

SCIEX液相色谱串联质谱系统测定人脑脊液中 β -淀粉样肽浓度

Determination of beta-Amyloid Peptide in Human Cerebrospinal Fluid by SCIEX Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

张卫卫, 荆莲艳, 李国庆

Zhang Weiwei, Jing Lianyan, Li Guoqing

SCIEX China Clinical BU

Keywords: Cerebrospinal fluid, Beta-amyloid peptide, LC-MS/MS

引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是痴呆症最常见的潜在病因, 是一种与衰老相关的进行性神经退行性疾病^[1-3]。预计到2020年患者将会达到2000万, 该病会带来巨大的经济和社会负担, 因此其逐渐成为社会关注的公共卫生问题之一。因此, AD的早期诊断对于减缓其退行性变过程, 启动预防性治疗具有重要意义。

脑脊液中淀粉样 β (Amyloid beta, A β) 肽广泛用于AD的早期诊断^[8-10]。A β 1-40和A β 1-42肽是A β 的主要形式^[4]。此外, A β 1-42/A β 1-38和A β 1-42/A β 1-40的比率, 可能有助于区分AD和其他类型痴呆症。脑脊液被证明是检测AD相关生物标志物的合理来源^[5], 而血浆游离A β 1-40 和 A β 1-42对AD的指示意义不大。

目前A β 肽的分析方法主要包括酶联免疫吸附、免疫亲和纯化色谱、肽吸附色谱、液相色谱串联质谱法等。由于在A β 肽的定量过程中, 有关自身聚集、非特异性结合表面和低内源性浓度的问题仍然具有挑战性。本方法采用微洗脱固相萃取 (SPE), 应用SCIEX液相色谱串联质谱系统, 以待测目标物的同位素标记物为内标, 检测人脑脊液中 β -淀粉样肽 A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42。

实验部分

样品处理:

取200 μ L CSF, 分别加入8 μ L 50%乙腈和10 μ L IS (200 ng/mL), 涡旋混匀, 加入到含有200 μ L 4% H₃PO₄水溶液的1.5 mL 低蛋白吸附离心管 (Eppendorf protein LoBind tube) 使用固相萃取柱 (Oasis[®] MCX μ -Elution Plate, 30 μ m) 富集, 取500 μ L甲醇平衡,

500 μ L 4% H₃PO₄水活化, 加载样品600 μ L脑脊液样品, 50 μ L 洗脱液 (乙腈/氨水/水=75/10/15, v/v/v) 溶液洗脱两次, 收集洗脱液, 经N₂吹干后用50 μ L含0.2%甲酸的50%乙腈水溶液复溶后, 取5 μ L进LC-MS/MS分析^[6]。

色谱条件:

色谱柱使用Atlantis[®] HILIC Silica column (3 μ m, 2.1 \times 50 mm) 进行分离, 流动相选用水 (含0.5% 甲酸) 作为A相, 和乙腈 (含0.5% 甲酸) 作为B相, 柱温设为40 $^{\circ}$ C, 进样量为5 μ L; 进行梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件。

Time min	流速 ml/min	A %	B %
0.00	0.6	20	80
0.50	0.6	20	80
2.00	0.6	60	40
3.00	0.6	60	40
3.01	0.6	20	80
5.00	0.6	20	80

质谱条件:

使用SCIEX QTRAP[®] 6500+质谱系统。采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为65和65 psi, 脱溶剂气温度为600 $^{\circ}$ C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为8 psi; 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为 5500V。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy,

CE)，目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表2。

表2. A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42及内标物MRM离子通道参数。

化合物	电荷状态	离子对 Q1 / Q3 (m/z)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (V)
A β 1-38	[M+5H] ⁵⁺	827.3/801.0	80	21
15N51- A β 1-38	[M+5H] ⁵⁺	837.4/810.5	80	23
A β 1-40	[M+5H] ⁵⁺	867.1/843.7	80	23
15N53- A β 1-40	[M+5H] ⁵⁺	877.4/853.8	80	23
A β 1-42	[M+5H] ⁵⁺	903.9/886.2	55	24
15N55- A β 1-42	[M+5H] ⁵⁺	914.7/896.7	80	25

结果与讨论

图1是血浆样品中A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42的提取离子流色谱图，峰型对称，响应良好。图2是人脑脊液中A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42的提取离子流色谱图，峰型对称，响应良好。

A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42回归方程和线性范围见表3，A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42在0.1~20 ng/mL的浓度范围内线性良好。

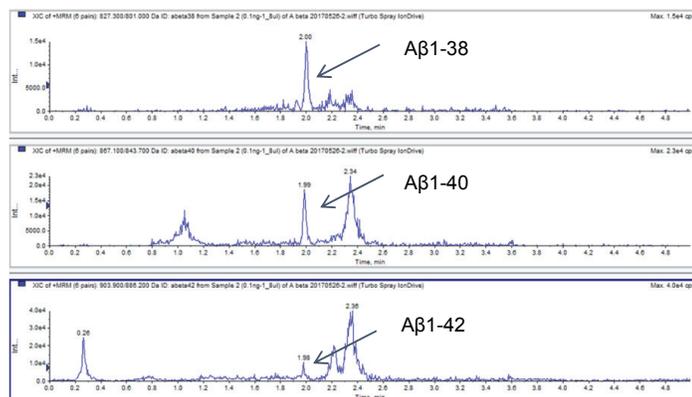
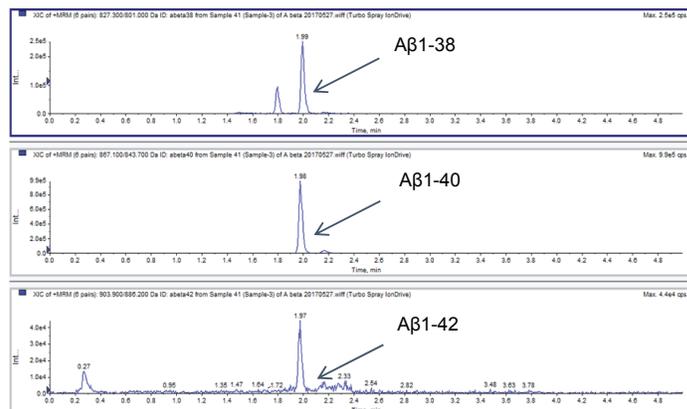


图1. A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42在定量下限LLOQ (0.1 ng/mL)提取离子流图。

表3. A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42回归方程和线性范围。

化合物	回归方程	权重	相关系数 r	线性范围 ng/mL
A β 1-38	$y=0.08233x-0.00106$	$1/x^2$	$r=0.99595$	0.1~20
A β 1-40	$y=0.07141x-5.80733e-4$	$1/x^2$	$r=0.99593$	0.1~20
A β 1-42	$y=0.08763x+0.00162$	$1/x^2$	$r=0.99751$	0.1~20

图2. 是人脑脊液中A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42的提取离子流色谱图。



为了考察方法的重现性及准确性，分别进行A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42的精密度和准确度方法验证。从表4可以看出，A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42低、中、高浓度的精密度 (RSD) 均在10%以内，准确度均在97-107%之内。

表3. A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42的准确度及精密度。

化合物	理论浓度 ng/mL	实测值 ng/mL	准确度 %	精密度 %
A β 1-38	0.25	0.27	107.25	7.20
	2.00	2.02	100.98	3.06
	15.00	15.32	102.14	2.98
A β 1-40	0.25	0.25	98.10	7.54
	2.00	2.02	100.82	3.70
A β 1-42	0.25	0.26	104.01	9.59
	2.00	2.11	105.39	4.97
	15.00	15.22	101.49	3.54

总结

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统，克服了A β 肽的定量过程中，有关自身聚集、非特异性结合表面和低内源性浓度的问题。实现了人脑脊液中 β -淀粉样肽 A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42浓度测定。因此，本方法采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式，可对人脑脊液中 β -淀粉样肽 A β 1-38、A β 1-40 和 A β 1-42进行快速的定性和定量分析。该方法具有线性好、准确度高等优点，且每个样本分析仅需5 min，具有较高的分析通量。

参考文献

- [1] S.K. Singh, S. Srivastav, A.K. Yadav, S. Srikrishna, G. Perry, Overview of Alzheimer's disease and some therapeutic approaches targeting abeta by using several synthetic and herbal compounds, *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2016 (2016) 7361613.
- [2] J. Mattila, H. Soininen, J. Koikkalainen, D. Rueckert, R. Wolz, G. Waldemar, J. Lotjonen, Optimizing the diagnosis of early Alzheimer's disease in mild cognitive impairment subjects, *J. Alzheimer's Disease* 32 (2012) 969–979.
- [3] C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, M. Sczufca, I. Alzheimer's Disease, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study, *Lancet* 366 (2005) 2112–2117.
- [4] K. Blennow, H. Hampel, CSF markers for incipient Alzheimer's disease, *Lancet Neurol.* 2 (2003) 605–613.
- [5] B. Van Broeck, M. Timmers, S. Ramael, J. Bogert, L.M. Shaw, M. Mercken, J. Slemmon, L. Van Nueten, S. Engelborghs, J.R. Streffer, Impact of frequent cerebrospinal fluid sampling on Abeta levels: systematic approach to elucidate influencing factors, *Alzheimer's Res. Therapy* 8 (2016) 21.
- [6] Lin P, Chen W, Yuan F, et al. An UHPLC–MS/MS method for simultaneous quantification of human amyloid beta peptides A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 in cerebrospinal fluid using micro-elution solid phase extraction[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1070: 82-91.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9382-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：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
全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：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
网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835
微博：@SCIEX