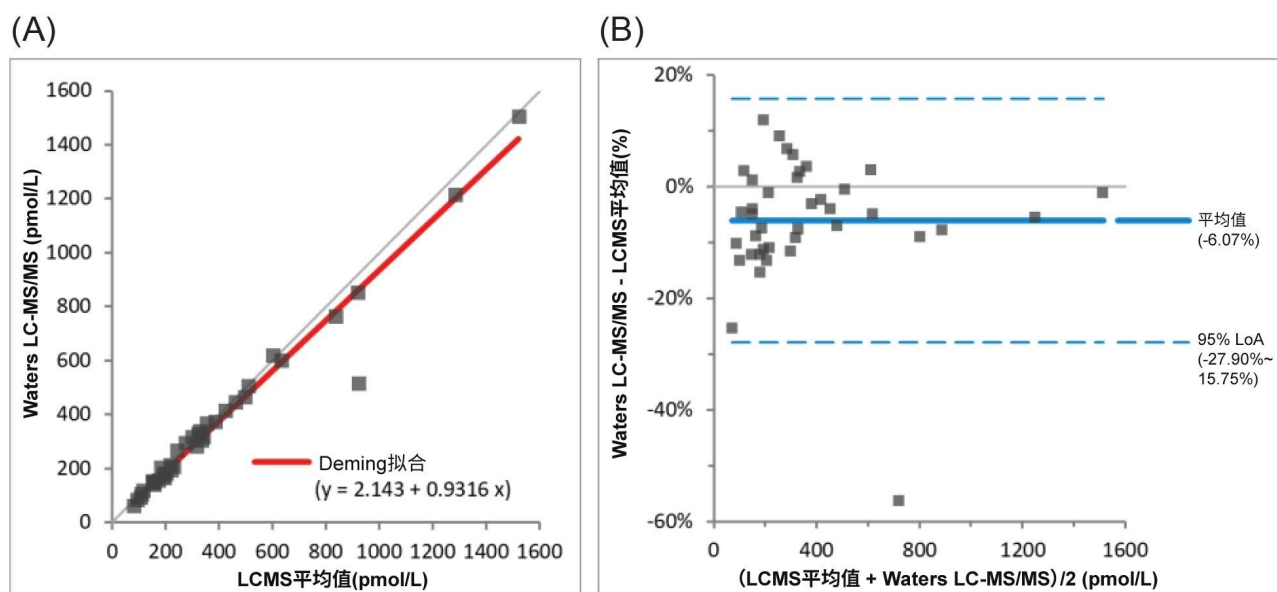


图4.使用(a) Deming拟合和(b) Altman-Bland一致性分析比较Waters LC-MS/MS方法和EQA方案MS方法分析醛固酮的平均值。

使用相同的样品，将过去分析醛固酮和血浆肾素活性所采用的两种单独的LC-MS/MS方法与本文所述方法进行比较。58个醛固酮样品比较得到的Passing-Bablok拟合为 $y = 0.96x - 2.49$ ，Altman-Bland一致性平均方法偏差为-6.0%（图5a-b）。61个血浆肾素活性样品比较得到的Passing-Bablok拟合为 $y = 1.27x - 0.02$ ，Altman-Bland一致性平均方法偏差为21.4%（图5c-d）。

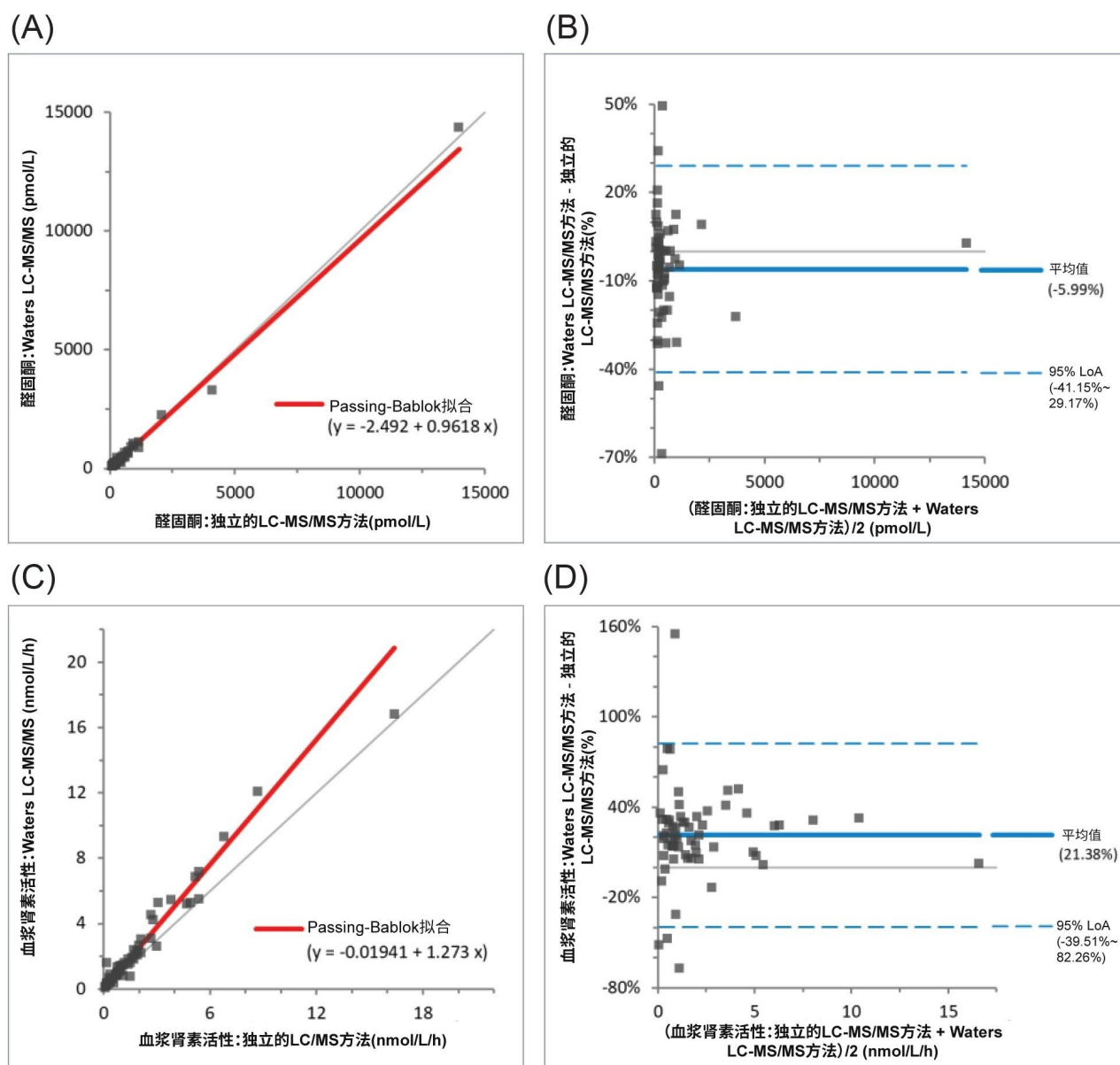


图5.使用(a) *Passing-Bablok*拟合和(b) *Altman-Bland*一致性分析比较Waters LC-MS/MS方法与醛固酮LC-MS/MS独立分析方法；使用(c) *Passing-Bablok*拟合和(d) *Altman-Bland*一致性分析比较Waters LC-MS/MS方法与血浆肾素活性LC-MS/MS独立分析方法。

Xevo TQ Absolute质谱仪的一项新优势是能够使用氩气或氮气作为碰撞气体。使用不同气体对一组样品进行直接比较，得到了相似水平的分析灵敏度。此外，使用氮气时，比较28个醛固酮血浆样品得到的Deming拟合为

$y=0.90x+7.87$ ，Altman-Bland平均方法偏差为-8.2%。使用氮气时，比较34个PRA血浆样品得到的Deming拟合为 $y=0.94x+0.09$ ，Altman-Bland平均方法偏差为1.7%。

结论

本研究为使用Xevo TQ Absolute质谱仪分析醛固酮和血浆肾素活性开发了一种高灵敏度、高选择性的临床研究方法。

Xevo TQ Absolute质谱仪仅使用125 μ L样品即可同时分析生理浓度水平的醛固酮和血浆肾素活性，浓度分别为28 pmol/L和0.8 nmol/L/h。该方法在校准范围内表现出良好的精密度。醛固酮EQA样品的评估结果表明，该方法与EQA方案LC-MS平均值的一致性非常好，与醛固酮和血浆肾素活性的独立分析方法相比，也表现出良好的一致性。此外，还证明使用氩气和氮气作为碰撞气体的性能相当，这让实验室在安装Xevo TQ Absolute质谱仪分析醛固酮和血浆肾素活性时拥有了额外的选择。

致谢

由衷感谢曼彻斯特大学NHS基金会信托团队提供匿名血浆样本用于LC-MS/MS方法比较。

特色产品

MassTrak ACQUITY UPLC I-Class PLUS/Xevo TQ Absolute IVD系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/masstrak-acquity-uplc-i-class-plus-xevo-tq-absolute-ivd-system.html>>

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

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

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

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007901ZH, 2023年3月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

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

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