

促尿钠排泄肽类家族环肽类化合物LC-MRM定量灵敏度的提高

配置SCIEX OS软件的SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready

Lei Xiong¹, Ian Moore²

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

环肽类化合物如今已成为重要药物。这与其在血液中的稳定性以及口服给药剂量相关。采用液质联用技术开发对生物样本中环肽类化合物的痕量定量检测仍具有非常大的挑战，生物样本基质中的高背景干扰要求液质方法有很好的选择性，都能获得期望的灵敏度。由于环肽类化合物的三级折叠结构以及其结构中缺乏活泼的质子，也会经常妨碍产生碎片离子。

促尿钠排泄肽类 (natriuretic peptide, NP) 家族是一组具有相似结构的基因序列特异性的环肽类化合物，是由分子内两个半胱氨酸残基之间二硫键连接形成的氨基酸环 (图1)。它们目前已作为重要的候选药物用于心血管疾病的诊断和治疗¹。在本项研究中，选择了来自NP家族的两个环肽类化合物，心房促尿钠排泄肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 和B型促尿钠排泄肽 (B-type natriuretic peptide, BNP)，作为模型化合物用于SCIEX 7500系统的定量性能测试。OptiFlow™ Pro离子源结合D Jet™离子导向技术的使用使得环肽类化合物定量灵敏度显著提高。通过对离子去溶剂化和离子聚焦过程的优化，使得多反应监测模式 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 检测性能得以提高。ANP和BNP在大鼠血浆中的定量限为0.05 ng/mL，优于之前报道检测的定量下限²。在获得优异灵敏度的同时，出色的分析重现性、准确性和定量线性使得整个分析流程更加可靠。

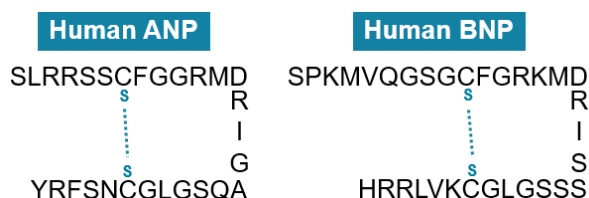


图1. ANP和BNP的氨基酸序列。两个半胱氨酸残基 (ANP C7-C23, BNP C10-C26) 之间通过二硫键连接成环。



基于SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready定量检测环肽类化合物方法的主要特点

- 大鼠血浆中环肽类化合物 (ANP和BNP) 在定量限均为0.05 ng/mL，该分析方法重现性、准确性和定量线性良好
- 硬件提升包括：
 - D Jet离子导向技术—不损失耐受性的情况下捕获更多离子³
 - OptiFlow Pro离子源—新一代的离子源技术，不需要手动调整，即可在各种条件下均实现优异的灵敏度
 - E Lens™技术—通过提高电场作用产生更多离子，并提高带电液滴去溶剂化作用，以实现大气压电喷雾电离 (Electron Spray Ionization, ESI) 模式分析时灵敏度的提升
- SCIEX OS软件用于数据采集和数据处理—集合数据采集、处理、管理于一体，方便客户使用

实验方法

样品前处理: 经过蛋白沉淀后的大鼠血浆上样于混合型固相萃取小柱。洗脱液经过纯水体积比1:1稀释后作为处理过的生物基质。人ANP、人BNP和鼠ANP加入处理过的大鼠血浆基质，其中内源性的大鼠ANP作为分析内标。通过用处理过后的血浆进行连续稀释制备标准曲线样品用于分析。

液质联用条件: 样品通过ExionLC™串联SCIEX Triple Quad™ 7500 系统-QTRAP® Ready系统，进行三次平行分析。详尽方法列于表1和2。

数据处理: 数据通过SCIEX OS 软件2.0中的定量功能（点击“Analytics”）进行处理。

表1. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	Phenomenex bioZen Peptide XB-C18 50 × 2.1 mm; 2.6 μm
流动相A	含0.1%甲酸的水
流动相B	含0.1%甲酸的乙腈
流速	500 μL/min
柱温	40 °C
进样体积	10 μL

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	95	5
0.1	95	5
5	75	25
5.1	10	90
6.0	10	90
6.1	95	5
7.0	95	5

表2. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	40 psi	源温度	750 °C
雾化气	75 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	12	离子喷雾电压	2000 V

名称	Q1	Q3	碰撞能量	碰撞池出口电压
人ANP	617	584.1	34	15
人BNP	693.8	756	39	15
大鼠ANP	613.3	580.9	36	15

环肽类化合物定量结果

SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready通过创新的硬件设计实现仪器检测灵敏度的提高³。OptiFlow Pro离子源整合E Lens技术形成通用的几何学设计，不需要调整位置，只需要更换用于微流或常规流速的喷针即可进行流速1 μL/min到3000 μL/min的分析³。E Lens技术在ESI喷针处形成更强的电场，提升了离子从带电液滴中释放的效率，并使更多的离子偏转进入锥孔以提升检测灵敏度³。在锥孔后的D Jet离子导向设置可以提高在高真空环境中离子的捕获和传输效率。锥形渐缩设计的十二极杆能有效地将离子聚焦进入下一级的QJet™离子导向³。

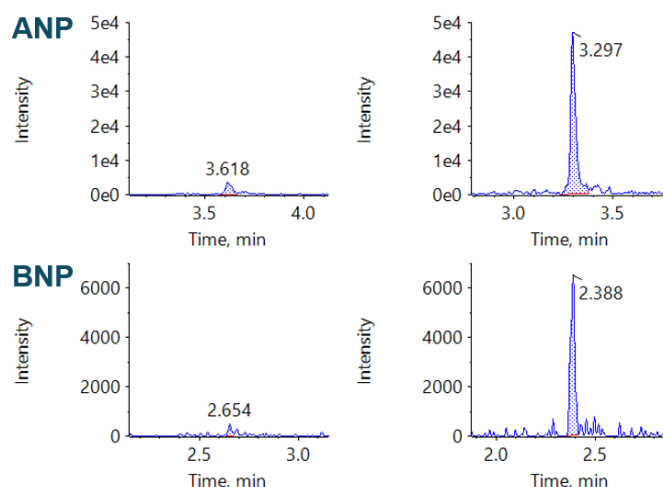


图2. 肽类定量灵敏度。SCIEX 7500系统（右），峰面积提高超过10倍，信噪比提高约5倍。

通过以上技术的整合，使得离子化效率和离子聚焦得以提升，进而实现检测灵敏度的提高。峰面积提高超过10倍，信噪比提高约5倍（图2）。

如图3、图4和图5所示，在大鼠血浆中ANP和BNP的定量下限为0.05 ng/mL，在整个定量范围（0.05-100 ng/mL）内重现性差异小（CV<11%），准确度高（90-114%）。100 ng/mL为此样品配制的最高浓度，但由于100 ng/mL并未出现信号饱和，故定量上限可能更高。

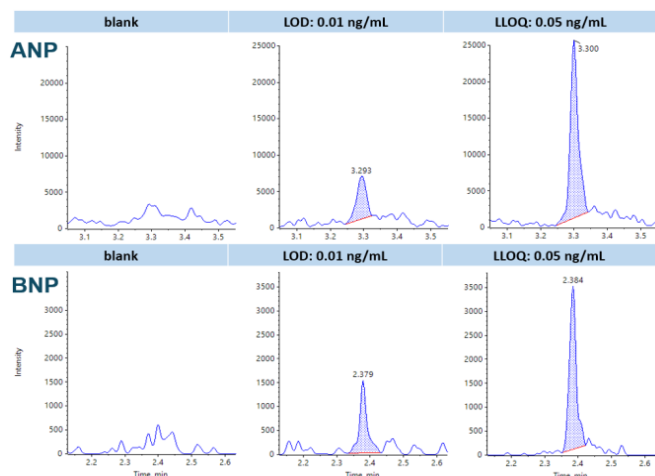


图3. 大鼠血浆中典型的人ANP和BNP MRM提取离子流图。从左到右：基质空白、0.01 ng/mL、0.05 ng/mL

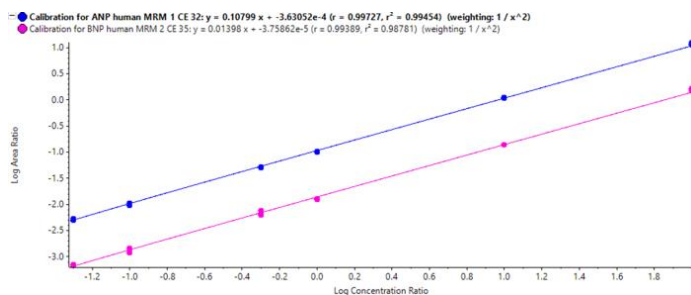


图4. 大鼠血浆中人ANP和BNP 0.05 - 100 ng/mL的标准曲线 (log-log)

Component ...	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
ANP human...	0.05	3 of 3	5.141e-2	1.764e-3	3.43	102.81
ANP human...	0.10	3 of 3	9.565e-2	5.170e-3	5.40	95.65
ANP human...	0.50	3 of 3	4.809e-1	1.419e-2	2.95	96.19
ANP human...	1.00	3 of 3	9.456e-1	2.325e-2	2.46	94.56
ANP human...	10.00	3 of 3	1.022e1	1.085e-1	1.06	102.17
ANP human...	100.00	3 of 3	1.086e2	6.032e0	5.55	108.62

Component ...	Actual Conc...	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
BNP human...	0.05	3 of 3	5.110e-2	2.203e-3	4.31	102.19
BNP human...	0.10	3 of 3	9.715e-2	9.789e-3	10.08	97.15
BNP human...	0.50	3 of 3	4.860e-1	4.916e-2	10.12	97.21
BNP human...	1.00	3 of 3	9.017e-1	7.905e-3	0.88	90.17
BNP human...	10.00	3 of 3	9.946e0	1.473e-1	1.48	99.46

图5. 大鼠血浆中人ANP和BNP定量信息总结

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11883-ZH-A

结论

- 本文在SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MSMS系统 - QTRAP® Ready上建立了环肽类化合物定量的方法，该方法灵敏度高。
- 人ANP和BNP在大鼠血浆中的定量下限为0.05 ng/mL，分析方法重现性、准确度、定量线性良好。
- 在配有E Lens技术的OptiFlow Pro离子源和D Jet离子导向技术的加持下，本文的方法与之前报道方法相比，灵敏度有显著提高²

参考文献

1. Das BB, Solinger R (2009) Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 7(1), 29-42.
2. Ciccimaro E., et al, (2014) Anal. Chem, 86, 11523-11527.
3. Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-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: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)