

临床 LC-MS/MS 结合固相萃取法用于人血清中胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 的测定

LCMSMS-577

摘要：使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合固相萃取法，建立了人血清中完整胰岛素样生长因子 1 测定的方法。并对方法的线性、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数大于 0.99，准确度及精密度均满足要求。该方法对于临床上生长激素缺乏症、肢端肥大症的诊断及治疗监测具有重要的意义。

关键词：LC-MS/MS 血清 固相萃取法 IGF-1 胰岛素

胰岛素样生长因子 -1 (insulin - like growth factor-1, IGF-1) 亦称为生长介素，是一种小肽类激素，结构与胰岛素原相似，其分子量为 7.6kDa。IGF-1 的重要作用之一是介导生长激素 (GH) 在外周靶器官组织的促生长作用。

血清 IGF-1 的测定具有重要的临床意义，随着对 IGF-1 认识的不断探索，其在临床中的应用逐渐扩大。最初 IGF-1 的测定主要用于矮小儿童、成人生长激素缺乏症以及肢端肥大症的诊断，监测儿童和成人 GH 替代的疗效及安全性，监测肢端肥大症的治疗反应。大量

流行病学研究发现，IGF-1 与肺癌、乳腺癌等多种肿瘤相关，提示血清 IGF-1 可能成为肿瘤监测的指标

之一。此外，有研究发现系统性硬皮病患者血清 IGF-1 和 IGFBP-3 水平升高，提示 IGF 系统可能参与了系统性硬皮病的发病机制。

IGF-1 的检测方法主要是基于免疫学的测定方法，包括放射免疫法、ELISA 法、化学发光法以及近年来新兴的质谱法。免疫法的关键问题在于 IGFBP 对于 IGF-1 的干扰，质谱法与免疫法相比具有更好的特异性，可以有效降低交叉干扰，测定结果更加稳定准确。

本文使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合固相萃取法，建立了人血清中 IGF-1 含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于临床中相关疾病的诊断，对于 IGF-1 的临床研究亦有重要意义。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-30AD CL×2

在线脱气机：DGU-20A5R CL

自动进样器：SIL-30ACMP CL

柱温箱：CTO-30A CL

系统控制器：CBM-20A CL

工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 100 mm×2.1 mm I.D., 1.7 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水，B 相 -0.1% 甲酸乙腈

柱温：55 °C

进样量：10 μL

流速：0.4 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	B.Conc	30
3.50	Pumps	B.Conc	50
3.51	Pumps	B.Conc	95
4.00	Pumps	B.Conc	95
4.01	Pumps	B.Conc	20
5.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050 CL

DL 温度: 250°C

离子源: ESI (+)

加热模块温度: 400°C

雾化气流速: 2.0 L/min

接口温度: 300°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热器流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
胰岛素样生长因子 -1	IGF-1	1093.5 ⁷⁺	1093.5*	-44	-37	-34
			1196.4	-42	-40	-38
胰岛素样生长因子 -1 内标	¹⁵ N-IGF-1	1106.9 ⁷⁺	1106.9*	-42	-15	-40
			1211.2	-42	-35	-40

注: “*” 表示定量离子。

1.3 标准样品、质控样品及内标溶液配制

用纯水溶解配制 100 µg/mL IGF-1 储备液, 分装, -80°C 冻存, 待用。取其中一份储备液用 50% 甲醇水溶液逐级稀释成浓度为 0.2、0.5、1、2.5、5、10、16、20 µg/mL 的标准工作曲线和浓度为 0.3、6、15 µg/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 5 µL 加入 95 µL 人空白血浆中, 依次配制成浓度为 10、25、50、125、250、500、800、1000 ng/mL 的标准样品; 分别取三个不同浓度质控溶液 5 µL 加入 95 µL 人空白血浆中, 依次配制成浓度为 15、300、750 ng/mL 质控样品。

用纯水溶解配制浓度为 100 µg/mL 的 ¹⁵N-IGF-1 储备液, 分装, -80°C 冻存, 待用。将配制好的 ¹⁵N-IGF-1 储备液用 50% 甲醇水溶液稀释为 5 µg/mL 内标溶液, 待用。

1.4 人血清样品前处理方法

- 取人血清样品 100 µL, 加入内标溶液 20 µL, 涡旋混匀;
- 加入 100 µL 8M 尿素溶液, 涡旋混匀, 室温静置 15 min;
- 加入 200 µL 20°C 预冷的乙腈 (含 5% 乙酸), 涡旋混匀, 14000 rpm 离心 5 min;
- 吸取 300 µL 上清液与 900 µL 5% 氨水溶液混匀;
- 吸取混合液加入已活化的 96 孔固相萃取板, 用 200 µL 5% 氨水溶液和 200 µL 5% 甲醇水溶液进行清洗除杂, 再用 50 µL 60% 甲醇水溶液 (含 2% 甲酸) 洗脱两次。收集全部洗脱溶液至 96 孔板中涡旋混匀, 进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

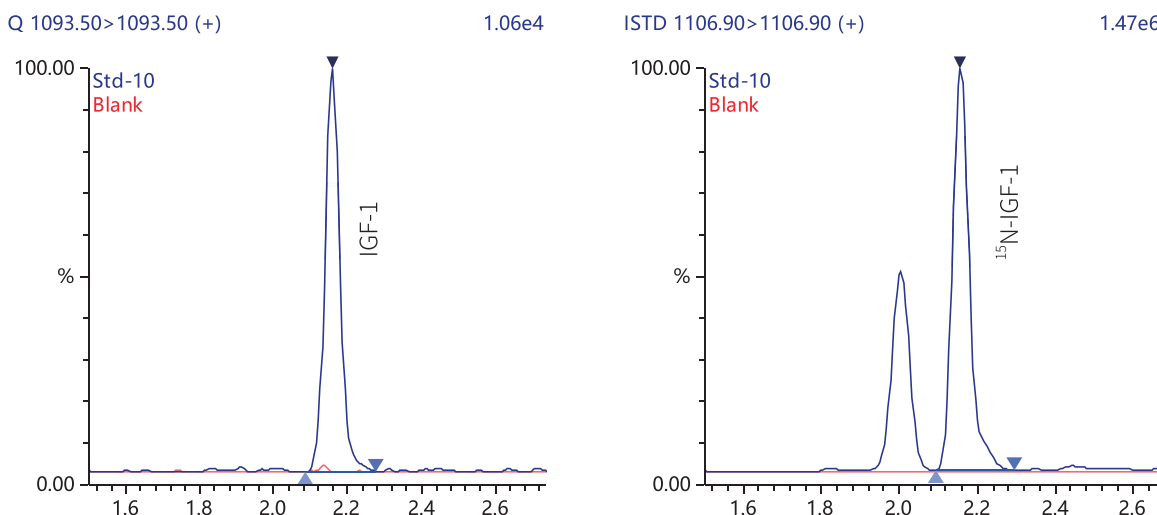


图1 标准样品 (10 ng/mL) 及空白样品谱图

标准样品及空白样品谱图如图 1 所示，¹⁵N 标记的 IGF-1 会在保留时间之前出现另一个峰，据文献报道¹，此色谱峰是由于结构中不同的二硫键构型导致的另一种蛋白形态，通过还原和烷基化可转化为一个峰。从图中可以看到空白样品对 IGF-1 及内标的检测均无干扰，方法专属性良好。

2.2 线性测定结果

标准样品经过 1.4 中的前处理后按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，线性相关系数为 0.9968，准确度在 91.6%~113.5% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	IGF-1	$Y = (0.0005086070)X + (0.001737651)$	10~1000	0.9968	91.6~113.5

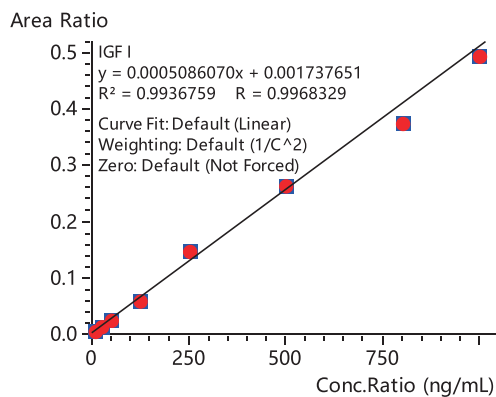


图 2 标准曲线

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.4 中的前处理方法对低中高三浓度质控样品进行前处理，按 1.2 中的分析条件对质控样品进行分析，每个样品平行制备 6 份，质控品的准确度及精密度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，均在理论值的 $\pm 20\%$ 范围内，满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析，测定结果 RSD 在 2.1%~6.7% 之间，满足临床测定需求。

表 4 质控样品准确度及精密度考察结果 (n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	准确度 %	精密度 RSD%
LQC	15	105.7	6.7
MQC	300	116.4	2.1
HQC	750	88.9	6.3

■ 结论

使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合固相萃取法，建立了人血清中胰岛素样生长因子 -1 测定的方法。并对方法的线性、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数为 0.9968，准确度及精密度均满足临床要求。该方法可供生长激素缺乏症、肢端肥大症等多种疾病的诊断、治疗监测和临床研究参考。

< 参考文献 >

- 【1】 Pratt, M.S., van Faassen, M., Remmelts, N. et al. An antibody-free LC-MS/MS method for the quantification of intact insulin-like growth factors 1 and 2 in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 413, 2035–2044 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03185-y>

岛津应用云

