

LCMS-8050 CL 同时测定血清中血管紧张素 I、II

LCMSMS-469

摘要： 本文利用岛津临床用 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统建立了人血清中血管紧张素 I、II 同时分析的方法。该方法采用内标法定量，线性相关系数在 0.998 以上；人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，加标回收率在 99.2~107.5% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词： LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统 血清 血管紧张素

肾素 - 血管紧张素系统 (RAS) 是人体调节血压的重要的内分泌系统，由一系列激素及相应的酶所组成，在调节水、电解质平衡以及血容量、血管张力和血压方面具有重要作用。肾素是由肾脏近球体分泌分子量为 40000 的一种羧基蛋白水解酶，它作用于血管紧张素原产生血管紧张素 I (Ang I)，血管紧张素 I 本身无生理活性，在血管紧张素转换酶的作用下水解为有活性的血管紧张素 II (Ang II)，血管紧张素 II 可引起小动脉血管收缩，促进肾上腺皮质合成和分泌醛固酮。

血浆肾素活性 (PRA) 和 Ang II 的检测已成为肾性高血压、内分泌型高血压的诊断所必需，也是高肾素低血容量型高血压、低肾素高血容量型高血压、正

常肾素正常血容量型高血压分类的依据。血浆肾素活性 (PRA) 的测定多以血管紧张素 I 的产生速率来间接反映，血管紧张素 II 可直接测定。目前检测血管紧张素 I、II 的方法大多采用免疫法或者采用高效液相色谱法与酶联免疫相结合，但此类方法制备抗体复杂，特异性较差。液相色谱串联质谱法具有比较高的灵敏度及特异性，样品前处理简单，检测结果更加准确可靠。

本文采用岛津临床用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中血管紧张素 I、II 同时分析的方法，该方法灵敏度高、分析速度快，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 输液泵， DGU-20A5 CL 在线脱气机， SIL-30ACMP CL 自动进样器， CTO-30A CL 柱温箱， CBM-20A CL 系统控制器， LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪， LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱： Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm, Shimadzu SGLC P/N: 227-31014-05)

流动相： A 相 -0.5% 乙酸水； B 相 - 乙腈

流速： 0.4 mL/min

柱温： 40°C

进样量： 20 μL

洗脱方式： 梯度洗脱， B 相初始浓度为 10%， 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.05	泵	B.Conc	10
2.00	泵	B.Conc	30
3.00	泵	B.Conc	98
5.00	泵	B.Conc	98
5.01	泵	B.Conc	10
7.00	控制器	Stop	

LCMS-8050 CL 质谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3 L/min

DL 温度: 200°C

接口温度: 300°C

MRM 参数: 见表 2

接口电压: 1.0 kV

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 10.0 L/min

加热气流量: 10.0 L/min

表 2 MRM 参数

中文名	简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
血管紧张素 I	Ang I	432.9	110.1*	-10	-29	-12
			647.3	-23	-18	-36
血管紧张素 I- 内标	Ang I-IS	435.1	110.1*	-10	-29	-12
			654.3	-16	-19	-34
血管紧张素 II	Ang II	523.8	263.2*	-28	-22	-28
			784.3	-26	-20	-22
血管紧张素 II- 内标	Ang II -IS	527.3	791.3*	-26	-21	-24
			263.2	-28	-22	-13

注: * 表示定量离子

1.3 标准曲线的配置

称取 1.0 g BSA 溶于 50 mL PBS, 配制 2% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液, 用于配制标准工作曲线。取血管紧张素 I、II 标准贮备液, 用 2% BSA 溶液做溶剂逐级稀释为 20、40、80、200、500、1250 pg/mL 的标准系列工作溶液。

1.4 样品前处理方法

血清样品预处理: 取血清样品, 按每 1 mL 血清样品加入 10 μ L 8- 羟基喹啉 (0.32 mol/L), 涡旋混匀静置 30 min。

取 150 μ L 标准样品或预处理后的血清样品, 加入 50 μ L 内标工作液 (1 ng/mL), 再加入 450 μ L 1% 氨水, 涡旋混匀; 取 600 μ L 上述处理后的溶液至已活化好的 MAX 型 96 孔固相萃取板中 (固相萃取板经 150 μ L 乙腈活化后再经 150 μ L 1% 氨水平衡); 使用正压装置将液体全部压下, 下接废液收集板, 弃去废液; 使用 100 μ L 含 1% 氨水的 10% 乙腈溶液洗涤固相萃取板 2 次并压干; 换用全新低吸附 96 孔接收板, 使用 45 μ L 含 1% 甲酸的 10% 乙腈溶液洗脱固相萃取板 2 次, 将洗脱液转至低吸附进样小瓶中, 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

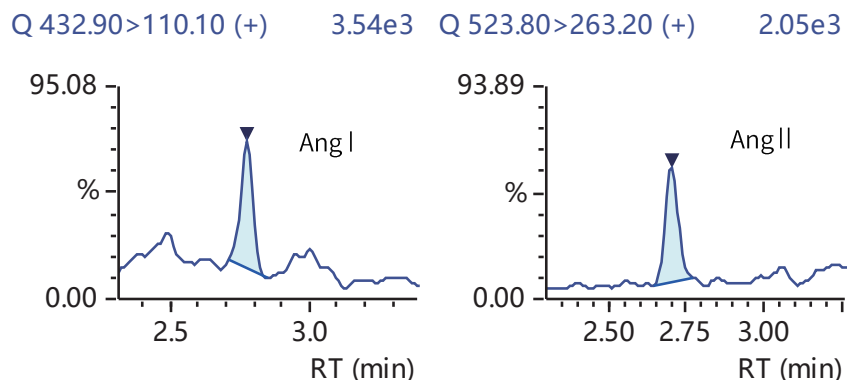


图 1 标准曲线最低点 (20 pg/mL) MRM 色谱图

2.2 线性范围

按照 1.3 配制标准系列工作溶液，参考 1.4 的前处理流程，处理后直接上机分析，以内标法绘制标准曲线，标准曲线如图 2，曲线结果如下表 3 所示，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数在 0.998 以上，准确度在 96.1%-105.5% 之间。

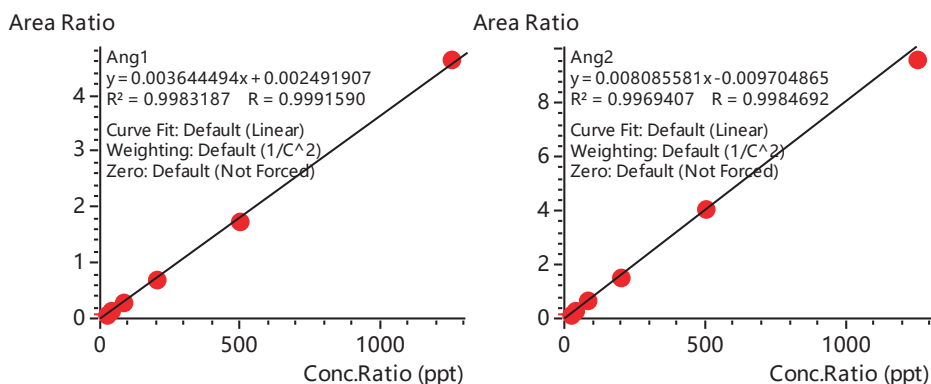


图 2 血管紧张素 I、II 标准曲线

表 3 标准曲线结果

化合物	线性方程	线性范围 (pg/mL)	相关系数	准确度 (%)
Ang I	$Y = (0.003644494)X + (0.002491907)$	20-1250	0.999	96.1-105.5
Ang II	$Y = (0.008085581)X - (0.009704865)$	20-1250	0.998	97.2-103.8

2.3 重复性考察

用含 1% 甲酸的 10% 乙腈溶液配制 40 pg/mL 混合标准溶液，连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 0.28% 和 6.41%，仪器精密度良好。

表 4 重复性测试 (n=6)

化合物	40 pg/mL	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
Ang I	0.22	5.11
Ang II	0.28	6.41

2.4 加标回收实验

人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 5 所示，两个不同浓度加标回收率在 99.2~107.5% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45% 之间，方法准确可靠。

表 5 加标回收实验结果 (n=3)

化合物	加标浓度 (pg/mL)	回收率 %	重复性 RSD%	加标浓度 (pg/mL)	回收率 %	重复性 RSD%
Ang I	80	107.5	8.45	400	102.5	0.33
Ang II	80	99.2	4.41	400	106.5	0.89

■ 结论

本实验建立了一种使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用同时测定人血清中血管紧张素 I、II 的方法。采用内标法定量，灵敏度高、分析速度快，前处理采用 MAX 型 96 孔固相萃取板，操作简单；人血清样品中两个不同浓度的加标回收率在 99.2~107.5% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45% 之间，方法准确可靠，可用于临床及科研工作中血管紧张素 I 和 II 浓度的检测，供相关从业人员参考。

岛津应用云

