

液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测血浆肾素活性(PRA)的方法学建立和临床应用评估

徐雯¹ 虞倩¹ 陈方俊¹ 秦嘉倩¹ 潘柏申¹ 郭玮¹ 卞华² 王蓓丽^{1Δ}

(¹ 复旦大学附属中山医院检验科, ² 内分泌科 上海 200032)

【摘要】 目的 建立高血压患者血浆肾素活性(plasma renin activity, PRA)液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)的检测方法,用于早期筛查高血压患者中的原发性醛固酮增多症(primary aldosteronism, PA)。**方法** arginine ¹³C ¹⁵N 作为内标,采用 Phenomenex Kinetex C18 柱(2.6 μm, 100 mm×3.0 mm)进行分离,柱温 55 ℃。流动相为 0.2% 甲醇水溶液和 0.2% 甲酸甲醇溶液,流速为 0.5 mL/min,梯度洗脱。考察该方法的特异性、基质效应、携带污染、重复性、定量下限(lower limit of measuring interval, LLMI)、线性、不精密度、回收率、稀释一致性和血浆标本稳定性。采用 LC-MS/MS 方法测定 296 名表面健康人群(男性 153 名,女性 143 名,平均年龄 48 岁)及 360 名高血压患者(平均年龄 52 岁,确诊为 PA 27 例)的血浆样本 PRA,并与放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)进行比较。**结果** 该方法通过了特异性、基质效应、携带污染、重复性的性能评价。PRA 的检测线性范围为 0.084 4~30.000 0 ng/mL;PRA 的 LLMI 为 0.084 4 ng·mL⁻¹·h⁻¹;日间和批内的不精密度变异系数(coefficient of variation, CV)均<15%;准确度偏差均<15%,回收率为 92.28%~102.62%;建立的生物参考区间为 0.25~5.12 ng·mL⁻¹·h⁻¹ (立位);与 RIA 比较,结果相关性较好($r^2 = 0.81, P < 0.05$),但存在 -18.5% 的偏倚;LC-MS/MS 所得 PRA 的醛固酮/肾素活性比值(alosterone to renin ratio, ARR)对 PA 的诊断特异性与灵敏度分别为 96.3% 与 91.0%,诊断性能更佳(AUC: 0.983 vs. 0.894)。**结论** 我们建立了准确检测 PRA 的 LC-MS/MS 方法,适合于临床早期快速筛查 PA。

【关键词】 血浆肾素活性(PRA); 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); 原发性醛固酮增多症(PA)

【中图分类号】 R446 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.01.012

Method development and clinical application assessment of plasma renin activity (PRA) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

XU Wen¹, YU Qian¹, CHEN Fang-jun¹, QIN Jia-qian¹, PAN Bai-shen¹,
GUO Wei¹, BIAN Hua², WANG Bei-li^{1Δ}

(¹ Department of Clinical Laboratory, ² Department of Endocrinology, Zhongshan Hospital,
Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective A method for the detection of plasma renin activity (PRA) was established by LC-MS/MS for the early screening of primary aldosteronism (PA) in hypertensive patients. **Methods** Arginine ¹³C and ¹⁵N were used as internal standards, and we selected Phenomenex Kinetex C18 (2.6 μm, 100 mm×3.0 mm) for separation with column temperature of 55 ℃, mobile phase of 0.2% aqueous methanol solution and 0.2% formic acid methanol solution, flow rate of 0.5 mL/min and

上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2015ZB0201);上海市卫计委科研课题(201440389);上海市科委科研项目(16411952100);国家自然科学基金面上项目(81572064, 81772263)

ΔCorresponding author E-mail: wang.beili1@zs-hospital.sh.cn

gradient elution. The method was investigated for specificity, matrix effect, carryover contamination, repeatability, lower limit of measuring interval (LLMI), linearity, imprecision, recovery, dilution consistency and plasma specimen stability. LC-MS/MS method was used to determine the plasma renin activity of 296 healthy individuals (153 males and 143 females with mean age of 48 years) and 360 hypertensive patients (mean age of 52 years, 27 patients diagnosed as PA), and compared with radioimmunoassay (RIA) methods. **Results** The method passes the performance evaluation of specificity, matrix effect, carryover contamination, and repeatability. The linear range of PRA was 0.084 4–30.000 0 ng/mL. The LLMI of PRA was 0.084 4 ng·mL⁻¹·h⁻¹. The imprecision coefficient of variations (CV) were less than 15% between days and batch. The accuracy deviation was less than 15%, and the recoveries was 92.28% to 102.62%. The biological reference interval ranged from 0.25 to 5.12 ng·mL⁻¹·h⁻¹ (standing position). Compared with RIA, the correlation was acceptable ($r^2 = 0.81, P < 0.05$), but there was a bias of -18.5%. The specificity and sensitivity of aldosterone to renin ratio ARR (LC-MS/MS method) for diagnosis of PA were 96.3% and 91.0%, and diagnostic performance was better (AUC: 0.983 vs. 0.894). **Conclusions** Our study established an accurate LC-MS/MS method for the determination of PRA, which is suitable for rapid screening of PA early in the clinical.

【Key words】 plasma renin activity (PRA); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); primary aldosteronism (PA)

* This work was supported by the Key Developing Disciplines of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2015ZB0201), the Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201440389), the Research Project of Shanghai Science and Technology Commission (16411952100) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572064, 81772263).

中国高血压患者总人数已突破 3.3 亿,按病因可分为原发性和继发性高血压。其中原发性醛固酮增多症(primary aldosteronism, PA)是继发性高血压中最常见的病因,在年轻高血压人群中约占 10%^[1-4]。PA 临床表现为高血压和(或)低血钾的临床综合征,其作为一种“可治愈的高血压”,若能早期诊断,可通过手术或药物治疗使血压回到正常水平^[5],可降低患者心血管事件的发生率,改善患者预后^[6]。

肾素是由肾小球旁器释放的一种蛋白水解酶,能催化肝脏分泌进入血浆中的血管紧张素原转变成血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I),从而增加醛固酮的生成。醛固酮是由肾上腺皮质球状带分泌的盐皮质激素,主要生理功能是保钠排钾,通过调节血容量维持体液水盐平衡^[7]。临床上推荐使用醛固酮/肾素活性比值(aldosterone to renin ratio, ARR)作为 PA 的初筛方法,再使用生理盐水抑制试验、开博通试验等作为确认试验,最后使用肾上腺静脉取样检测醛固酮(AVS 试验)进行术前定位^[8]。在这些临床实验中,准确检测肾素活性-醛固酮浓度至关

重要。

血浆肾素活性(plasma renin activity, PRA)水平非常低,仅为 ng 级,因此对检测方法的灵敏度要求很高。19 世纪 70 年代起使用放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)检测^[9],之后也开发出化学发光法检测直接肾素浓度^[10-11],这两种方法是目前临床常用的肾素检测方法。免疫法可实现自动化操作,检测快速、成本低,但单次仅能检测一种靶标激素,特异性差、尤其是女性患者易出现交叉反应^[12-13]。内分泌激素水平在机体病理状态下波动范围大,易出现极高/低值,而免疫分析法在此类情况下准确性与重复性的不足,令其在功能性试验中无法正确反映患者的激素水平动态波动,从而影响临床诊断的灵敏度及特异性。因此迫切需要寻找更灵敏、更准确的方法检测 PRA。

本文旨在建立质谱技术检测 PRA 的方法,并结合多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术,利用质谱平台的高敏感性和高特异性准确定量 PRA,早期快速筛查 PA,从而更好地为临床提供有效、准确的信息,为快速筛查诊断 PA 创造条件。

资料和方法

仪器和试剂 AB SCIEX® Triple Quad 6500 + LC-MS/MS 系统,标准品为人血管紧张素 I 乙酸盐水合物(5 mg,上海市圆创生物科技有限公司);内标品为 Ang I 稳定同位素内标 arginine ^{13}C ^{15}N (5 mg, Anaspec, Fremont, 成都康普尼生物科技有限公司);无激素正常人混合血浆 SeraCon™ II (美国 SeraCare Life Sciences 公司);甲醇(德国 Merck 公司,色谱级);牛血清白蛋白(美国 Sigma Life Science 公司);苯甲基磺酰氟(德国 Roche 诊断公司);Tris Base 碱(德国 Roche 诊断公司);甲酸(美国 ROE scientific 公司,高效液相色谱级)。

患者入组 本研究纳入 2017 年 12 月至 2018 年 1 月就诊于复旦大学附属中山医院门诊内分泌科并获得医嘱检测 PRA 的 360 名高血压患者及同期在我院体检中心体检的 296 名表面健康人群。所有样本获取及使用过程均获复旦大学附属中山医院伦理委员会批准及患者知情同意。

高血压患者纳入标准:原发性高血压诊断依据为 2010 年中国高血压防治指南。其中 27 例 PA 的诊断依据为 2016 年中国制定的《原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识》。

体检表面健康人群纳入标准:年龄 ≥ 18 岁; BMI 为 $18.0 \sim 35.0 \text{ kg/m}^2$; 血压无异常($<130/80 \text{ mmHg}$, $1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$);血钾无异常($2.8 \sim 6.2 \text{ mmol/L}$);未服用降压药物或经过激素治疗;无吸烟嗜酒;无严重器质性心脏病;无心功能 3 级及以上的心功能不全;无肝、肾功能不全;非妊娠、哺乳期妇女。

标本采集 使用 EDTA 抗凝真空管采集患者静脉血。尽快(2 h 内)离心分离血浆,并分装到尖底离心管内, -80°C 冻存。

标准品配制 在 2 mL 无激素正常人混合血浆中准确溶解 $10 \mu\text{g}$ Ang I,配制成 $5\,000 \text{ ng/mL}$ 的标准储备液。将储备液按照一定比例稀释为 $0.337\,5$ (S1)、 $0.675\,0$ (S2)、 $1.350\,0$ (S3)、 $2.700\,0$ (S4)、 $9.000\,0$ (S5)及 30.0000 ng/mL (S6)标准品。分装后 -80°C 保存备用,不能反复使用。

质控品配制 在无激素正常人混合血浆中准确溶解 $10 \mu\text{g}$ Ang I,配制成 $5\,000 \text{ ng/mL}$ 的标准储备液。将储备液按照一定比例稀释为 2.0 、 4.0 及 8.0 ng/mL 质控品。分装后 -80°C 保存备用,不能

反复使用。

内标品配制 在含有 2 mL 1% BSA 的 0.1 mol/L Tris (pH = 6)工作缓冲液中准确溶解 $10 \mu\text{g}$ arginine ^{13}C ^{15}N ,配制成 $5\,000 \text{ ng/mL}$ 的内标储备液。将 Ang I 内标储备液用 10% 甲酸水溶液稀释至 10 ng/mL 。

样本前处理 将血浆、标准品、质控品和内标品取出平衡至室温。(1)孵育反应^[14]:分别取 $250 \mu\text{L}$ 标准品、质控品和患者血浆,加入 $50 \mu\text{L}$ 孵育缓冲液,震荡混匀后 37°C 孵育 3 h。孵育结束后加入 $300 \mu\text{L}$ Ang I SIS 震荡混匀后终止酶促反应。孵育缓冲液的配置:分别取 121.1 g Tris Base 与 74.0 g EDTA,加入 900 mL 去离子水后超声 30 min,直至完全溶解后再用去离子水定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。最后用冰醋酸调节 pH 至 $5.45 \sim 5.50$, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。(2)固相萃取:使用 Waters OASIS HLB uElution 96 孔板进行抽提和萃取。每孔预先使用甲醇和 5% 甲酸水溶液 1 mL 对填料进行平衡和活化,加入孵育反应后的 $600 \mu\text{L}$ 样本(血浆或标准品)进行抽提和萃取,依次加入 5% 甲酸水溶液和 20% 甲醇水溶液各 1 mL 进行淋洗,分别将不同极性的杂质洗脱。最后使用 $250 \mu\text{L}$ 甲醇将目标分析物以及稳定同位素内标洗脱入样本收集板。

色谱分析条件与质谱条件 色谱柱为 Phenomenex Kinetex C18 ($2.6 \mu\text{m} \times 100 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$),柱温 55°C 。流动相 A 为 0.2% 的甲醇水溶液,流动相 B 为 0.2% 的甲酸甲醇溶液,流速 0.5 mL/min 。按浓度梯度洗脱(表 1)。将萃取得到的样品上机检测,每次进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。质谱条件为 Ang I 定量的转换离子对(m/z)为 $433.1 \rightarrow 647.5$,锥孔电压为 46 V ,碰撞能量为 22 V ;Ang I SIS 定量的转换离子对(m/z)为 $436.4 \rightarrow 657.5$,锥孔电压为 46 V ,碰撞能量为 22 V ,质谱裂解信息见图 1。

表 1 检测流动相梯度

Tab 1 Gradient of mobile phase

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
0.0	0.5	90	10
0.5	0.5	90	10
1.5	0.5	5	95
3.5	0.5	5	95
3.6	0.5	90	10
6.0	0.5	90	10

A: 0.2% aqueous methanol solution; B: 0.2% formic acid methanol solution.

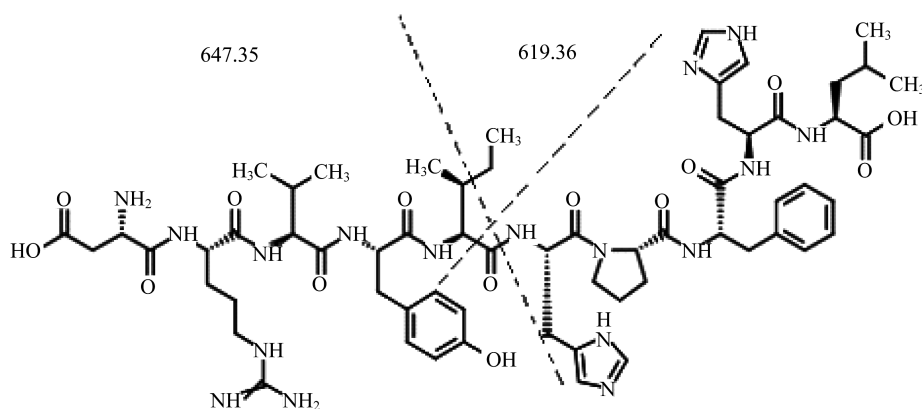


图1 质谱裂解信息

Fig 1 The mass spectrometry cleavage information

方法学考察

预验证 (1)特异性:使用无激素正常人混合血浆作为双空白样本,经前处理后重复进样检测5次,比较背景峰面积与定量检测下限(lower limit of measuring interval, LLMI)峰面积,验证该方法的特异性。背景峰面积/LLMI峰面积 $<20\%$ 即判断为可接受。(2)基质效应:选取正常人混合空白血浆和流动相,经前处理后加入 $25\ \mu\text{L}$ $9\ \text{ng/mL}$ 和 $100\ \text{ng/mL}$ 的标准品(标准品被稀释10倍),4份标本分别进样检测5次,比较血浆基质和纯溶液下的信号比值(ME%), $\text{ME}\% < 100\% \pm 15\%$ 即判断为可接受。(3)携带污染:在 $250\ \mu\text{L}$ 甲醇中加入 $25\ \mu\text{L}$ 浓度为 $100.0\ \text{ng/mL}$ 的标准品S7作为高值标本($10.0\ \text{ng/mL}$);在 $250\ \mu\text{L}$ 甲醇中加入 $25\ \mu\text{L}$ $9.0\ \text{ng/mL}$ 标准品S5作为低值标本($0.9\ \text{ng/mL}$),低值标本进样5次,高-低进样反复5个循环。高-低值转换样品均值与低-低值转换样品均值之差小于低-低值转换样品的3倍标准差(standard deviation, SD)即判断为可接受。(4)重复性:将标准品稀释至 110% LLMI ($0.372\ \text{ng/mL}$)、 90% LLMI ($27.000\ \text{ng/mL}$)和 50% [(LLMI + ULMI) $15.169\ \text{ng/mL}$, ULMI: upper limit of measuring interval (定量检测上限)]作为待测样品。经前处理后每种浓度的样本重复进样20次,计算SD和CV, $\text{CV} < 15\%$ 即判断为可接受。

性能验证

定量下限 稀释标准品,当标准品浓度为 0.3375 、 0.0844 和 $0.0422\ \text{ng/mL}$,每个浓度重复检测10次,将同时满足 $\text{CV} < 15\%$ 、检测偏倚

(deviation, Dev) $<10\%$ 且信噪比 $>20:1$ 的最低浓度值定为定量检出限。

线性评价 将浓度为 $100\ \text{ng/mL}$ 的标准品稀释为6个浓度(30.0000 、 9.0000 、 2.7000 、 1.3500 、 0.6750 、 $0.3375\ \text{ng/mL}$),重复检测3次取均值。各浓度的Dev $<10\%$, CV $<15\%$ 且曲线的回归系数(r^2) >0.99 可判断为呈线性。

不精密度评价 使用高($8.0\ \text{ng/mL}$)、中($4.0\ \text{ng/mL}$)、低($0.25\ \text{ng/mL}$)3个浓度水平的质控品作为待测样品,分别同时检测20次,评价批内不精密度;将混合血浆分装于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存,连续检测3天,每天重复3次,评价批间不精密度。LLMI浓度3倍附近低值CV $<20\%$,其余CV $<15\%$ 即判断为可接受。

准确度评价 在3个浓度水平的质控品(2.0 、 4.0 和 $8.0\ \text{ng/mL}$)中同时添加标准品S4 ($2.7\ \text{ng/mL}$),每份样本重复检测5次取均值,并与理论值进行比较计算Dev。准确度Dev $<15\%$ 且低浓度Dev $<20\%$ 即判断为可接受。回收率需满足 $80\% \sim 120\%$ 。

稀释一致性 将浓度为 $100\ \text{ng/mL}$ 的标准品S7稀释至3个浓度(20 、 10 、 $5\ \text{ng/mL}$),经前处理后每个浓度进样检测5次,当满足浓度 >3 倍LLMI时,回收率在 $100.0\% \pm 15.0\%$, CV $<15\%$ 即判断为可接受。

样本稳定性及储存稳定性 选取低、高各2组混合血浆样本分别置于 25 、 4 、 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存15 h后进行检测,每组检测4次,计算均值与CV%, CV $<15\%$ 即判断为可接受。血液样本采集后处理稳定性:采用随机数表法(不重复抽样)在360例高血压

患者标本中随机选取 20 例血样,按 3 种不同处理要求进行血浆分离,分别检测 3 种处理后的 PRA 计算均值与 CV%, $CV < 15\%$ 即判断为可接受。标本采集后立即分离血浆,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h;标本采集后立即分离血浆,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 5 h 后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h;标本采集后静置 5 h,随后分离血浆,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。

临床评估 建立生物参考区间:表面健康人群根据性别进行分组,并统计分析是否存在性别差异,如有差异则分组建立参考区间;通过相关性分析判断年龄和检测值之间是否存在相关性,如存在相关性则根据年龄分段建立参考区间。判断健康人群结果是否为正态分布,非正态分布使用 2.5% 与 97.5% 百分位数作为参考区间上下限。方法学比较:与 RIA 检测所得 PRA 结果进行一致性与偏倚评价。临床应用评估:使用 LC-MS/MS 和 RIA 法所得结果计算 ARR,评价两者比值对 PA 诊断的灵敏度和特异性,综合评价诊断性能。

统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件计算均值、

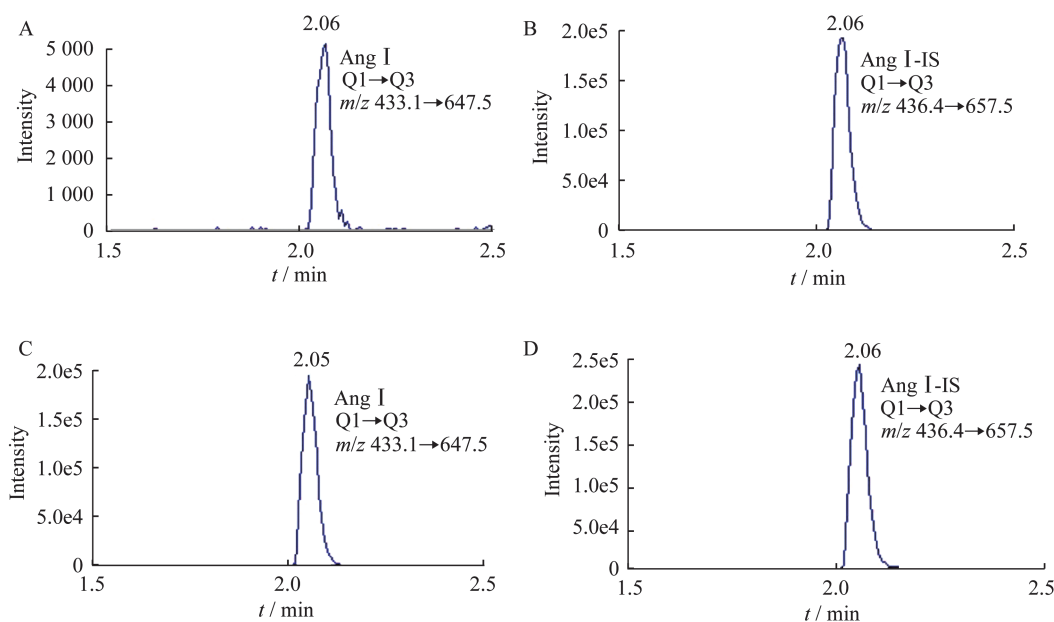
SD、CV、Dev 和回收率。使用 Skewness-Kurtosis 检验程序判断数据正态性;使用 Stem-and-Leaf&Box Plots 程序剔除离群值;使用非参数秩和检验统计分析是否存在性别差异;使用 Spearman 相关性分析判断年龄和检测值之间是否存在相关性。方法间结果比较使用两独立样本的 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。ROC 曲线评价自建质谱方法与 RIA 所得结果对于 PA 诊断的灵敏度和特异性。

结 果

方法学验证

预验证

LC-MS/MS 检测 标准品 S3 和血浆标本 Ang I (m/z : 433.1 \rightarrow 647.5) 及其内标物 Ang I-IS (m/z : 436.4 \rightarrow 657.5) 的色谱图见图 2,保留时间分别为 2.06 和 2.05 min。



A and B: The chromatogram of the standard S3 Ang I and Ang I-IS; C and D: The chromatogram of the plasma sample Ang I and Ang I-IS.

图 2 LC-MS/MS 检测 PRA 的色谱图

Fig 2 Chromatograms of PRA detected by LC-MS/MS

特异性 双空白血浆重复进样 5 次所得到背景峰面积/LLMI 峰面积分别为 3.61%、3.02%、4.14%、2.43% 和 0.99%,均小于 20%。另外,背景峰面积/预期 IS 峰面积分别为 0.11%、0.18%、0.18%、0.09% 和 0.09%,均小于 5%。以此验证该方法的特异性满足要求。

基质效应 添加低、高值 (9 ng/mL、100 ng/mL) 标准品的血浆基质和纯溶液下的信号比值 (ME%) 分别为 93.88% (低浓度) 和 103.02%,说明血浆基质对低、高浓度样本的影响分别表现为离子抑制和离子增强,影响幅度在 15% 之内则满足建议要求。

携带污染 高-低值转换样品均值与低-低值转换样品均值分别为 0.353 和 0.372, 两者的差值(0.019)小于 3 倍低-低值转换样品 SD, 判断为可接受。

重复性 110% LLMi (0.372 ng/mL)、90% LLMi (27.000 ng/mL) 和 50% (LLMi + ULMi) (15.169 ng/mL) 3 种浓度稀释标准品的 CV 分别为 5.17%、2.00% 和 7.93%, 均 \leq 15% 即判断为可接受。

性能验证

定量下限 稀释标准品, 当标准品浓度为 0.337 5、0.084 4 和 0.042 2 ng/mL, 每个浓度重复检测 10 次, 0.337 5 和 0.0844 ng/mL 浓度下的 CV 分别为 5.36% 和 11.76% (均 \leq 15%), 且 $Dev < 10\%$, 信噪比 $>20:1$, 因此 LLMi 为 0.084 4 ng \cdot mL $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ 。而浓度在 0.042 0 ng/mL 时, 信噪比满足至少 3:1, CV 和 Dev 满足应用建议检测限(limit of detection, LoD)要求, 但不能满足 LIMi 的要求, 故 0.042 0 ng/mL 为肾素质谱检测方法的 LoD。

线性评价 将浓度为 100 ng/mL 的标准品稀释为 6 个浓度(30.000 0、9.000 0、2.700 0、1.350 0、0.675 0、0.337 5 ng/mL), 重复检测 3 次取均值。LLMi 浓度点及其余浓度点的 $Dev < 10\%$ 且 $CV < 15\%$ 则满足建议要求。PRA 的回归方程是 $y = 0.0917x + 0.0103$, 相关系数 $r^2 = 0.99$, PRA 的线性范围为 0.084 4~30.000 0 ng/mL。

不精密度评价 低(0.25 ng/mL)、中(4.0 ng/mL)、和高(8.0 ng/mL) 3 个浓度水平的 PRA 溶液(质控品)批内不精密度分别为 3.54%、1.32% 和 1.88%, 日间不精密度分别为 5.69%、2.22% 和 1.92%。实验结果显示 3 浓度水平质控品的批内和日间 CV 均 $\leq 15\%$, 满足应用建议要求。

准确度评价 实验结果显示低、中、高 3 个浓度水平质控品的 Dev 分别为 -8.81%、2.18% 和 2.62%, Dev 均 $\leq 15\%$, 满足应用建议的要求。回收率为 91.28%~102.62%, 符合 80%~120% 的标准。

稀释一致性 将浓度为 100 ng/mL 的标准品稀释至 3 个浓度(20、10、5 ng/mL), 经前处理后每个浓度进样检测 5 次(表 3)。100 ng/mL (33.3 ng \cdot mL $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$) 样本 1:20 稀释后回收率和 CV 均满足要求。

表 3 PRA 稀释一致性

Tab 3 The dilution consistency of PRA

Theoretical concentration	Level 1 (1:5)	Level 2 (1:10)	Level 3 (1:20)
1	19.10	8.70	5.28
2	18.80	8.51	5.22
3	19.40	8.46	5.15
4	18.80	8.41	5.23
5	19.00	8.61	5.18
Recovery (%)	95.10	86.00	104.24
CV (%)	1.31	0.98	0.95

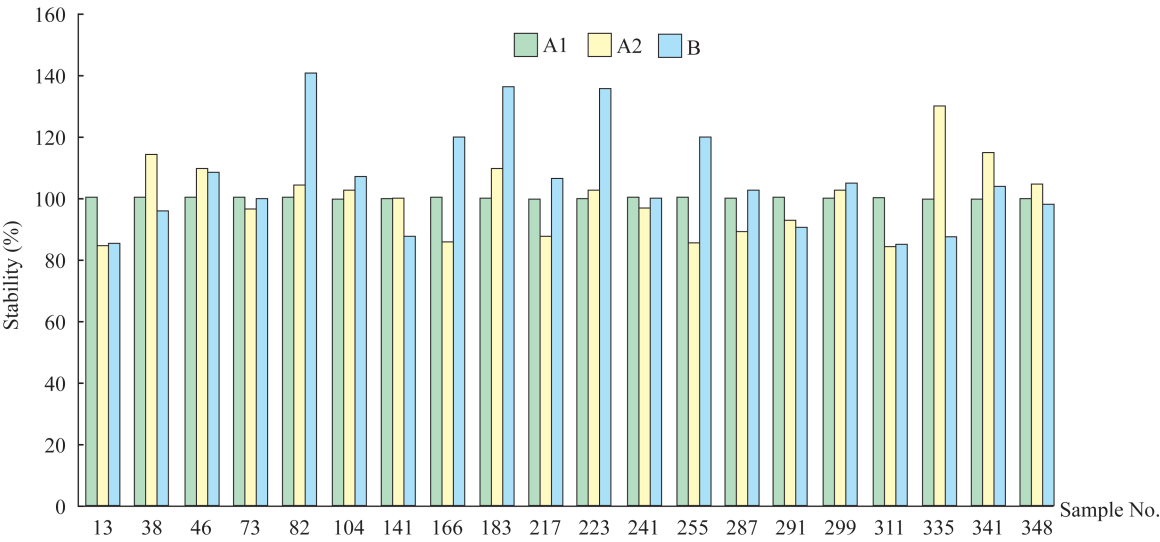
Level 1:20 ng/mL; Level 2:10 ng/mL; Level 3:5 ng/mL.

样本稳定性 储存稳定性:低、高各 2 组混合血浆样本在 25、4、-80 $^{\circ}$ C 保存 15 h 后, 4 次检测结果差异无统计学意义($P = 0.14$)。血浆样本采集后处理稳定性:20 例随机血样按 A1、A2 和 B 方案进行血浆分离, 3 种样本处理后的 PRA 差异无统计学意义($P > 0.05$), 以 A1 为 100%, 换算为 A2 和 B 组的百分比绘制图 3。

临床评估 296 名表面健康人群(男性 153 例, 女性 143 例), 均为立位, 无离群值, 年龄为 48 (23~82) 岁, BMI 为 (22.55 ± 2.21) kg/m 2 , 收缩压为 (112 ± 17) mmHg, 舒张压为 (75 ± 11) mmHg, 血钾为 (3.77 ± 0.5) mmol/L。男女分组后人口学资料差异无统计学意义, ALD 结果与年龄无相关性($r = 0.06$)。采用非参数排序法, 将生物参考区间定义为 2.5%~97.5%, 得到结果为 0.25~5.12 ng \cdot mL $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ (立位)。

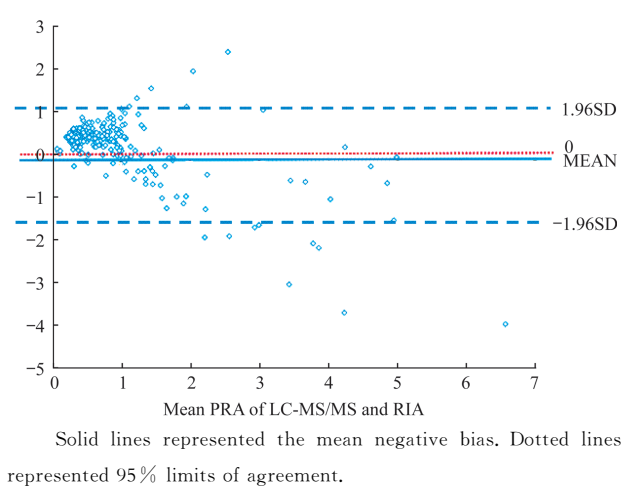
方法学比较 360 例高血压样本中临床确诊为 PA 的样本为 27 例。比较分析 LC-MS/MS 和 RIA 结果之间的相关性, Spearman 相关检验结果显示 $r^2 = 0.81$, $P < 0.05$, 两者结果一致性较好(图 4)。Bland-Altman plot 图横坐标为两方法所得结果的均值, 纵坐标为两方法之间的相对偏差。与 RIA 结果相比, LC-MS/MS 方法的检测结果的平均偏差为 -18.5%。

临床应用评估 根据两方法检测结果计算 ARR, 绘制两种方法的 ROC 曲线(图 5), 曲线下面积 LC-MS/MS 为 0.983 ($P < 0.05$), RIA 为 0.894 ($P < 0.05$)。LC-MS/MS 所得 PRA 计算的 ARR 对 PA 的诊断性能更佳。以 30 作为 ARR 的切点, LC-MS/MS 的灵敏度和特异性分别为 96.3% 和 91.0%, 虽然 RIA 的诊断特异性(99.4%)较好, 但灵敏度(33.3%)损失严重。



Using random number table method, Specimen selected from blood samples of 360 patients with hypertension.

图 3 血浆样本采集后处理稳定性
Fig 3 The treatment stability after the plasma sample colletion



Solid lines represented the mean negative bias. Dotted lines represented 95% limits of agreement.

图 4 LC-MS/MS 和 RIA 检测 PRA 的 BA 图
Fig 4 Bland-Altman analysis between LC-MS/MS and RIA for PRA

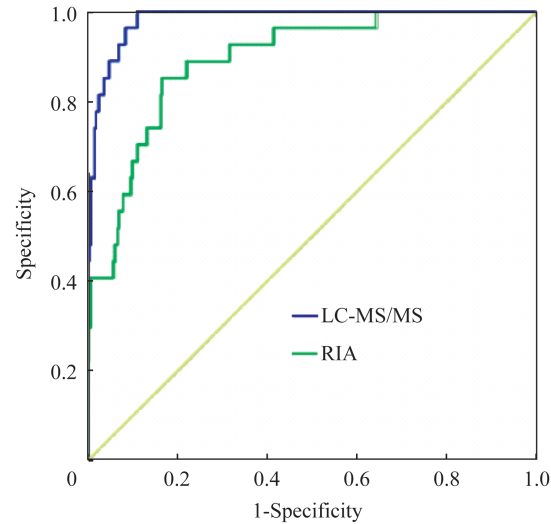


图 5 LC-MS/MS 与 RIA 的 ROC 曲线
Fig 5 The receiver operating characteristic curve analysis between LC-MS/MS and RIA

讨 论

我们使用 AB SCIEX® Triple Quad 6500 + 系统建立了 LC-MS/MS 检测 PRA 的方法。PRA 的定量分为两个步骤:(1)经过孵育血浆中的血管紧张素原转换为 Ang I;(2)定量检测 Ang I。所以 PRA 的检测实际是 Ang I 水平变化的检测。

PRA 的检测在先前的研究中室间一致性结果较差,这可能是由于标本的分析前和分析中因素等

变量所造成。我们的方法在建立过程中不断优化反应条件,对标本保存方式、孵育时间温度、SPE 提取损失、样本吸附等方面进行多次实验,尽可能减少实验条件对检测造成的分析前和分析中误差,保证 PRA 定量的准确性。

在分析前误差分析中,我们针对样本的采集后处理稳定性和储存稳定性进行了详尽的分析。PRA 标本的标准采集转运流程应为:血样采集后 30 min 内冰浴送检并离心分离血浆,但在实际操作

中,尤其在住院患者的采样中执行难度较大。在我们的实验中,标本采集后即刻离心分离血浆,与全血保存 5 h 后分离血浆进行检测,差异无统计学意义,这也保证了病房采集标本后未能及时送检不会带来结果偏差。在分离血浆后样本储存的稳定性实验中,血浆标本可在室温、4℃冷藏和 -20℃冷冻情况下稳定 15 h。这也保证了非门诊时间段采样标本分离血浆后储存的稳定性。

该方法经过《液相色谱-质谱临床应用建议》验证及方法学评价,证明准确可信。在预验证中,我们评价了方法的特异性、重复性、基质效应和携带污染,均符合应用建议要求。而在性能验证中,我们建立的方法在定量下限、线性范围、回收率、不精密度和稀释一致性与多篇文献报道的水平相近。其中,线性范围为 $0.084 \sim 30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,LLMI 为 $0.084 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,该线性范围显著优于传统的 RIA 法,LLMI 更是接近传统 RIA 的 1/24,满足临床 PA 的诊断需求。不精密度评估中低、中、高值的批内和日间精密度与 Carter 等^[14]的研究结果基本一致。

传统的竞争性 RIA 所能检测的线性范围在 $0.2 \sim 12.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,且特异性不佳,已不能满足临床对于 PA 的鉴别诊断。化学发光法检测 DRC 的方法虽能满足临床高通量自动化检测的速率,且易做到实验室室间不精密度的一致性,但始终无法避免交叉反应带来的误差。我们建立的 LC-MS/MS 方法直接测定目标物本身,同时监测两对离子对,专属性强、灵敏度高,有望成为未来的主流检测方法。与 RIA 结果相比,LC-MS/MS 方法的检测结果的平均偏差为 -18.5%,与其他研究结果基本一致^[14-15]。这种负偏差在免疫学方法与质谱方法中并不罕见,主要是由于免疫法使用的抗体与其他类固醇类激素存在交叉反应或其他干扰物质,缺乏特异性。进一步比较两种方法并绘制 ROC 曲线,LC-MS/MS 的曲线下面积(AUC)大于 RIA,诊断性能更佳,且在特异性相近的情况下,灵敏度显著高于 RIA,较好地避免了假阴性所造成的漏诊,适用于临床初诊高血压低血钾疑似患者的筛查。

鉴于两种方法结果存在的负偏差,我们收集了 296 名表面健康人群标本以建立生物参考区间。由于数据为非正态分布,且该检测项目的上下限均有相应的临床意义,其中下限的临床意义与 PA 的诊

断密切相关,因此我们选择 2.5%和 97.5%作为参考范围上下限。年龄和性别构成对 PRA 并无影响,无需分组建立生物参考区间,最后得到 PRA 的生物参考区间为 $0.25 \sim 5.12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

综上所述,本研究利用高灵敏度和高特异性的质谱平台准确定量 PRA。该方法已在复旦大学附属中山医院应用于临床,结果得到了认可。但质谱方法在临床的推广仍存在一定局限性。昂贵的仪器、较高的耗材成本、操作人员专业欠缺、实验室自建检测方法建立有待规范和无法与实验室信息系统对接等问题仍需进一步解决。

参 考 文 献

- [1] STOWASSER M, GORDON RD. Primary aldosteronism: changing definitions and new concepts of physiology and pathophysiology both inside and outside the kidney [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96 (4): 1327 - 1384.
- [2] GALATI SJ. Primary aldosteronism: challenges in diagnosis and management [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015, 44(2): 355 - 369.
- [3] WILLIAMS TA, REINCKE M. Management of endocrine disease: diagnosis and management of primary aldosteronism: the endocrine society guideline 2016 revisited [J]. *Eur J Endocrinol*, 2018, 179(1): R19 - 29.
- [4] GALATI SJ, HOPKINS SM, CHEESMAN KC, et al. Primary aldosteronism: emerging trends [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(9): 421 - 430.
- [5] BORNSTEIN SR, ALLOLIO B, ARLT W. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(2): 364 - 389.
- [6] MONTICONE S, D'ASCENZO F, MORETTI C, et al. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(1): 41 - 50.
- [7] NGARMUKOS C, GREKIN RJ. Nontraditional aspects of aldosterone physiology [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 281(6): 1122 - 1127.
- [8] FUNDER JW, CAREY RM, FARDELLA C, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(9): 3266 - 3281.
- [9] SHIONOIRI H, TAKASAKI I, ISHIKAWA Y, et al. Measurement of plasma active renin by solid phase radioimmunoassay using monoclonal antibodies [J]. *Am J Med Sci*, 1990, 300(3): 138 - 143.
- [10] SCHIRPENBACH C, SEILER L, MASER-GLUTH C, et al. Automated chemiluminescence-immunoassay for

- aldosterone during dynamic testing: comparison to radioimmunoassays with and without extraction steps [J]. *Clin Chem*, 2006, 52 (9): 1749 - 1755.
- [11] JUUTILAINEN A, SAVOLAINEN K, ROMPPANEN J, *et al.* Combination of LC-MS/MS aldosterone and automated direct renin in screening for primary aldosteronism[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2014, 433 (7): 209 - 215.
- [12] AHMED AH, GORDON RD, TAYLOR PJ, *et al.* Are women more at risk of false-positive primary aldosteronism screening and unnecessary suppression testing than men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96 (2): E340 - E346.
- [13] PIZZOLO F, RAFFAELLI R, MEMMO A, *et al.* Effects of female sex hormones and contraceptive pill on the diagnostic work-up for primary aldosteronism [J]. *J Hypertens* 2010, 28(1): 135 - 142.
- [14] CARTER S, OWEN LJ, KERSTENS MN, *et al.* A liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for plasma renin activity using online solid-phase extraction [J]. *Ann Clin Biochem* 2012, 49(Pt 6): 570 - 579.
- [15] FREDLINE VF, KOVACS EM, TAYLOR PJ, *et al.* Measurement of plasma renin activity with use of HPLC-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 1999, 45(5): 659 - 664.

(收稿日期: 2018 - 03 - 20; 编辑: 王蔚)

(上接第 57 页)

- [11] TSUKADA S, WAKUI M. Lower dislocation rate following total hip arthroplasty *via* direct anterior approach than *via* posterior approach: five-year-average follow-up results[J]. *Open Orthop J*, 2015, 9(1): 157 - 162.
- [12] SHETH D, CAFRI G, INACIO MC, *et al.* Anterior and anterolateral approaches for THA are associated with lower dislocation risk without higher revision risk[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(11): 3401 - 3408.
- [13] HAMILTON WG, PARKS NL, HUYNH C. Comparison of cup alignment, jump distance, and complications in consecutive series of anterior approach and posterior approach total hip arthroplasty[J]. *J Arthroplasty*, 2015, 30(11): 1959 - 1962.
- [14] JEWETT BA, COLLIS DK. High complication rate with anterior total hip arthroplasties on a fracture table[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469(2): 503 - 507.
- [15] REFAI HF, KASSEM MS. The minimally invasive total hip replacement via the direct anterior approach: a short term clinical and radiological results[J]. *AJM*, 2014, 50 (1): 31 - 36.
- [16] GOULDING K, BEAULE PE, KIM PR, *et al.* Incidence of lateral femoral cutaneous nerve neuropraxia after anterior approach hip arthroplasty [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(9): 2397 - 2404.
- [17] MULLER DA, ZINGG PO, DORA C. Anterior minimally invasive approach for total hip replacement: five-year survivorship and learning curve[J]. *Hip Int*, 2014, 24(3): 277 - 283.
- [18] KO LM. New technology: safety, efficacy, and learning curves[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2014, 472(4): 1080 - 1085.
- [19] DE STEIGER RN, LORIMER M, SOLOMON M. What is the learning curve for the anterior approach for total hip arthroplasty? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(12): 3860 - 3866.
- [20] LEE GC, MARCONI D. Complications following direct anterior hip procedures: costs to both patients and surgeons[J]. *J Arthroplasty*, 2015, 30 (9 Suppl): 98 - 101.
- [21] MAYLE RE, DELLA VALLE CJ. Intra-operative fractures during THA: see it before it sees us[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2012, 94(11 Suppl A): 26 - 31.
- [22] MELMAN WP, MOLLEN BP, KOLLEN BJ, *et al.* First experiences with the direct anterior approach in lateral decubitus position: learning curve and 1 year complication rate[J]. *Hip Int*, 2015, 25(3): 251 - 257.
- [23] RUSSO MW, MACDONELL JR, PAULUS MC, *et al.* Increased complications in obese patients undergoing direct anterior total hip arthroplasty[J]. *J Arthroplasty*, 2015, 30(8): 1384 - 1387.

(收稿日期: 2018 - 02 - 05; 编辑: 段佳)