

LC-MS/MS 结合蛋白沉淀法用于人血浆中胰岛素样生长因子 1 的测定

LCMSMS-601

摘要: 使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合蛋白沉淀前处理方法, 建立了人血浆中完整胰岛素样生长因子 1 测定的方法。并对方法的线性、准确度及精密度的进行了考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数大于 0.999, 准确度及精密度的均满足要求, 可用于临床研究, 辅助疾病诊断。

关键词: 临床质谱 血浆 蛋白沉淀 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 7.6 kDa。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。

前期我们已经完成了固相萃取法的方案, 本文使用蛋白沉淀法, 建立了人血浆中 IGF-1 含量测定方法, 该方法易操作, 成本低, 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

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 2.0 L/min

干燥气流速: 10.0 L/min

加热器流速: 10.0 L/min

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

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，用 50% 甲醇水溶液逐级稀释成浓度为 156.15、312.5、625、1250、2500、5000、10000、20000 ng/mL 的工作溶液。分别取标准工作溶液 5 μL 加入 95 μL 人空白血浆中，依次配制成浓度为 7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1000 ng/mL 的标准样品；分别取三个不同浓度工作溶液 5 μL 加入 95 μL 人空白血浆中，依次配制成浓度为 15.625、62.5、500 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，用 50% 甲醇水溶液稀释为 200 ng/mL 内标溶液。

1.4 人血浆样品前处理方法

- 取人血浆样品 100 μL，加入内标溶液 20 μL，涡旋混匀；
- 加入 150 μL 50% 三氟乙醇水溶液，涡旋混匀；
- 加入 200 μL 20% 乙腈丙酮溶液（含 5% 乙酸），涡旋混匀；
- 4000 g 离心 10 min；
- 吸取 200 μL 上清液加入 1600 μL 冰乙醇，混匀置于 -20°C 放置 45 min；
- 4000 g 离心 30 min；
- 将上清液倒出，用 1600 μL 冰乙醇清洗沉淀；
- 取 100 μL 10% 乙腈水溶液（含 1% 甲酸）溶解沉淀，上机分析。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

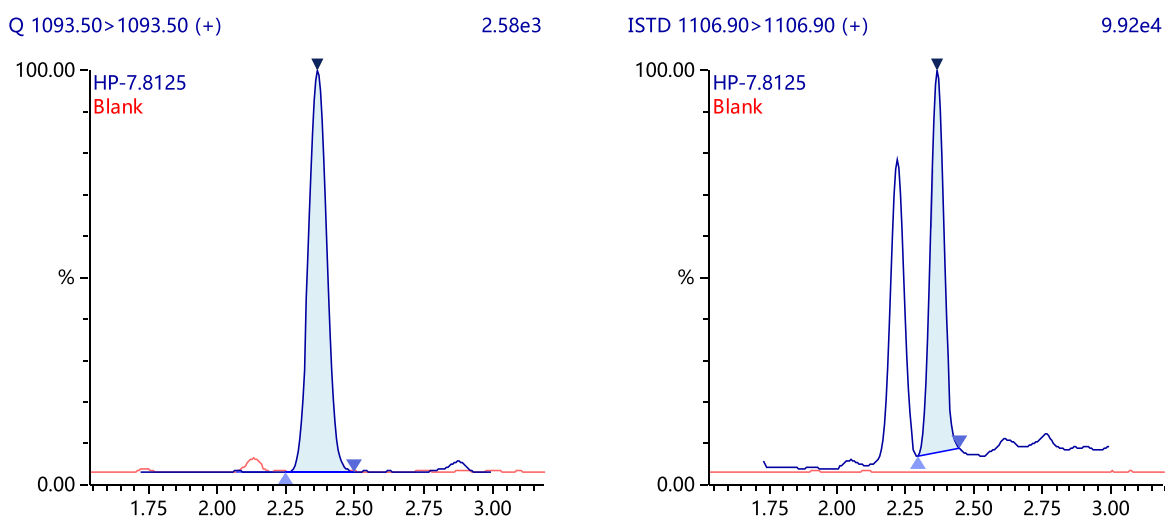


图 1 标准样品 (7.8125 ng/mL) 及空白样品谱图

标准样品及空白样品谱图如图 1 所示，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，线性相关系数大于 0.999，准确度在 88.5%~109.6% 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	$Y = (0.006088576)X + (0.01493820)$	7.8125~1000	0.999	88.5~109.6

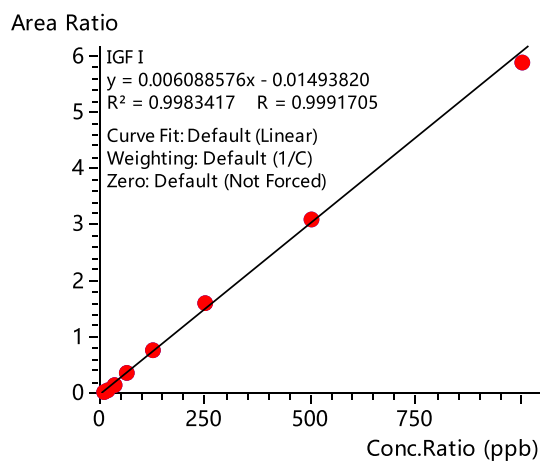


图 2 标准曲线

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 6 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	15.625	91.2	5.6
MQC	62.5	93.4	1.1
HQC	500	98.5	2.4

■ 结论

使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合蛋白沉淀法，建立了人血浆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，准确度及精密度均满足临床要求，易操作，成本低。该方法可供临床研究参考。

岛津应用云

