



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113533552 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202110637441.2

(22) 申请日 2021.06.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113533552 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(66) 本国优先权数据  
202110614567.8 2021.06.02 CN

(73) 专利权人 杭州凯莱谱精准医疗检测技术有限公司  
地址 310000 浙江省杭州市西湖区三墩镇石祥西路859号紫金启真大厦2号楼701-6室

(72) 发明人 刘鹏云 孔子青 马金飞 袁小芬 刘华芬

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 33283  
专利代理师 向庆宁 曹小燕

(51) Int.Cl.  
G01N 30/02 (2006.01)  
G01N 30/06 (2006.01)  
G01N 30/72 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 112345660 A, 2021.02.09  
CN 112014509 A, 2020.12.01  
US 2016266151 A1, 2016.09.15  
孙明芳 等. 基于血浆醛固酮/肾素浓度比的联合策略在原发性醛固酮增多症中的筛查价值. 《军事医学》. 2015, 第39卷(第4期),

审查员 林粤美

权利要求书5页 说明书13页 附图14页

## (54) 发明名称

液相色谱串联质谱检测肾素活性过程中对影响ARR药物同步检测的方法

## (57) 摘要

本发明提供了一种液相色谱串联质谱检测肾素活性过程中对影响ARR(血浆醛固酮与肾素活性比值)的治疗药物同步检测的方法,在通过液相色谱串联质谱检测血浆肾素活性的同时,实现对影响ARR数值的药物的定性筛查,可用于协助分析判断ARR为阴性、阳性、假阴性、或假阳性。在对样本进行蛋白沉淀的同时,实现对血管紧张素I和43种高血压治疗药物的有效提取;利用液相色谱串联质谱技术的高通量、高特异性、高灵敏度的特性,对提取样本进行包括血管紧张素I以及43种高血压治疗药物等多指标的同时检测;利用筛查药物的MRM质谱参数进行药物的初筛,并根据药物的保留时间进行复核。ARR检测值联合药物筛查结果共同分析,在避免患者停止药物治疗的同时,有效辨别检测的假阳性或假阴性结果,提高实际原发性醛固酮增多症和临床肾素活性检测的准确性,便于临床推广和应用。



1. 液相色谱串联质谱方法检测肾素活性过程中对影响ARR的降压药物的同步定性检测方法,其特征在于,通过检测血浆样本中的血管紧张素I产生速率和影响ARR的高血压治疗药物浓度,可用于结合醛固酮的浓度判断分析ARR的值,分析判断ARR为阴性、阳性、假阴性或假阳性中的一种;所述影响ARR的高血压治疗药物共计43种,分别为:

九种 $\beta$ -受体阻滞剂包括阿罗洛尔、阿替洛尔、比索洛尔、艾司洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、奈必洛尔、普萘洛尔、索他洛尔;

五种排钾利尿药包括布美他尼、呋塞米、氢氯噻嗪、吲达帕胺、托拉塞米;

三种保钾利尿药包括阿米洛利、依普利酮、螺内酯;

十种血管紧张素转换酶抑制剂包括贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、咪达普利、赖诺普利、培哌普利、喹那普利、雷米普利、群多普利;

六种血管紧张素受体拮抗剂包括坎地沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、奥美沙坦、替米沙坦、缬沙坦;

八种钙离子拮抗剂包括氨氯地平、贝尼地平、非洛地平、氟桂利嗪、乐卡地平、尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平;

一种中枢 $\alpha_2$ 受体激动药包括甲基多巴;

一种非甾体类抗炎药包括阿司匹林;所述ARR的计算公式为:ARR=醛固酮的浓度/血管紧张素I产生速率;

所述 $\beta$ -受体阻滞剂、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药、非甾体类抗炎药均能使ARR上升,出现假阳性结果;所述排钾利尿药、保钾利尿药、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、钙离子拮抗剂均能使ARR下降,出现假阴性结果;

分析ARR的值的步骤为:通过临床用药AI指导系统来分析判断ARR为阴性、阳性、假阴性或假阳性中的一种;所述临床用药AI指导系统包括患者信息模块、数据库模块和决策树系统;

所述决策树系统的分析判断方法为:当ARR的检测结果小于30时,如果同时测得患者体内含有能使ARR下降的药物,则可判断为假阴性,需要进一步确诊实验或者进行停药检查;当ARR的检测结果小于30时,如果同时测得患者体内含有能使ARR上升的药物,则可判断为阴性;当ARR的检测结果大于30时,如果同时测得患者体内含有能使ARR上升的药物,则可判断为假阳性,需要进一步确诊实验或者进行停药检查;当ARR的检测结果大于30时,如果同时测得患者体内含有能使ARR下降的药物,则可判断为阳性;

检测43种影响ARR的高血压治疗药物时采用未孵育样本;所述液相的流动相A为0.1%的甲酸水溶液,流动相B相为体积比0.1%甲酸的甲醇溶液,梯度程序如下表所示,

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	0.6	90	10
1	0.6	90	10
2	0.6	5	95
3.2	0.6	5	95
3.25	0.6	90	10
3.8	0.6	90	10

所述醛固酮的检测采用载体液液萃取的方法提取,采用液相色谱串联质谱方法检测。

2.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述信息模块用于记录患者的基本信息;所述数据库模块用于储存ARR的检测结果和高血压治疗药物的检测结果;所述决策树系统根据检测结果自动分析判断ARR指标为阴性、阳性、假阴性或假阳性中的一种。

3.如权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述血管紧张素I产生速率,是通过检测孵育前样本和孵育后样本的血管紧张素I浓度,按照公式:血管紧张素I产生速率=(孵育后血管紧张素I浓度-孵育前血管紧张素I浓度)/孵育时间。

4.如权利要求3所述的检测方法,其特征在于,具体检测步骤为:

(1)样本前处理:1)平行取两份100mL待测样本,分别向样本中加入生成缓冲液并混匀,一份进行孵育,另一份无需孵育直接进行下一步操作;2)向加入生成缓冲液的样本中加入反应终止液并混匀;3)向步骤2)中添加反应终止液的样本中加入含内标的蛋白沉淀剂并涡旋混匀;4)将步骤3)中加入蛋白沉淀剂的样本混匀后离心,取上清液上机检测;

(2)采用高效液相色谱串联质谱系统对上述步骤得到孵育前样本的待检测溶液进行血管紧张素I的检测以及43种影响ARR的高血压治疗药物的筛查;

(3)对于步骤(2)中根据质谱参数筛查结果为阳性药物的样本,需要同时对照“筛查药物混合工作液”中各高血压治疗药物的标准品的保留时间,核对药物筛查结果是否为假阳性,从质谱参数和保留时间两个维度确保药物筛查阳性结果的准确性;

所述含内标的蛋白沉淀剂为:甲醇、硫酸锌水溶液以及血管紧张素I同位素内标,配制成含有内标的蛋白沉降剂;

所述生成缓冲液为:含血管紧张素转换酶抑制剂PMSF(苯甲基磺酰氟)的Tris和EDTA缓冲液;

所述反应终止液为:甲酸或乙酸;

所述筛查药物混合工作液为:用43种影响ARR的高血压治疗药物的标准品配制成检测下限浓度的筛查药物混合工作液。

5.如权利要求4所述的检测方法,其特征在于,所述孵育是指将样本加入生成缓冲液并混匀后,放入37℃水浴3小时;

所述“筛查药物混合工作液”中各高血压治疗药物的标准品的保留时间如下表所示:

药物种类	药物名称	药物英文名	药物检出限 ng/mL	保留时间(min)
保钾利尿药	阿米洛利	Amiloride	25	1.06
CCBs	氨氯地平	Amlodipine	25	2.19
$\beta$ -受体阻滞剂	阿罗洛尔	Arotinolol	5	1.97
非甾体类抗炎药	阿司匹林	aspirin	250	2.33
$\beta$ -受体阻滞剂	阿替洛尔	Atenolol	25	0.65
ACEI	贝那普利	Benazepril	5	2.19
CCBs	贝尼地平	Benidipine	5	2.16
$\beta$ -受体阻滞剂	比索洛尔	Bisoprolol	5	2.05
排钾利尿药	布美他尼	Bumetanide	25	2.29
ARBs	坎地沙坦	Candesartan	25	2.32
ACEI	卡托普利	Captopril	100	1.95
ACEI	依那普利	Enalapril	5	2.1
保钾利尿药	依普利酮	Eplerenone	25	2.16
$\beta$ -受体阻滞剂	艾司洛尔	Esmolol	5	1.98
CCBs	非洛地平	Felodipine	250	2.39
CCBs	氟桂利嗪	Flunarizine	5	2.25
ACEI	福辛普利	Fosinopril	100	2.46
排钾利尿药	呋塞米	Furosemide	250	2.61
排钾利尿药	氢氯噻嗪	Hydrochlorothiazide	250	1.97
ACEI	咪达普利	Imidapril	5	2.13
排钾利尿药	吲达帕胺	Indapamide	25	2.17
ARBs	厄贝沙坦	Irbesartan	5	2.27
$\beta$ -受体阻滞剂	拉贝洛尔	Labetolol	25	2.04
CCBs	乐卡地平	Lercanidipine	5	2.26
ACEI	赖诺普利	Lisinopril	25	1.77
ARBs	氯沙坦	Losartan	5	2.26
中枢 $\alpha_2$ 受体激动药	甲基多巴	Methyldopa	250	0.39
$\beta$ -受体阻滞剂	美托洛尔	Metoprolol	25	1.94
$\beta$ -受体阻滞剂	奈必洛尔	Nebivolol	25	2.2
CCBs	尼卡地平	Nicardipine	5	2.15
CCBs	硝苯地平	Nifedipine	250	2.27
CCBs	尼莫地平	Nimodipine	25	2.34
ARBs	奥美沙坦	Olmesartan	25	2.12
ACEI	培哚普利	Perindopril	5	2.14
$\beta$ -受体阻滞剂	普萘洛尔	Propranolol	25	2.08
ACEI	喹那普利	Quinapril	5	2.22
ACEI	雷米普利	Ramipril	5	2.2
$\beta$ -受体阻滞剂	索他洛尔	Sotalol	25	0.53
保钾利尿药	螺内酯	Spirolactone	250	2.29
ARBs	替米沙坦	Telmisartan	25	2.24
排钾利尿药	托拉塞米	Torasemide	5	2.13
ACEI	群多普利	Trandolapril	5	2.25
ARBs	缬沙坦	Valsartan	100	2.34

6. 如权利要求5所述的检测方法,其特征在于,所述质谱检测时,采用三重四极杆质谱

仪,仪器型号为SCIEX 4500MD,采用电喷雾离子源的正离子模式(ESI+)和多反应监测MRM模式进行质谱检测,相应的质谱检测方法设置如下表所示:

质谱条件	数值
气帘气 CUR	30 psi
雾化气 GS1	50 psi
辅助加热气 GS2	50 psi
离子源加热温度	500 °C
碰撞气 CAD	10 psi
喷雾电压	5500 V

各待测物的质谱参数如下表所示:

Compound	Q1	Q3	Dwell Time	DP	CE	CXP
ANG I-1	433.1	647.6	30	74	24	12
ANG I-2	433.1	619.6	5	87	26	12
ANG I-IS	437.3	660.4	30	70	22	12
Metoprolol	268.1	133	4	90	37	9
Esmolol	296.1	145.1	4	78	38	9
Labetolol	329.2	162	4	78	35	9
Bisoprolol	326.5	116.2	4	96	25	9
Flunarizine	405.2	203	4	79	21	9
Ramipril	417.3	234.1	4	78	29	9
Lercanidipine	612.2	280.2	4	94	31	9
Benazepril	425.2	351.1	4	105	30	9
Quinapril	439.1	234	4	90	27	9
Losartan	423.2	207	4	69	33	9
Trandolapril	431.2	234	4	90	31	9
Telmisartan	515.4	276	4	153	59	9
Nifedipine-1	347.1	315.1	4	79	13	9
Nifedipine-2	347.3	195.1	4	65	58	6
Nicardipine	480.2	315.1	4	78	34	9
Benidipine	506.2	174	4	78	37	9
Torasemide	349.1	264.1	4	63	22	9
Nebivolol	406.1	151	4	105	41	9

Indapamide	366	132	4	78	20	9
Imidapril	406.2	234	4	75	27	9
Eplerenone	415.2	162.9	4	107	28	9
Olmesartan	447.1	207	4	83	37	9
Irbesartan	429.4	206.8	4	108	38	9
Nimodipine	419.2	343.1	4	82	13	9
Valsartan-1	436.3	206.9	4	90	38	9
Valsartan-2	436.4	207.2	4	90	38	4
Felodipine	384	338	4	76	13	9
Spiroinolactone	417.2	341.2	4	90	12	9
Candesartan	441.1	263	4	97	18	9
Atenolol	267.2	145	4	78	35	9
Methyldopa	212	166	4	75	21	9
Amiloride	230.1	170.9	4	69	24	9
Sotalol	273.1	133	4	70	36	9
Arotinolol	372	316.1	4	78	22	9
Lisinopril	406.2	84	4	78	52	9
Enalapril	377.2	234.1	4	70	26	9
Perindopril	369.1	172.1	4	90	31	9
Propranolol	260	116	4	90	24	9
Amlodipine-1	409	237.9	4	69	12	9
Amlodipine-2	409.2	206	4	55	37	10
Fosinopril	564.4	492.2	4	84	11	9
Captopril-1	218.1	116.1	4	73	20	9
Captopril-2	218.2	70	4	70	25	6
Nifedipine Meta-1	331.2	270.2	4	165	47	9
Felodipine Meta	384	320	4	165	47	9
Spiroinolactone Meta	341.1	107.1	4	165	47	9
Telmisartan Meta	691.4	515.4	4	165	47	9
Aspirin-1	163.2	64.9	4	42	39	10
Aspirin-2	163.2	120.8	4	43	17	7
Bumetanide	365.2	240.1	4	128	24	18
Furosemide	331	80.9	4	131	26	8
Hydrochlorothiazide	297.3	98.9	4	168	40	12

## 液相色谱串联质谱检测肾素活性过程中对影响ARR药物同步检测的方法

[0001] 本申请主张中国在先申请,申请号:2021106145678,申请日2021年6月2日的优先权;其所有的内容作为本发明的一部分。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及化学分析技术领域,具体而言,涉及一种原发性醛固酮增多症的定性检测方法,尤其涉及一种血浆醛固酮浓度(PAC)/血浆肾素活性(PRA)的比值ARR的检测及判断方法。

### 背景技术

[0003] 原发性醛固酮增多症(PA,简称原醛症)是一种常见的内分泌性高血压,其特点是肾上腺皮质自主分泌醛固酮,导致体内潴钠排钾,血容量增多,肾素-血管紧张素系统活性受抑制,临床主要表现为高血压和低血钾。

[0004] 血浆醛固酮浓度(PAC)/血浆肾素活性(PRA)的比值ARR是筛查原发性醛固酮增多症的最可靠方法。其中血浆肾素活性是衡量在肾素催化下,外周血中血管紧张素I产生效率的指数,在肾素血管紧张素醛固酮系统(RAAS)所致高血压的分型诊断中有重要意义。

[0005] 2010年由中华医学会内分泌学会牵头,在全国11个省19个中心对1656例难治性高血压患者进行了原醛症的筛查,报道其患病率为7.1%。李启富教授团队发表的研究表明,原醛症在新诊断高血压中的发生率超过4.0%。在2020版《原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识》中将ARR作为原醛症首选筛查指标,且认为对高血压特别是难治性高血压及新诊断高血压人群进行原醛症的筛查对临床工作有着现实的指导意义,并推荐对所有新诊断的高血压患者进行原醛症筛查。

[0006] 在专家共识中进一步指出,ARR数值会受到包括年龄、性别、饮食、服用药物、体位、血钾及肌酐等多种因素的影响,可能导致假阳性或假阴性结果,其中尤其需对使用的治疗药物进行关注。共识要求,ARR的检测须在停用对ARR数值影响较大的药物至少四周时进行,以避免假阳性或假阴性结果;需要特别注意的是ACE抑制剂(ACE-Is)、二氢吡啶钙通道阻滞剂(CCBs)和血管紧张素II受体阻滞剂(ARBs),可通过降低PAC和大幅升高PRA水平从而降低ARR,导致假阴性的检测结果,需停用上述药物至少2周再次进行检测。但由于原醛症经常会引起严重的高血压,因此停药对患者是有潜在危害的。

[0007] ARR测定包括血浆醛固酮(PAC)与血浆肾素活性(PRA),目前普遍采用放射免疫法测定PRA,通过单位时间单位体积内血管紧张素原转变为血管紧张素I的速率间接反映血浆中的肾素活性水平。大多数中心亦采用放射免疫法测定血醛固酮(PAC)。免疫法测定肾素活性和醛固酮含量,存在免疫法固有的特异性差、存在交叉偶联反应等缺陷,而且无法实现对影响ARR数值的高血压治疗药物的筛查,患者需要面临停药检测的风险。

[0008] 因此急需找到一种更简单便利的ARR的检测方法,既能避免患者停止药物治疗,又能有效减低原发性醛固酮增多症检测的假阳性或假阴性结果,提高临床实际ARR和肾素活

性检测的准确性。

### 发明内容

[0009] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了一种液相色谱串联质谱方法检测肾素活性过程中对影响ARR的降压药物的同步定性检测方法,主要在通过液相色谱串联质谱检测血浆肾素活性的同时,实现对影响ARR数值的药物的定性筛查。ARR检测值联合干扰药物筛查结果共同分析,在避免患者停止药物治疗的同时,有效减低检测的假阳性或假阴性结果,提高实际原发性醛固酮增多症和临床肾素活性检测的准确性,便于临床推广和应用。

[0010] 一方面,本发明提供了一种液相色谱串联质谱方法检测肾素活性过程中对影响ARR的降压药物的同步定性检测方法,主要在检测血浆样本中的血管紧张素I含量的同时,实现对血浆中影响ARR的高血压治疗药物的定性筛查,结合阳性筛查药物对ARR的影响,并结合醛固酮的浓度,可用于综合判断分析ARR可能为阴性、阳性、假阴性、或假阳性中的一种。

[0011] 进一步地,所述影响ARR的高血压治疗药物共计43种,包括 $\beta$ -受体阻滞剂九种、排钾利尿药五种、保钾利尿药三种、血管紧张素转换酶抑制剂十种、血管紧张素受体拮抗剂六种、钙离子拮抗剂八种、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药一种以及非甾体类抗炎药一种;所述ARR的计算公式为:ARR=醛固酮的浓度/血管紧张素I产生速率。

[0012] 根据2020版《原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识》,导致ARR假阳性或假阴性的药物原因如下表所示:

因素	对醛固酮影响	对肾素影响	对 ARR 影响
<b>药物因素</b>			
$\beta$ -受体阻滞剂	↓	↓↓	↑(假阳性)
中枢 $\alpha_2$ -受体阻滞剂	↓	↓↓	↑(假阳性)
非甾体类抗炎药	↓	↓↓	↑(假阳性)
排钾利尿剂	→↑	↑↑	↓(假阴性)
潴钾利尿剂	↑	↑↑	↓(假阴性)
ACEI	↓	↑↑	↓(假阴性)
ARB	↓	↑↑	↓(假阴性)
二氢吡啶 CCB	→↓	↑	↓(假阴性)
<b>血钾状态</b>			
低血钾	↓	→↑	↓(假阴性)
高血钾	↑	→↓	↑(假阳性)
<b>钠盐摄入</b>			
低钠饮食	↑	↑↑	↓(假阴性)
高钠饮食	↓	↓↓	↑(假阳性)
年龄增长	↓	↓↓	↑(假阳性)
<b>其他因素</b>			
肾功能不全	→	↓	↑(假阳性)
妊娠	↑	↑↑	↓(假阴性)
肾血管性高血压	↑	↑↑	↓(假阴性)
恶性高血压	↑	↑↑	↓(假阴性)

[0014] 注:ARR:血浆醛固酮与肾素活性比值;ACEI:血管紧张素转换酶抑制剂;ARB:血管紧张素受体拮抗剂;CCB:钙离子拮抗剂

[0015] 且在2020版《原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识》中规定,ARR的测量须在停用对ARR数值影响较大的药物至少四周时进行,以避免假阳性或假阴性结果,对ACEI、ARB以及CCB等药物,需停用至少2周再次进行检测,以避免假阴性结果。但由于原醛症经常会引起严重的高血压,因此停药对患者是有潜在危害的。

[0016] 本发明研究小组经过市场调查,汇集了对ARR产生较大影响并且使用频次较高的43种高血压治疗药物,并建立了其液相色谱串联质谱分析方法,创造性地在肾素活性检测过程中同步检测影响ARR的药物,避免了停药的危险,提高了临床实际ARR判断的准确性,并有效减低原发性醛固酮增多症检测的假阳性或假阴性结果,临床应用意义重大。

[0017] 本发明所涉及的ARR检测过程中的血浆醛固酮浓度(PAC)采用固液萃取(SLE)对血浆样本进行前处理,用液相色谱串联质谱技术进行检测。

[0018] 进一步地,所述影响ARR的高血压治疗药物分别为:

[0019] 所述九种 $\beta$ -受体阻滞剂包括阿罗洛尔、阿替洛尔、比索洛尔、艾司洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、奈必洛尔、普萘洛尔、索他洛尔;

[0020] 所述五种排钾利尿药包括布美他尼、呋塞米、氢氯噻嗪、吲达帕胺、托拉塞米;

[0021] 所述三种保钾利尿药包括阿米洛利、依普利酮、螺内酯;

[0022] 所述十种血管紧张素转换酶抑制剂包括贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、咪达普利、赖诺普利、培哌普利、喹那普利、雷米普利、群多普利;

[0023] 所述六种血管紧张素受体拮抗剂包括坎地沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、奥美沙坦、替米沙坦、缬沙坦;

[0024] 所述八种钙离子拮抗剂包括氨氯地平、贝尼地平、非洛地平、氟桂利嗪、乐卡地平、尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平;

[0025] 所述一种中枢 $\alpha_2$ 受体激动药包括甲基多巴;

[0026] 所述一种非甾体类抗炎药包括阿司匹林。

[0027] 进一步地,所述 $\beta$ -受体阻滞剂、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药、非甾体类抗炎药均能使ARR上升,出现假阳性结果;所述排钾利尿药、保钾利尿药、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、钙离子拮抗剂均能使ARR下降,出现假阴性结果。

[0028]  $\beta$ -受体阻滞剂、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药、非甾体类抗炎药中的任意一种能使患者的醛固酮浓度和肾素活性下降,其中肾素活性下降的程度大于醛固酮浓度下降的程度,从而出现假阳性结果。

[0029] 排钾利尿药或保钾利尿药能使患者的醛固酮浓度和肾素活性上升,其中肾素活性上升的程度大于醛固酮浓度上升的程度;血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、钙离子拮抗剂中的任意一种能使患者的醛固酮浓度下降,肾素活性上升,从而出现假阴性结果。

[0030] 进一步地,所述分析ARR的值的步骤为:通过临床用药AI指导系统来分析判断ARR为阴性、阳性、假阴性、或假阳性中的一种;所述临床用药AI指导系统包括患者信息模块、数据库模块和决策树系统。

[0031] 进一步地,所述信息模块用于记录患者的基本信息;所述数据库模块用于储存ARR

的检测结果和高血压治疗药物的检测结果；所述决策树系统根据检测结果自动分析判断ARR指标为阴性、阳性、假阴性、或假阳性中的一种。

[0032] 进一步地，所述根据检测结果分析判断原发性醛固酮增多症为阴性、阳性、假阴性、或假阳性中的一种时，ARR的判断切点值为30。

[0033] 进一步地，所述决策树系统的分析判断方法为：当ARR的检测结果为略低于30的阴性结果时，如果同时测得患者体内含有能使ARR下降的药物，则患者可能为假阴性，需停药复检或进一步进行原醛确诊实验；当ARR的检测结果为低于30的阴性结果时，如果同时测得患者体内含有能使ARR上升的药物，则可判断为阴性；当ARR的检测结果为高于30的阳性结果时，如果同时测得患者体内含有能使ARR上升的药物，则患者可能为假阳性，需停药复检或进一步进行原醛确诊实验；当ARR的检测结果为高于30的阳性结果时，如果同时测得患者体内含有能使ARR下降的药物，则可判断为阳性。

[0034] 进一步地，所述血管紧张素I产生速率，是通过检测孵育前样本和孵育后样本的血管紧张素I浓度，按照公式：血管紧张素I产生速率 = (孵育后血管紧张素I浓度 - 孵育前血管紧张素I浓度) / 孵育时间；

[0035] 进一步地，原发性醛固酮增多症的定性检测方法的具体检测步骤为：

[0036] (1) 样本前处理：1) 平行取两份100 $\mu$ L待测样本，分别向样本中加入生成缓冲液并混匀，一份进行孵育，另一份无需孵育直接进行下一步操作；2) 向加入生成缓冲液的样本中加入反应终止液并混匀；3) 向步骤2)中添加反应终止液的样本中加入含内标的蛋白沉淀剂并涡旋混匀；4) 将步骤3)中加入蛋白沉淀剂的样本混匀后离心，取上清液上机检测；

[0037] (2) 采用高效液相色谱串联质谱系统对上述步骤得到的待检测溶液进行血管紧张素I的检测以及利用未孵育样本同步进行43种影响ARR的高血压治疗药物的筛查；

[0038] (3) 对于步骤(2)中根据治疗物质谱参数筛查结果为阳性的样本，需要同时对照“筛查药物混合工作液”中各高血压治疗药物的标准品的保留时间，核对药物筛查结果是否为假阳性，确保药物筛查阳性结果的准确性；

[0039] 所述含内标的蛋白沉淀剂为：使用甲醇、硫酸锌水溶液以及血管紧张素I同位素内标，配制成含有内标的蛋白沉降剂；

[0040] 所述生成缓冲液为：含PMSF的Tris和EDTA缓冲液；

[0041] 所述反应终止液为：甲酸或乙酸；

[0042] 所述筛查药物混合工作液为：用43种影响ARR的高血压治疗药物的标准品配制成检测下限浓度的筛查药物混合工作液。

[0043] 进一步地，标准曲线配制：用血管紧张素I的标准品配制成为不同浓度的标准曲线；

[0044] 目前ARR的检测普遍采用放射免疫法，由于放免法无法通过单次检测实现对多种治疗药物的筛查，如果患者在进行ARR检测前没有依据规定进行停药，则难以评估降压药物对于ARR检测的影响。

[0045] 本发明经过大量研究证明，通过液相色谱串联质谱检测血浆肾素活性(PRA)时，可同步检测影响ARR的43种高血压治疗药物，一步法即可实现对ARR的更为精准的判断，并且无需停药，大量临床实验证明，检测结果准确可信，非常值得临床大规模推广应用。

[0046] 本发明在进行肾素活性定量检测以及对影响ARR的高血压治疗药物同步检测过程

中,利用蛋白沉淀方法对样本进行前处理,在对样本进行蛋白沉淀的同时,同步实现对血管紧张素I和高血压治疗药物的有效提取;再利用液相色谱串联质谱技术的高通量特性,对提取样本进行多指标的同时检测,检测血管紧张素I含量的同时,对影响ARR的四十三种治疗药物进行有效筛查。ARR检测值联合干扰药物筛查结果共同分析,在避免患者停止药物治疗的同时,有效减低检测的假阳性或假阴性结果,提高ARR判断的准确性。

[0047] 本发明提供的检测方法所需样本量少,100 $\mu$ L血浆样本即可检测孵育前血浆中的血管紧张素I含量并对影响ARR数值的多种降压药物进行定性筛查。

[0048] 本发明提供的检测方法的前处理只需通过蛋白沉淀即可得到待测溶液,无需进行复杂的液液萃取或者SPE过程,避免复杂前处理导致的不同特性筛查药物的提取率减低,即可实现样本的高通量处理及检测。

[0049] 进一步地,所述孵育是指将样本加入生成缓冲液并混匀后,放入37 $^{\circ}$ C水浴3小时;检测43种影响ARR的高血压治疗药物时采用未孵育样本;所述液相的流动相A为0.1%的甲酸水溶液,流动相B相为体积比0.1%甲酸的甲醇溶液,进行梯度洗脱。

[0050] 进一步地,所述质谱检测时,采用三重四极杆质谱仪,仪器型号为SCIEX 4500MD,采用电喷雾离子源的正离子模式(ESI+)和多反应监测MRM模式进行质谱检测。

[0051] 本发明提供的检测方法,对每个样本的液质分析时间只有3.8分钟,检测效率高。

[0052] 对于根据质谱MRM参数筛查结果为阳性的药物,与“筛查药物混合工作液”中药物标品的保留时间进行比对,确保阳性筛查结果的准确性。

[0053] 另一方面,本发明提供了一种肾素活性的检测方法,主要采用通过如上所述的检测血浆样本中的血管紧张素I产生速率、影响ARR的高血压治疗药物的定性筛查,根据检测结果分析判断肾素活性的实际含量。

[0054] 再一方面,本发明提供了一种液相色谱串联质谱检测血浆样本肾素活性并同步检测影响ARR的43种高血压药物的方法用于临床判断ARR值和肾素活性实际含量的用途。

[0055] 由于 $\beta$ -受体阻滞剂、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药、非甾体类抗炎药中的任意一种都能使患者的肾素活性下降;排钾利尿药或保钾利尿药能使患者的肾素活性上升;血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、钙离子拮抗剂中的任意一种能使患者的肾素活性上升。因此通过液相色谱串联质谱检测血浆样本肾素活性并同步检测影响ARR的43种高血压药物的方法,在避免停药的情况下,除了定性判断ARR值外,同时也能为肾素活性实际含量提供更为准确的判断。

[0056] 本发明具有以下有益效果:

[0057] (1) 进行肾素活性(PRA)检测的同时,实现对影响ARR数值的43种高血压治疗药物的定性筛查,ARR检测数值联合干扰药物筛查结果共同分析,在避免患者停止药物治疗的同时,有效减低ARR检测的假阳性或假阴性结果,提高实际临床肾素活性检测的准确性,便于临床推广和应用。

[0058] (2) 在进行肾素活性检测过程中,利用蛋白沉淀方法对样本进行前处理,在对样本进行蛋白沉淀的同时,还能同步实现对血管紧张素I和43种高血压治疗药物的有效提取,从而进行同步检测。前处理只需通过蛋白沉淀即可得到待测溶液,无需进行复杂的液液萃取或者SPE过程,避免复杂前处理导致的不同特性筛查药物的提取率减低。

[0059] (3) 利用液相色谱串联质谱技术的高通量、高特异性、高灵敏度的特性,对提取样

本进行多指标的同步检测,检测血管紧张素I含量的同时,对影响ARR的四十三种治疗药物进行有效筛查。

[0060] (4) 所需样本量少,100 $\mu$ L血浆样本即可检测孵育前血浆中的血管紧张素I含量并对影响ARR数值的43种高血压治疗药物进行定性筛查。

[0061] (5) 检测过程中,进行血管紧张素I定量检测的同时,利用筛查药物的MRM质谱参数进行治疗药物的初筛,对于初筛结果阳性的药物,同时对照“筛查药物混合工作液”中各治疗药物的保留时间,进行阳性检出结果的复核,确保药物筛查结果的准确性。

[0062] (6) 每个样本的液质分析时间只有3.8分钟,检测效率高。

[0063] (7) 可为原醛症治疗药物筛查提供高效、准确的筛查方式,为临床的诊断提供切实可靠的依据。

### 附图说明

[0064] 图1为实施例1中的样本检测流程图

[0065] 图2-13为实施例1中的43种影响ARR的高血压药物的检测图谱

[0066] 图14为实施例1中的醛固酮的检测图谱

[0067] 图15为实施例1中的血浆原醛筛查报告单

### 具体实施方式

[0068] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细描述,需要指出的是,以下所述实施例旨在便于对本发明的理解,而对其不起任何限定作用。本实施例中使用的试剂均为已知产品,通过购买市售产品获得。

[0069] 实施例1:本发明提供的ARR的定性检测方法

[0070] 一、溶液配制:

[0071]  $ZnSO_4$ 溶液的配制:称取3.56克 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,将其溶于40mL水中,配成89mg/mL的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 水溶液。可按照需要按比例调节体积,室温储存。

[0072] 生成缓冲液:12.11g三羟甲基氨基甲烷(TRIS)和7.4g乙二胺四乙酸EDTA到100mL容量瓶中,加入去离子水到90mL,超声30min至溶解均匀。加入去离子水到刻度线,混匀。转移到聚丙烯材质的储存容器。用乙酸调节PH到5.45-5.50之间,-20 $^{\circ}C$ 储存。在检测分析当天配置,将100 $\mu$ L的100mM PMSF(0.174g PMSF溶于10mL甲醇)溶液加入到10mL生成缓冲液中配制成为生成缓冲液(pH值5.4-5.6)。

[0073] 反应终止液:甲酸或乙酸。

[0074] 含内标的蛋白沉淀剂:吸取50 $\mu$ L 1 $\mu$ g/mL的血管紧张素I内标储备液(甲醇:水1:1),以及100 $\mu$ L 89mg/mL的硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )水溶液,置于10mL的离心管中,并向其中加入9850 $\mu$ L甲醇,混匀,即得含血管紧张素I内标的蛋白沉淀剂。

[0075] 筛查药物混合工作液:将43种待测药物标准品及部分代谢物标准品溶于DMSO配制成为相应的母液,并依据“影响ARR数值的药物筛查列表及检出限”列表中的检出限浓度,配制成为检出限浓度的筛查药物混合工作液。

[0076] 二.样本检测:

[0077] 检测流程图如图1所示。

[0078] (1) 试剂准备:首先向两块干净的1.2mL 96孔收集板中加入20 $\mu$ L的生成缓冲液,用于后续的样本前处理。

[0079] (2) 样本解冻:待测血浆样本置于冰水(0 $^{\circ}$ C)解冻至融化。

[0080] (3) 取样:平行取2份100 $\mu$ L的血浆样本转移至步骤(1)中准备好的两块板中,分别进行未孵育和孵育样本的检测,剩余样本立即放入-20 $^{\circ}$ C冷冻,其中药物筛查采用未孵育样本进行)。

[0081] (4) 孵育样本的处理:将步骤(3)其中一批样本用硅胶垫封好,短暂涡旋,然后放入37 $^{\circ}$ C水浴3小时,3小时后,加入12 $\mu$ L反应终止液甲酸,涡旋,再加入200 $\mu$ L含有5ng/mL血管紧张素I同位素内标ANG I- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 的内标工作液,涡旋混匀,随后在4 $^{\circ}$ C15000rpm离心10分钟,取上清液100 $\mu$ L加入96孔进样板,进液相色谱串联质谱仪分析(大量研究数据证明,药物筛查过程不能用孵育样本,检测结果不准确或难以检出,具体实验数据略,此处的孵育样本仅供肾素活性计算用)。

[0082] (5) 未孵育的样本处理:将步骤(3)中剩下的另一批样本用密封垫封好后涡旋混匀。立即加入12 $\mu$ L反应终止液甲酸,涡旋,再加入200 $\mu$ L含血管紧张素I同位素内标的内标工作液,涡旋混匀,随后在4 $^{\circ}$ C15000rpm离心10分钟,取上清液100 $\mu$ L加入96孔进样板,进液相色谱串联质谱仪进样分析(药物筛查过程采用此步骤的未孵育样本,未孵育样本既供肾素活性计算使用,又可进行干扰ARR的药物筛查用)。

[0083] (6) 计算肾素活性:肾素活性等于血管紧张素I的产生速率,其单位为ng/mL/hr,计算公式为:(孵育后血管紧张素I浓度-孵育前血管紧张素I浓度)/孵育时间。

[0084] (7) 进行液相色谱串联质谱分析时,液相色谱采用梯度洗脱,反相色谱法建立待测物的分离条件如下:色谱柱为Phenomenex C18(2.6 $\mu$ m,50\*2.1mm),流速为0.6mL/min,柱温为40 $^{\circ}$ C;其中流动相A相为体积比0.1%的甲酸水溶液,流动相B相为体积比0.1%甲酸的甲醇溶液,流动相A和流动相B的体积比为90~5%:10~95%。梯度程序如表1所示,血管紧张素I及其同位素内标的保留时间分别为:1.92min。

[0085] 表1、梯度洗脱程序

时间(min)	流速(mL/min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	0.6	90	10
1	0.6	90	10
2	0.6	5	95
3.2	0.6	5	95
3.25	0.6	90	10
3.8	0.6	90	10

[0087] 所述“筛查药物混合工作液”中各高血压治疗药物的标准品的保留时间如表2所示:

[0088] 表2、高血压治疗药物的标准品的保留时间

[0089]

药物种类	药物名称	药物英文名	药物检出限 (ng/mL)	保留时间(min)
保钾利尿药	阿米洛利	Amiloride	25	1.06
CCBs	氨氯地平	Amlodipine	25	2.19
$\beta$ -受体阻滞剂	阿罗洛尔	Arotinolol	5	1.97
非甾体类抗炎药	阿司匹林	aspirin	250	2.33
$\beta$ -受体阻滞剂	阿替洛尔	Atenolol	25	0.65
ACEI	贝那普利	Benazepril	5	2.19
CCBs	贝尼地平	Benidipine	5	2.16
$\beta$ -受体阻滞剂	比索洛尔	Bisoprolol	5	2.05
排钾利尿药	布美他尼	Bumetanide	25	2.29
ARBs	坎地沙坦	Candesartan	25	2.32
ACEI	卡托普利	Captopril	100	1.95
ACEI	依那普利	Enalapril	5	2.1
保钾利尿药	依普利酮	Eplerenone	25	2.16
$\beta$ -受体阻滞剂	艾司洛尔	Esmolol	5	1.98
CCBs	非洛地平	Felodipine	250	2.39
CCBs	氟桂利嗪	Flunarizine	5	2.25
ACEI	福辛普利	Fosinopril	100	2.46
排钾利尿药	呋塞米	Furosemide	250	2.61
排钾利尿药	氢氯噻嗪	Hydrochlorothiazide	250	1.97
ACEI	咪达普利	Imidapril	5	2.13
排钾利尿药	吲达帕胺	Indapamide	25	2.17
ARBs	厄贝沙坦	Irbesartan	5	2.27
$\beta$ -受体阻滞剂	拉贝洛尔	Labetolol	25	2.04
CCBs	乐卡地平	Lercanidipine	5	2.26
ACEI	赖诺普利	Lisinopril	25	1.77
ARBs	氯沙坦	Losartan	5	2.26
中枢 $\alpha_2$ 受体激动药	甲基多巴	Methyldopa	250	0.39
$\beta$ -受体阻滞剂	美托洛尔	Metoprolol	25	1.94
$\beta$ -受体阻滞剂	奈必洛尔	Nebivolol	25	2.2
CCBs	尼卡地平	Nicardipine	5	2.15
CCBs	硝苯地平	Nifedipine	250	2.27
CCBs	尼莫地平	Nimodipine	25	2.34
ARBs	奥美沙坦	Olmесartan	25	2.12

[0090]	ACEI	培哚普利	Perindopril	5	2.14
	$\beta$ -受体阻滞剂	普萘洛尔	Propranolol	25	2.08
	ACEI	喹那普利	Quinapril	5	2.22
	ACEI	雷米普利	Ramipril	5	2.2
	$\beta$ -受体阻滞剂	索他洛尔	Sotalol	25	0.53
	保钾利尿药	螺内酯	Spironolactone	250	2.29
	ARBs	替米沙坦	Telmisartan	25	2.24
	排钾利尿药	托拉塞米	Torsemide	5	2.13
	ACEI	群多普利	Trandolapril	5	2.25
	ARBs	缬沙坦	Valsartan	100	2.34

[0091] 进行质谱检测时,采用三重四极杆质谱仪进行孵育前后的血管紧张素I定量检测和降压药物定性筛查,仪器型号为SCIEX 4500MD,采用电喷雾离子源的正离子模式(ESI+)和多反应监测MRM模式进行质谱检测,相应的质谱检测方法设置如表3和表4所示:

[0092] 表3、质谱检测参数设置

	质谱条件	数值
[0093]	气帘气 CUR	30 psi
	雾化气 GS1	50 psi
	辅助加热气 GS2	50 psi
	离子源加热温度	500 °C
	碰撞气 CAD	10 psi
	喷雾电压	5500 V

[0094] 表4、各待测物的质谱参数

	Compound	Q1	Q3	Dwell Time	DP	CE	CXP
[0095]	ANG I-1	433.1	647.6	30	74	24	12
	ANG I-2	433.1	619.6	5	87	26	12
	ANG I-IS	437.3	660.4	30	70	22	12
	Metoprolol	268.1	133	4	90	37	9
	Esmolol	296.1	145.1	4	78	38	9
	Labetolol	329.2	162	4	78	35	9
	Bisoprolol	326.5	116.2	4	96	25	9
	Flunarizine	405.2	203	4	79	21	9
	Ramipril	417.3	234.1	4	78	29	9
	Lercanidipine	612.2	280.2	4	94	31	9
	Benazepril	425.2	351.1	4	105	30	9
	Quinapril	439.1	234	4	90	27	9
	Losartan	423.2	207	4	69	33	9
	Trandolapril	431.2	234	4	90	31	9
	Telmisartan	515.4	276	4	153	59	9

	Nifedipine-1	347.1	315.1	4	79	13	9
	Nifedipine-2	347.3	195.1	4	65	58	6
	Nicardipine	480.2	315.1	4	78	34	9
	Benidipine	506.2	174	4	78	37	9
	Torasemide	349.1	264.1	4	63	22	9
	Nebivolol	406.1	151	4	105	41	9
	Indapamide	366	132	4	78	20	9
	Imidapril	406.2	234	4	75	27	9
	Eplerenone	415.2	162.9	4	107	28	9
	Olmesartan	447.1	207	4	83	37	9
	Irbesartan	429.4	206.8	4	108	38	9
	Nimodipine	419.2	343.1	4	82	13	9
	Valsartan-1	436.3	206.9	4	90	38	9
	Valsartan-2	436.4	207.2	4	90	38	4
	Felodipine	384	338	4	76	13	9
	Spiroinolactone	417.2	341.2	4	90	12	9
	Candesartan	441.1	263	4	97	18	9
	Atenolol	267.2	145	4	78	35	9
	Methyldopa	212	166	4	75	21	9
[0096]	Amiloride	230.1	170.9	4	69	24	9
	Sotalol	273.1	133	4	70	36	9
	Arotinolol	372	316.1	4	78	22	9
	Lisinopril	406.2	84	4	78	52	9
	Enalapril	377.2	234.1	4	70	26	9
	Perindopril	369.1	172.1	4	90	31	9
	Propranolol	260	116	4	90	24	9
	Amlodipine-1	409	237.9	4	69	12	9
	Amlodipine-2	409.2	206	4	55	37	10
	Fosinopril	564.4	492.2	4	84	11	9
	Captopril-1	218.1	116.1	4	73	20	9
	Captopril-2	218.2	70	4	70	25	6
	Nifedipine Meta-1	331.2	270.2	4	165	47	9
	Felodipine Meta	384	320	4	165	47	9
	Spiroinolactone Meta	341.1	107.1	4	165	47	9
	Telmisartan Meta	691.4	515.4	4	165	47	9
	Aspirin-1	163.2	64.9	4	42	39	10
	Aspirin-2	163.2	120.8	4	43	17	7
	Bumetanide	365.2	240.1	4	128	24	18
	Furosemide	331	80.9	4	131	26	8
	Hydrochlorothiazide	297.3	98.9	4	168	40	12

[0097] 43种影响ARR的高血压药物的检测图谱如图2-13所示,其中图2为保钾利尿药阿米洛利(Amiloride)、CCB药物氨氯地平(Amlodipine)、 $\beta$ 受体阻滞剂阿罗洛尔(Arotinolol)和非甾体类抗炎药阿司匹林(Aspirin)的检测谱图;图3为 $\beta$ 受体阻滞剂阿替洛尔

(Atenolol)、ACEI药物贝那普利(Benazepril)、CCB药物贝尼地平(Benidipine)和 $\beta$ 受体阻滞剂贝索洛尔(Bisoprolol)的检测谱图;图4为排钾利尿药布美他尼(Bumetanide)、ARB药物坎地沙坦(Candesartan)、ACEI药物卡托普利(Captopril)和ACEI药物依那普利(Enalapril)的检测谱图;图5为保钾利尿药依普利酮(Eplerenone)、 $\beta$ 受体阻滞剂艾司洛尔(Esmolol)、CCB药物非洛地平(Felodipine)和CCB药物氟桂利嗪(Flunarizine)的检测谱图;图6为ACEI药物福辛普利(Fosinopril)、排钾利尿药呋塞米(Furosemide)、排钾利尿药氢氯噻嗪(Hydrochlorothiazide)和ACEI药物咪达普利(Imidapril)的检测谱图;图7为排钾利尿药吲达帕胺(Indapamide)、ARB药物厄贝沙坦(Irbesartan)、 $\beta$ 受体阻滞剂拉贝洛尔(Labetolol)和CCB药物乐卡地平(Lercanidipine)的检测谱图;图8为ACEI药物赖诺普利(Lisinopril)、ARB药物氯沙坦(Losartan)、中枢 $\alpha_2$ 受体激动药甲基多巴(Methyldopa)和 $\beta$ 受体阻滞剂美托洛尔(Metoprolol)的检测谱图;图9为 $\beta$ 受体阻滞剂奈必洛尔(Nebivolol)、CCB药物硝苯地平代谢物(Nifedipine)、CCB药物硝苯地平(Nifedipine)和CCB药物尼卡地平(Nicardipine)的检测谱图;图10为ARB药物奥美沙坦(Olmesartan)、CCB药物尼莫地平(Nimodipine)、 $\beta$ 受体阻滞剂普萘洛尔(Propranolol)和ACEI药物培哚普利(Perindopril)的检测谱图;图11为ACEI药物雷米普利(Ramipril)、ACEI药物喹那普利(Quinapril)、 $\beta$ 受体阻滞剂索他洛尔(Sotalol)和保钾利尿药螺内酯(Spironolactone)的检测谱图;图12为保钾利尿药螺内酯(Spironolactone)代谢物、ARB药物替米沙坦(Telmisartan)、排钾利尿药托拉塞米(Torasemide)和ACEI药物群多普利(Trandolapril)的检测谱图;图13为ARB药物缬沙坦(Valsartan)、血管紧张素I(Ang I)和血管紧张素I同位素内标(Ang I 13C15N)的检测谱图。其中43种影响ARR的高血压药物的检测图谱的X、Y轴坐标与图2中的保钾利尿药阿米洛利(Amloride)的检测图谱的X、Y轴坐标一致。

[0098] (8) 醛固酮的检测:血浆中醛固酮检测的样本前处理过程,采用载体液液萃取的方法提取,采用液相色谱串联质谱方法检测,具体步骤如下:移取300-450 $\mu$ L血浆,加入50 $\mu$ L醛固酮内标溶液,上样至SLE板,静置十分钟,用乙酸乙酯与正己烷混合溶剂(1:1)1.5mL进行洗脱。洗脱液吹干后,复溶样本并用液相色谱串联质谱仪进行检测,采用ESI+检测模式,醛固酮Aldosterone定量MRM离子对为361.3/315.1;醛固酮内标Aldosterone-d8的MRM离子对为369.4/323.1;代表性检测谱图如图14所示。大量研究证明,醛固酮的前处理与检测过程无法同步筛查43种影响ARR的药物,检测结果不准确或难以检出,其原因可能是由于前处理过程不适于43种影响ARR的药物的提取,实验数据略。

[0099] (9) 药物筛查检测报告:在血浆原醛筛查报告单(如图15所示)中,汇总导致ARR假阳性或假阴性的药物因素筛查结果,临床结合ARR数值以及药物筛查结果,可有效排除部分由于药物干扰引起的假阳性或假阴性结果。

[0100] 实施例2:假阴性临床样本检测验证

[0101] 本实施例对临床样本进行检测验证,采用如实施例1提供的检测方法进行ARR的检测和定性判断,临床样本的检测结果如表5所示。

[0102] 表5、临床样本检测结果

项目	结果	计量单位	参考区间
[0103] 醛固酮[ALD]	222.46	pg/ml	≥18岁: 立位 8:00-10:00 A.M. ≤280, 4:00-6:00 P.M. ≤210; 卧位 8:00-10:00 A.M. 30-160
醛固酮/肾素活性比值[ARR]	28.78		
血管紧张素 I(孵育后)	2.52	ng/ml	
血管紧张素 I(孵育前)	0.21	ng/ml	
肾素活性[PRA]	0.77	ng/ml/h	0.25-5.82

[0104] 根据样本的以上检测结果,ARR小于疾病诊断的切点值(30),因此,此样本的患者应判定为阴性。但是,结合表6中患者降压药物的筛查结果,ARB及CCB药物检测阳性,二者皆可导致ARR检测的假阴性,综合评价,尽管此患者样本ARR结果低于切点值,仍可能为阳性患者,建议进一步进行确诊实验。

[0105] 表6、患者的药物筛查结果

药物因素	筛查结果	药物名称	对醛固酮的影响	对肾素的影响	对ARR的影响
β-受体阻滞剂	-	无	↓	↓↑	↑(假阳性)
中枢α2受体阻滞剂	-	无	↓	↓↓	↑(假阳性)
非甾体类抗炎药	-	无	↓	↓↓	↑(假阳性)
排钾利尿药	-	无	→↑	↑↑	↓(假阴性)
潴钾利尿药	-	无	↑	↑↑	↓(假阴性)
ACEI	-	无	↓	↑↑	↓(假阴性)
ARBs	+	缬沙坦	↓	↑↑	↓(假阴性)
二氢吡啶CCBs	+	氨氯地平	→↓	↑	↓(假阴性)

[0107] 经卡托普利确诊实验确诊,该患者确实为原发性醛固酮增多症的阳性患者。

[0108] 实施例3:假阳性临床样本检测验证

[0109] 本实施例对临床样本进行检测验证,采用如实施例1提供的检测方法进行ARR的检测和定性判断,临床样本的检测结果如表7所示。

[0110] 表7、临床样本检测结果

项目	结果	计量单位	参考区间
[0111] 醛固酮[ALD]	134.32	pg/ml	≥18岁: 立位 8:00-10:00 A.M. ≤280, 4:00-6:00 P.M. ≤210; 卧位 8:00-10:00 A.M. 30-160
醛固酮/肾素活性比值[ARR]	33.58		
血管紧张素 I(孵育后)	1.20	ng/ml	
血管紧张素 I(孵育前)	<0.2	ng/ml	
肾素活性[PRA]	0.40	ng/ml/h	0.25-5.82

[0112] 根据样本的以上检测结果,ARR大于疾病诊断的切点值(30),因此,此样本的患者应判定为阳性。但是,结合表8中患者降压药物的筛查结果,β-受体阻滞剂及中枢α2受体激动药检测阳性,二者皆可导致ARR检测的假阳性,综合评价,尽管此患者样本ARR结果高于切点值,仍可能为阴性,建议进一步进行确诊实验。

[0113] 表8、患者的药物筛查结果

[0114]	药物因素	筛查结果	药物名称	对醛固酮的影响	对肾素的影响	对ARR的影响
	$\beta$ -受体阻滞剂	+	美托洛尔	↓	↓↓	↑(假阳性)
	中枢 $\alpha$ 2受体阻滞剂	+	甲基多巴	↓	↓↓	↑(假阳性)
	非甾体类抗炎药	-	-	↓	↓↓	↑(假阳性)
	排钾利尿药	-	-	→↑	↑↑	↓(假阴性)
	潴钾利尿药	-	-	↑	↑↑	↓(假阴性)
	ACEI	-	-	↓	↑↑	↓(假阴性)
	ARBs	-	-	↓	↑↑	↓(假阴性)
	二氢吡啶CCBs	-	-	→↓	↑	↓(假阴性)

[0115] 经卡托普利确诊实验证实,该患者确实为阴性患者。

[0116] 实施例4:阳性临床样本检测验证

[0117] 本实施例对临床样本进行检测验证,采用如实施例1提供的检测方法进行ARR的检测和定性判断,临床样本的检测结果显示如表9所示。

[0118] 表9、临床样本检测结果

项目	结果	计量单位	参考区间
醛固酮[ALD]	201.53	pg/ml	≥18岁: 立位 8:00-10:00 A.M. ≤280, 4:00-6:00 P.M. ≤210; 卧位 8:00-10:00 A.M. 30-160
醛固酮/肾素活性比值[ARR]	49.15		
血管紧张素 I(孵育后)	1.58	ng/ml	
血管紧张素 I(孵育前)	0.35	ng/ml	
肾素活性[PRA]	0.41	ng/ml/h	0.25-5.82

[0120] 根据样本的以上检测结果,ARR大于疾病诊断的切点值(30),因此,此样本的患者应判定为阳性。同时结合表10中患者降压药物的筛查结果,ARB及排钾利尿药的检测阳性,二者皆可导致ARR检测的假阴性,综合评价,此患者样本在服用能导致假阴性的ARB及排钾利尿药物后,ARR结果仍然高于切点值,则患者可能为阳性样本,可无需停药,进行确诊实验。

[0121] 表10、患者的药物筛查结果

[0122]	药物因素	筛查结果	药物名称	对醛固酮的影响	对肾素的影响	对ARR的影响
	$\beta$ -受体阻滞剂	-	-	↓	↓↓	↑(假阳性)
	中枢 $\alpha$ 2受体阻滞剂	-	-	↓	↓↓	↑(假阳性)
	非甾体类抗炎药	-	-	↓	↓↓	↑(假阳性)
	排钾利尿药	+	氢氯噻嗪	→↑	↑↑	↓(假阴性)
	潴钾利尿药	-	-	↑	↑↑	↓(假阴性)
	ACEI	-	-	↓	↑↑	↓(假阴性)
	ARBs	+	坎地沙坦	↓	↑↑	↓(假阴性)
	二氢吡啶CCBs	-	-	→↓	↑	↓(假阴性)

[0123] 虽然本发明披露如上,但本发明并非限定于此。任何本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和范围内,均可作各种更动与修改,因此本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。

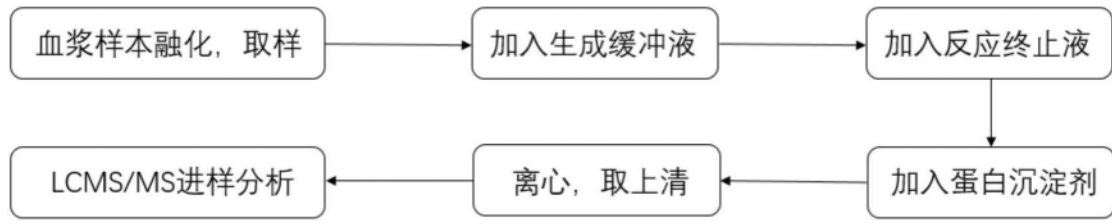


图1

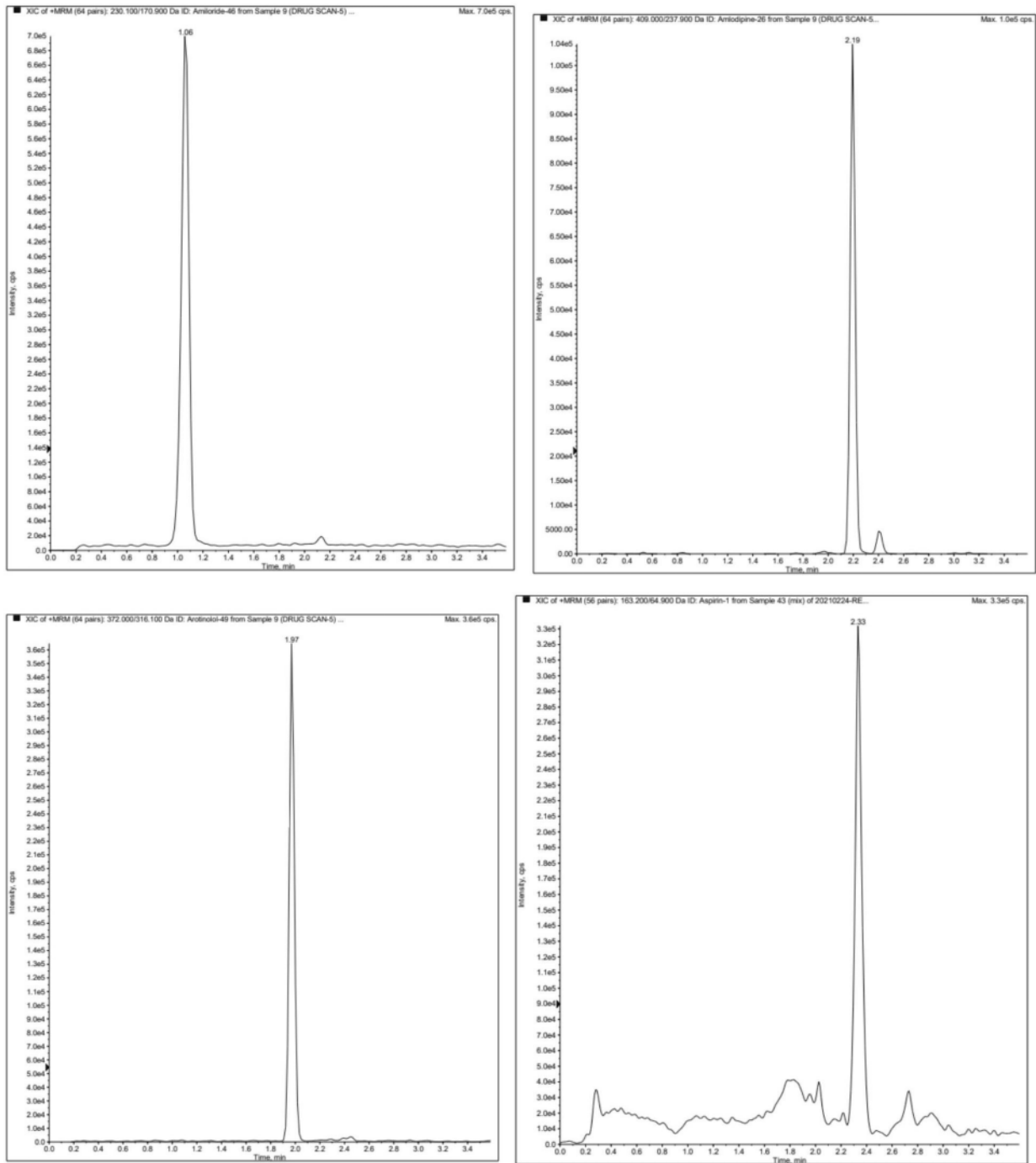


图2

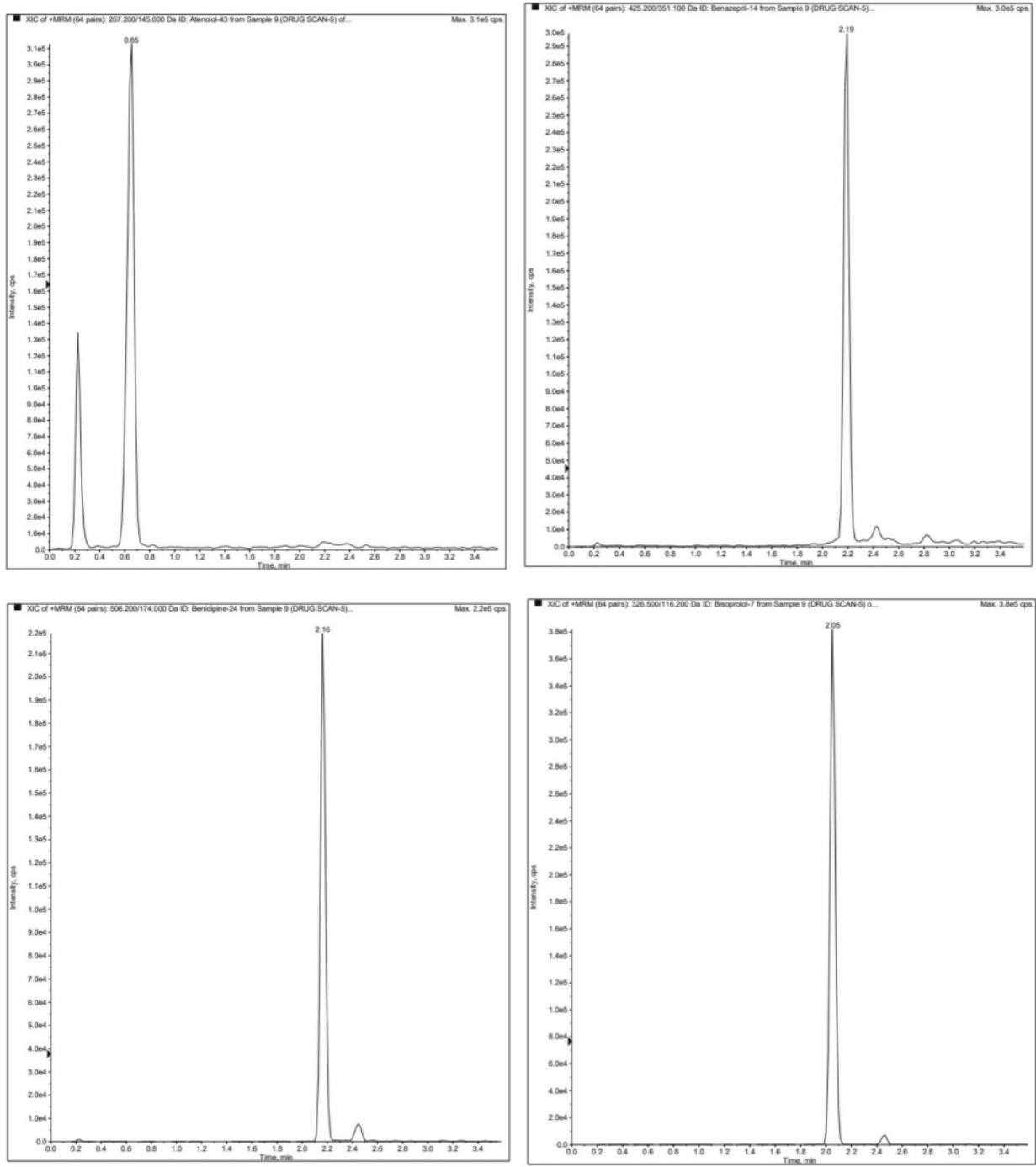


图3

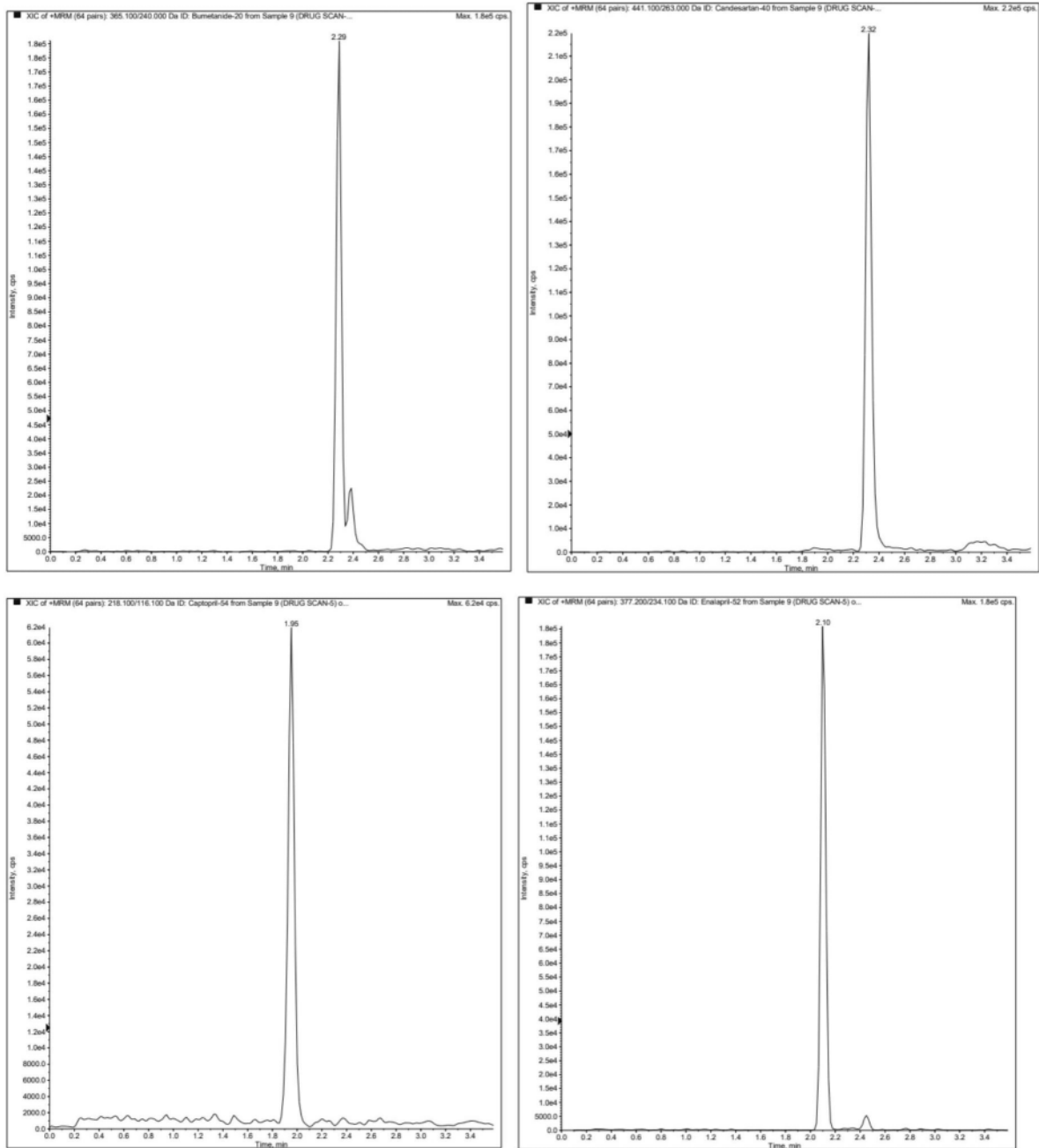


图4

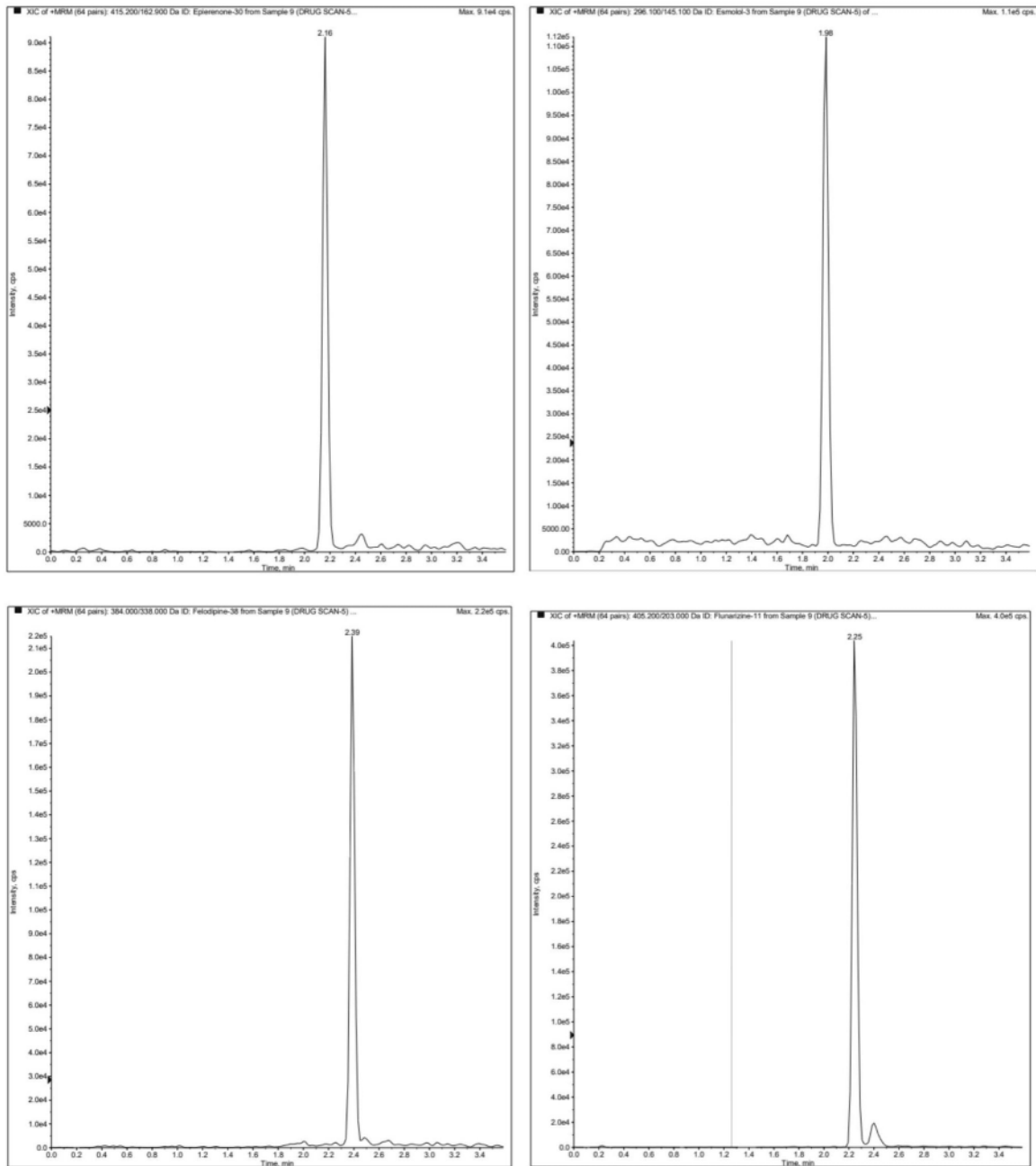


图5

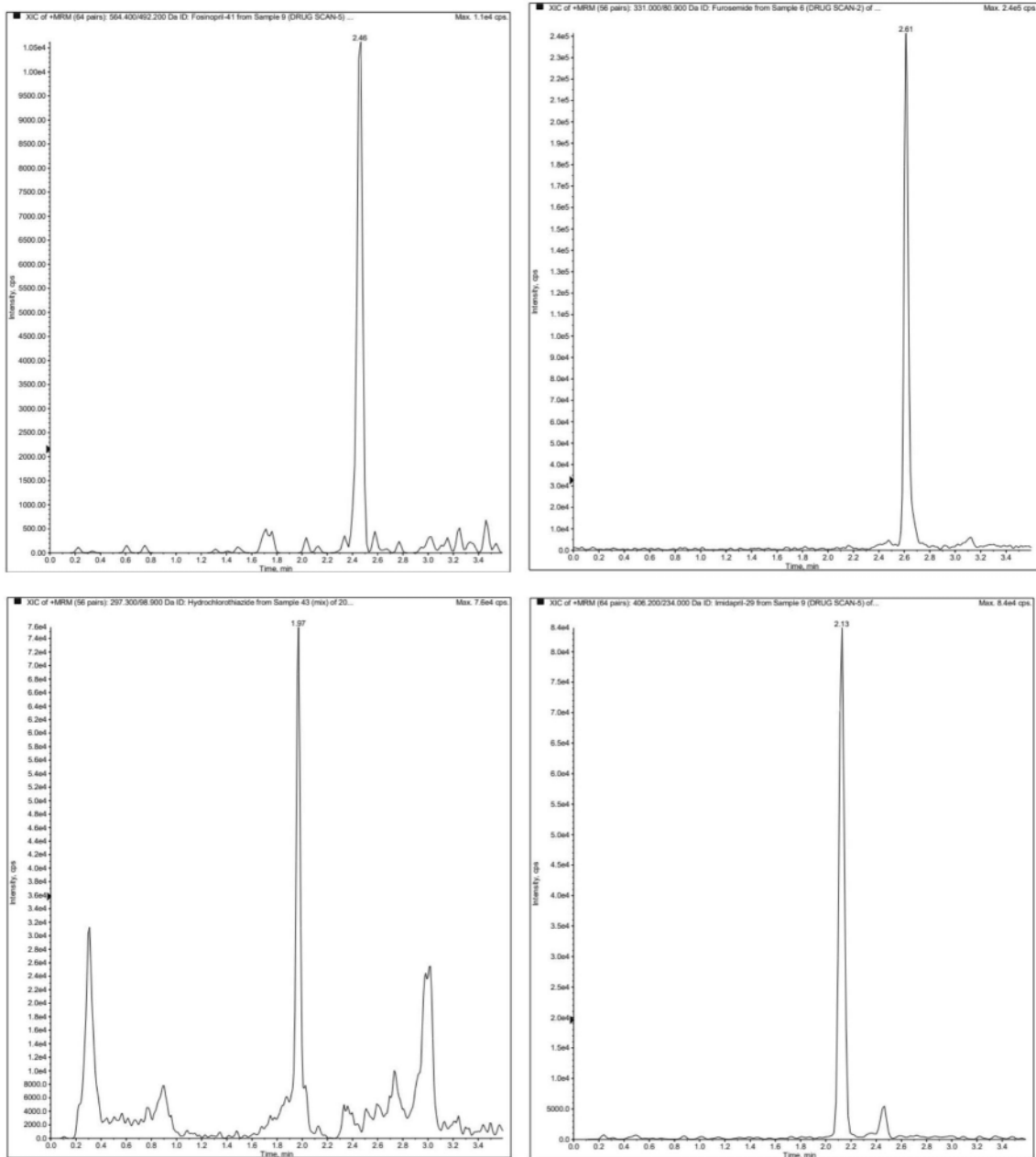


图6

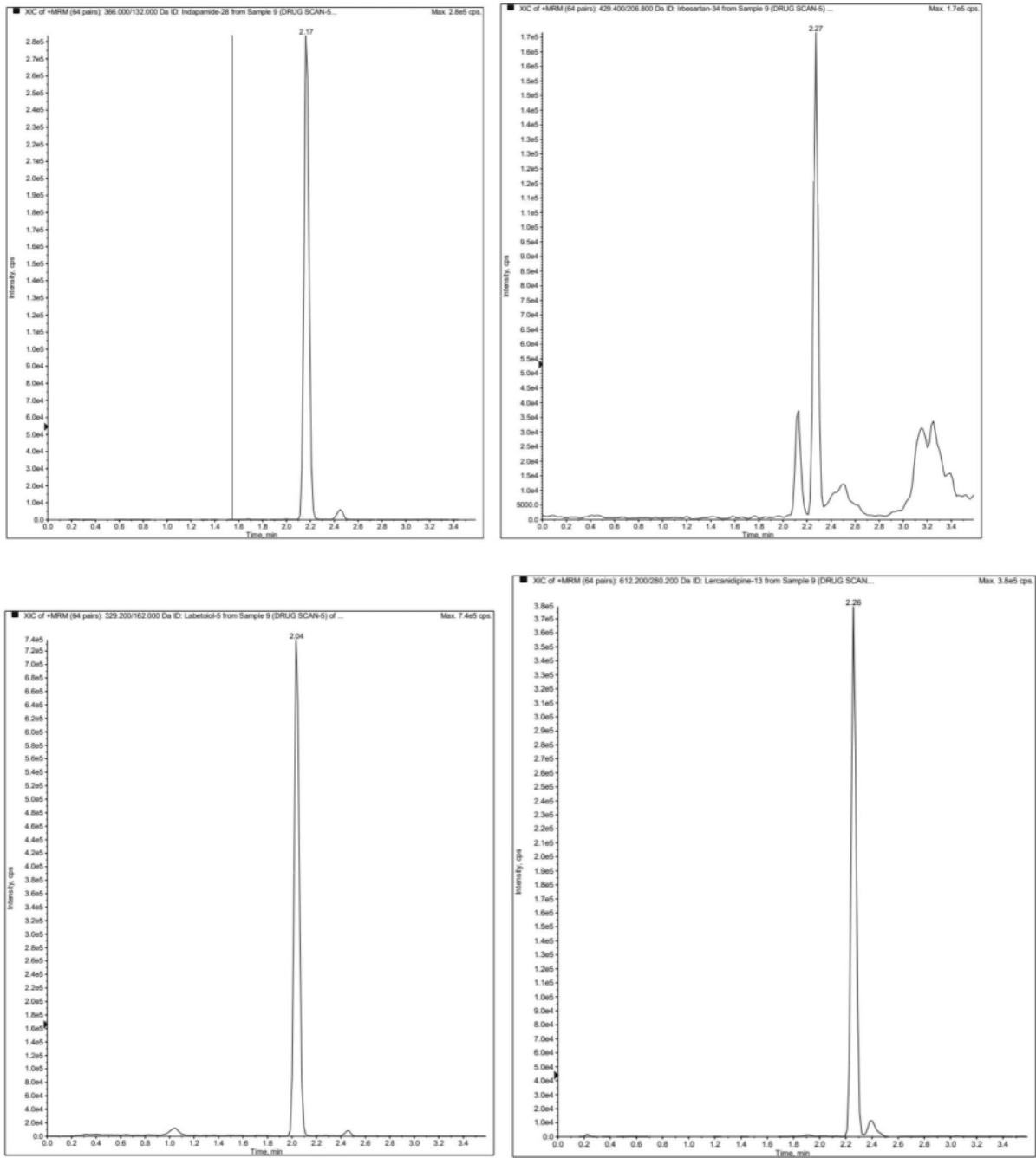


图7

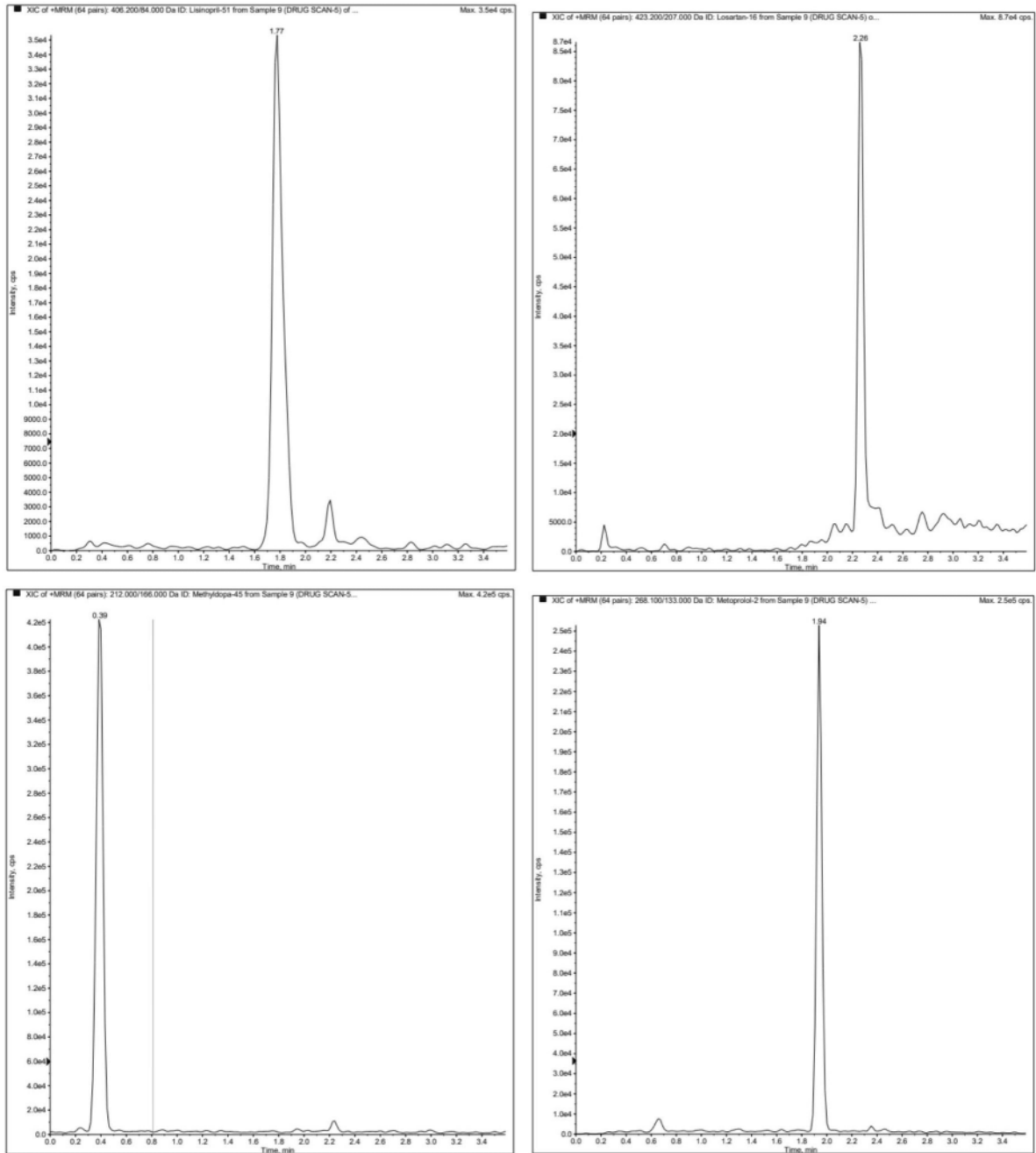


图8

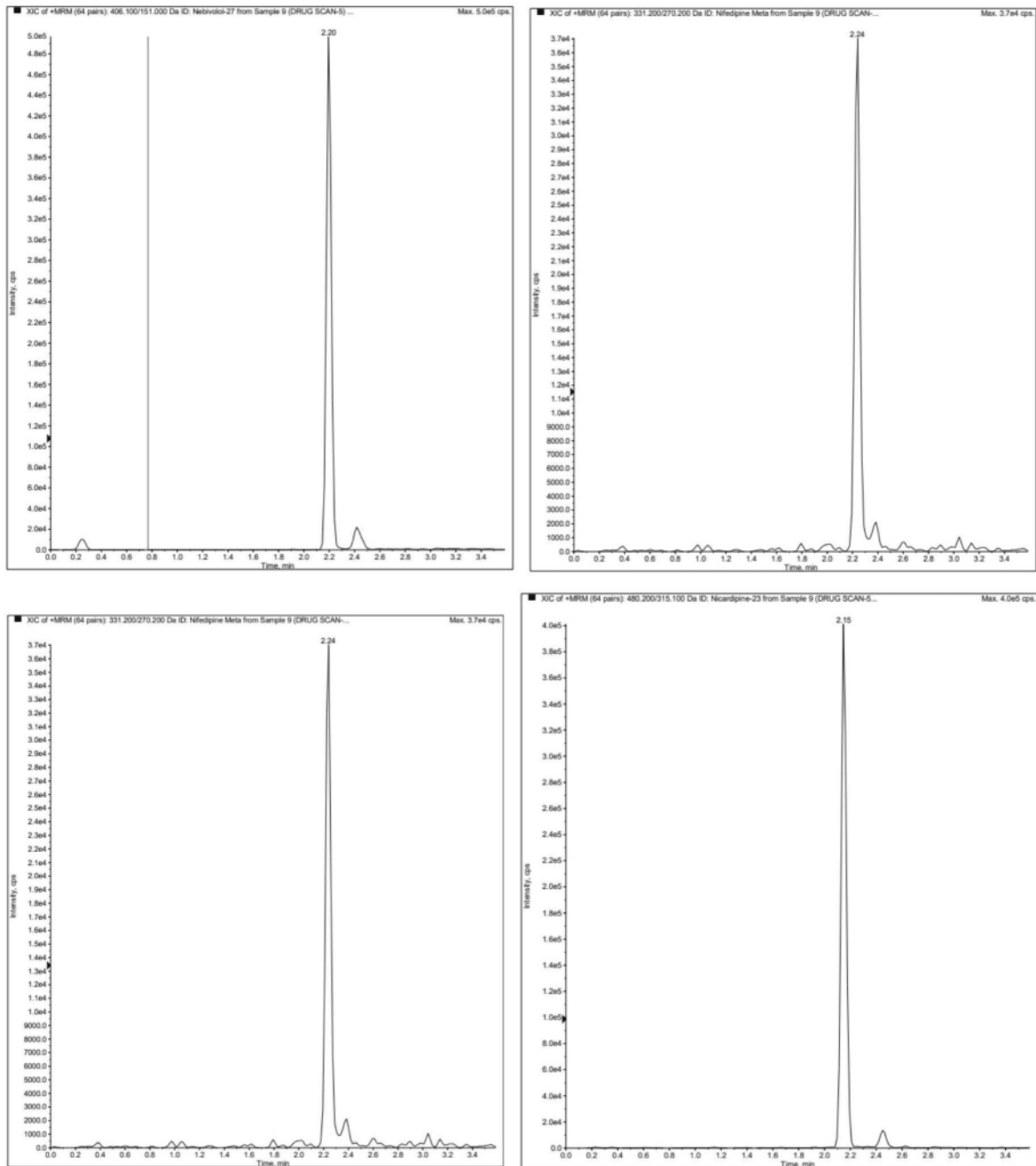


图9

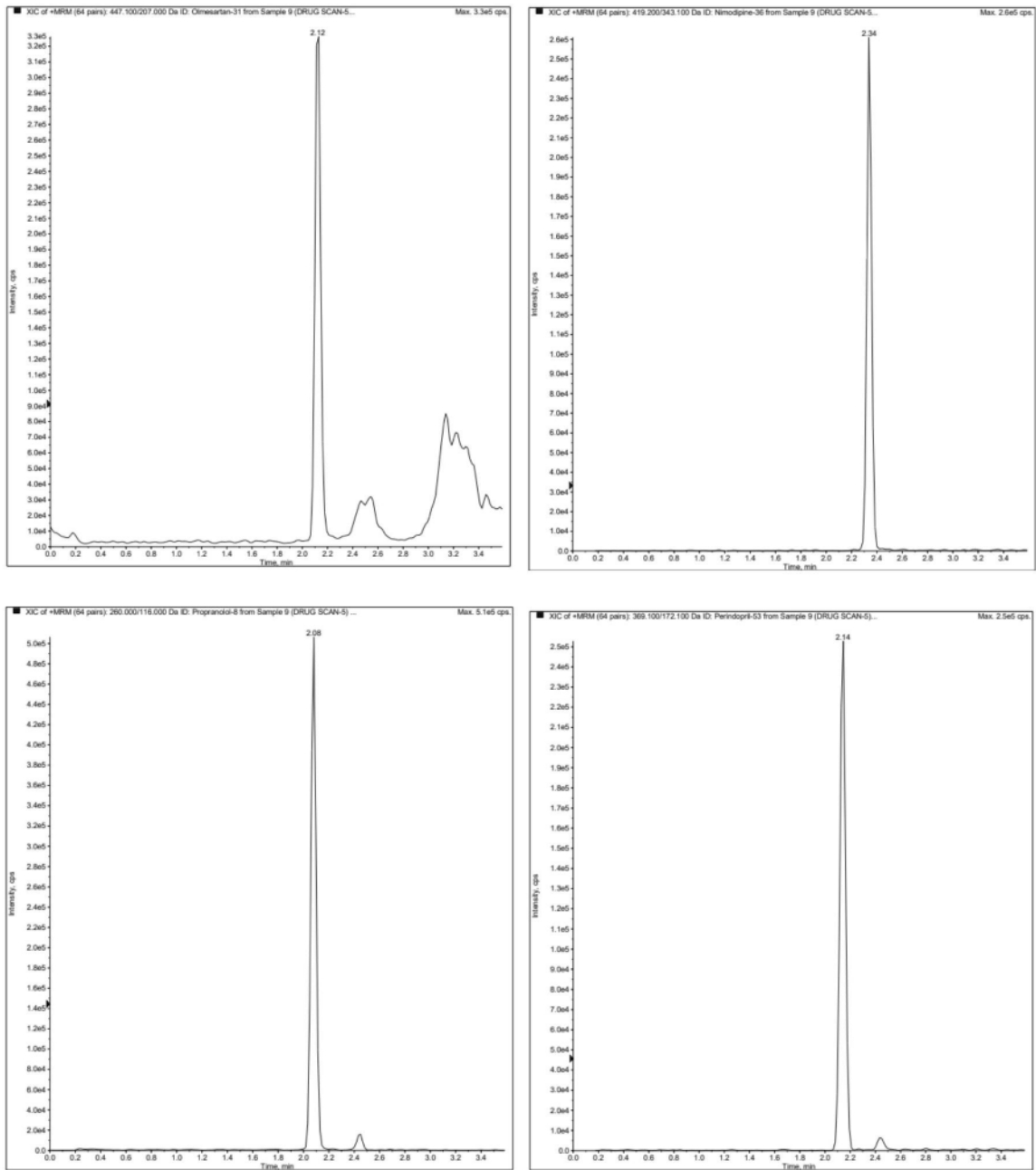


图10

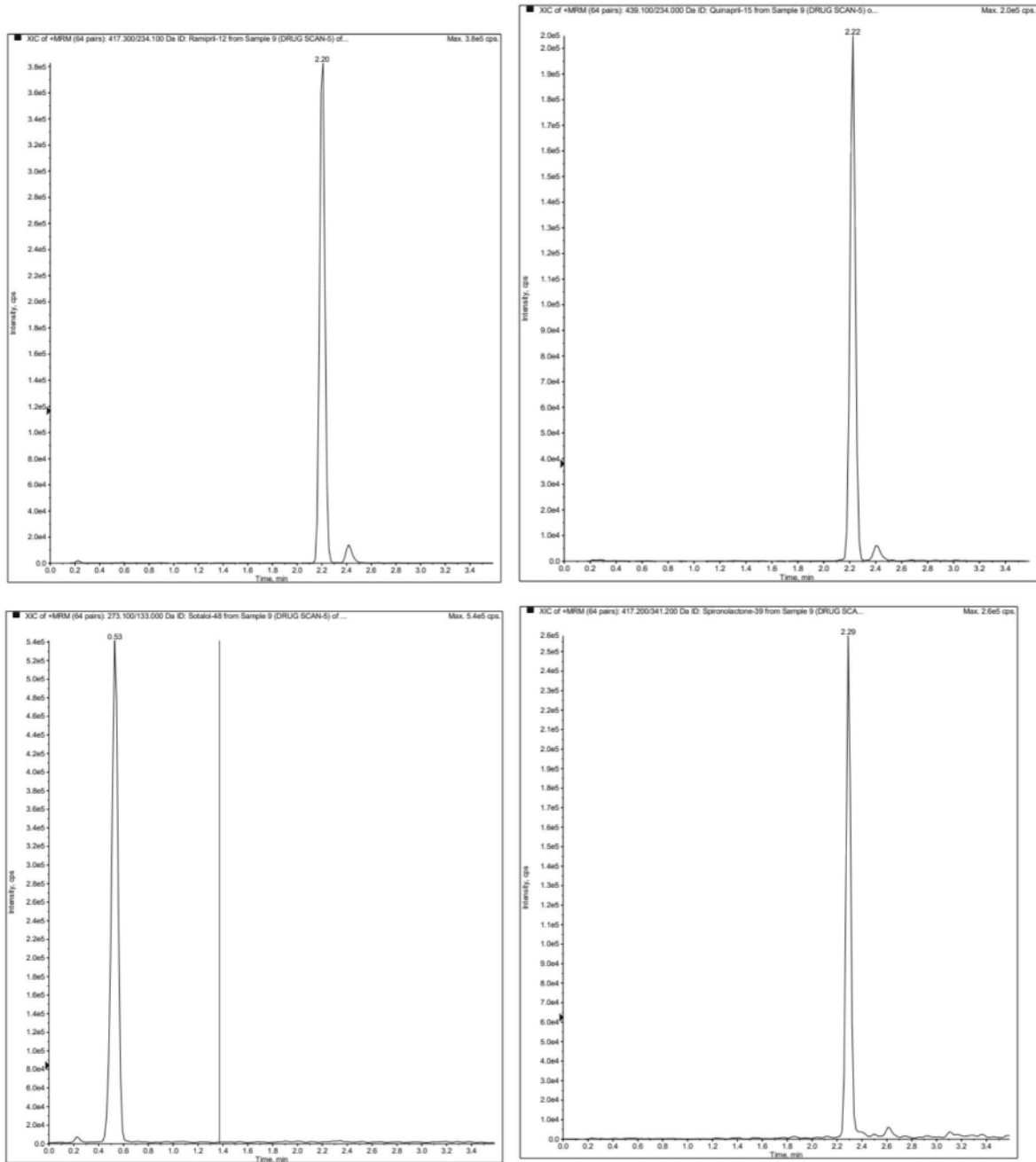


图11

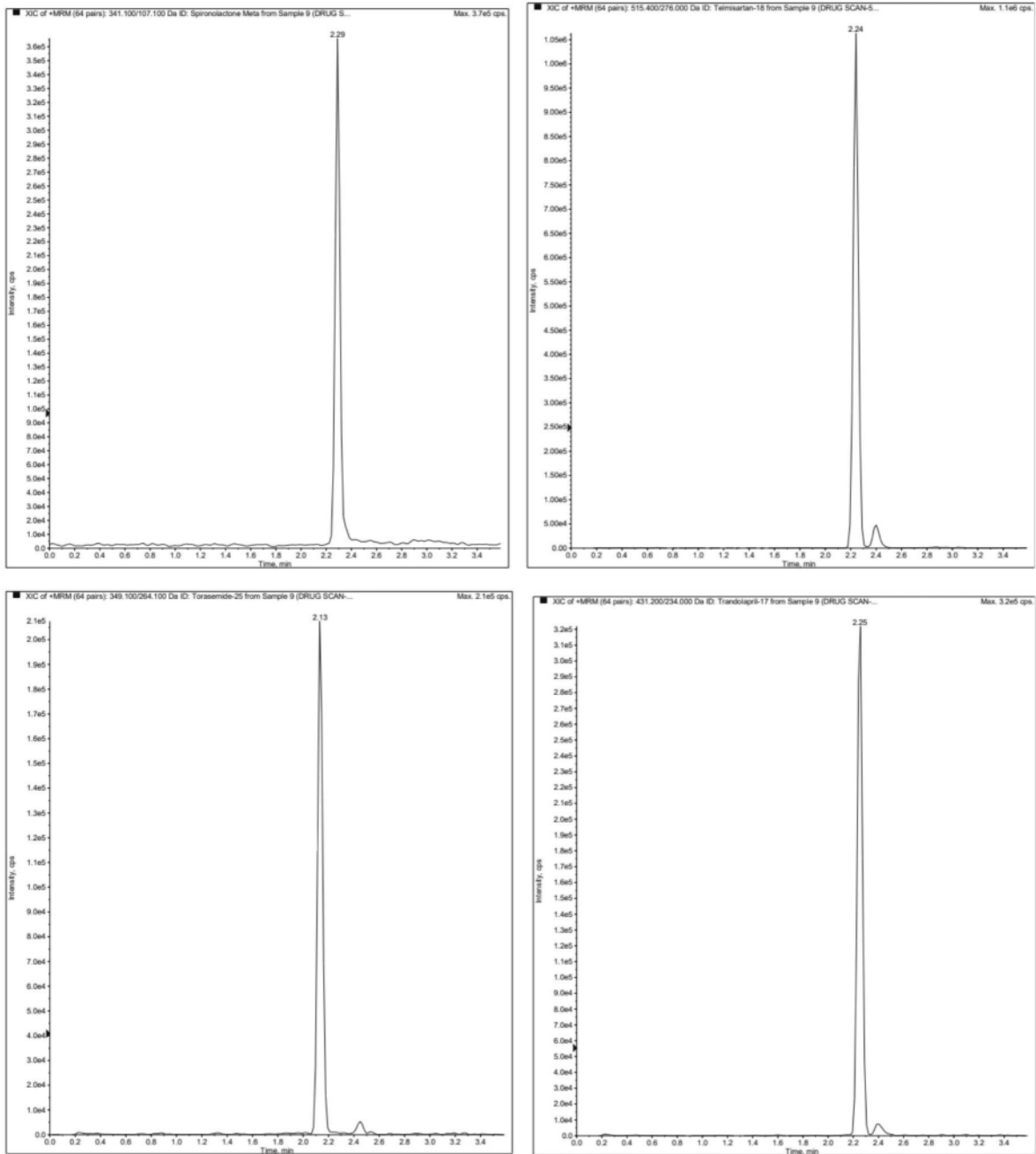


图12

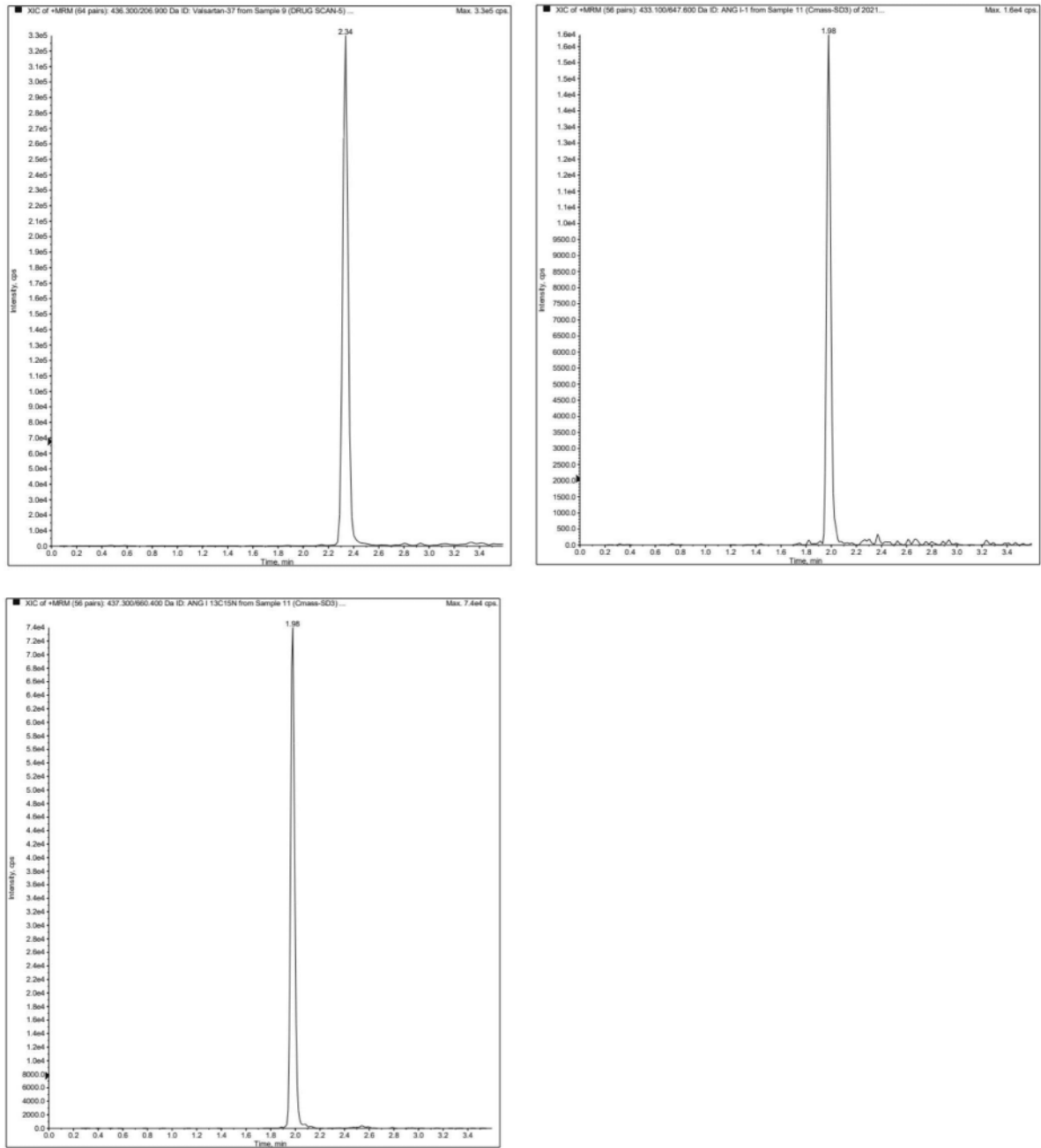


图13

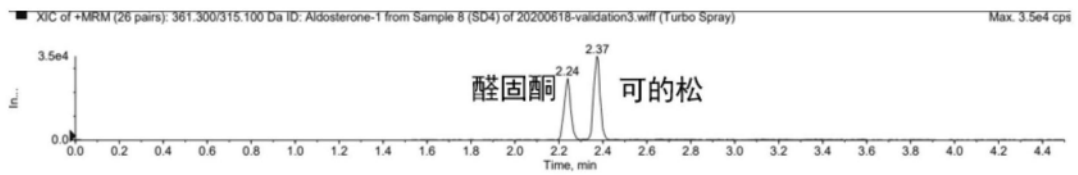


图14

**解释与建议：**

导致ARR假阳性或假阴性的药物因素筛查结果：

药物因素	筛查结果	药物名称	对醛固酮的影响	对肾素的影响	对 ARR 的影响
β-受体阻滞剂	-	无	↓	↓↓	↑ (假阳性)
中枢 α2 受体阻滞剂	-	无	↓	↓↓	↑ (假阳性)
非甾体类抗炎药	-	无	↓	↓↓	↑ (假阳性)
排钾利尿药	-	无	→ ↑	↑ ↑	↓ (假阴性)
潴钾利尿药	-	无	↑	↑ ↑	↓ (假阴性)
ACEI	-	无	↓	↑ ↑	↓ (假阴性)
ARBs	+	缬沙坦	↓	↑ ↑	↓ (假阴性)
二氢吡啶 CCBs	-	无	→ ↓	↑	↓ (假阴性)

注：“+”：筛查阳性；“-”：筛查阴性。

1. 以上药物影响因素来源于：《原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识》. 中华内分泌代谢杂志 (2016)

2. 本次筛查药物包括：

- ◆β受体阻滞剂：阿替洛尔、美托洛尔、普萘洛尔、比索洛尔、拉贝洛尔、奈必洛尔、阿罗洛尔、艾司洛尔、索他洛尔；
- ◆中枢 α2 受体阻滞剂：甲基多巴；
- ◆非甾体类抗炎药：阿司匹林；
- ◆排钾利尿剂：氢氯噻嗪、呋塞米、吲达帕胺、布美他尼、托拉塞米；
- ◆保钾利尿剂：螺内酯、依普利酮、阿米洛利；
- ◆血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)：赖诺普利、培哚普利、雷米普利、喹那普利、依那普利、群多普利、贝那普利、福辛普利、卡托普利、咪达普利；
- ◆血管紧张素受体阻滞剂(ARB)：坎地沙坦、厄贝沙坦、缬沙坦、氯沙坦、替米沙坦、奥美沙坦；
- ◆二氢吡啶类 CCB：氨氯地平、非洛地平、乐卡地平、硝苯地平、贝尼地平、尼卡地平、尼莫地平、氟桂利嗪。

图15