

系统性红斑狼疮患者中类固醇的检测

陈龙龙¹, 唐惠儒¹

(1. 复旦大学人类表型组研究院, 上海 201203)

摘要: 基于超高效液相色谱-质谱法的检测系统性红斑狼疮患者体内甾醇代谢物的检测方法。通过混合酞法使用吡啶酸和 2-甲基-6-硝基苯甲酞将每种类固醇转化为相应的吡啶甲酰衍生物。衍生化反应进行顺利, 得到了相应的吡啶甲酰衍生物。吡啶甲酰衍生物的正电离-ESI 质谱以 $[M + H]^+$ 的形式作为基峰出现。与未衍生化分子相比, 吡啶甲酰衍生物在正 LC-ESI-MS 选定反应监测 (MRM) 中提供了 5-10 倍更高的 ESI 响应。使用吡啶甲酯、固相萃取和氘标记的内标, 可以通过 LC-ESI-MS-MRM 同时测定人体血浆中这些类固醇的浓度。

关键词: 类固醇; 代谢组学; 超高效液相色谱-质谱法;

中图分类号: Q591

文献标识码: 期刊[J]

A novel endogenous retention-index for minimizing retention-time variations in metabolomic analysis

Chen Qinsheng¹, Zhang Chenhan¹, Song Peidong¹, Tang Huiru¹

(1. Human phenome Institute, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: A method for detecting steroid metabolites in systemic lupus erythematosus (SLE) patients using ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) was described. Each type of steroid was converted into the corresponding picolinoyl derivative using a mixed anhydride method with picolinic acid and 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride. The derivatization process proceeded smoothly, yielding the respective picolinoyl derivatives. Positive ion electrospray ionization mass spectra of the picolinoyl derivatives exhibited $[M + H]^+$ as the base peak. Compared to the underivatized molecules, the picolinoyl derivatives provided 5-10 times higher ESI response in positive LC-ESI-MS-selected reaction monitoring (MRM). Utilizing picolinoyl esters, solid-phase extraction, and deuterium-labeled internal standards enabled the simultaneous quantification of these steroids in human saliva by LC-ESI-MS-MRM.

Keywords : steroid; metabolomics; Ultrahigh-performance liquid-chromatography mass spectrometry;

1 实验仪器和材料

1.1 仪器

shimadzu 色谱系统 (Waters, Milford, USA)、6500+ 质谱系统 (sciex)。

1.2 试剂和药品

质谱级纯甲酸、甲醇和乙腈全部购买于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。超纯水均取自于 Milli-Q (德国 Merck Millipore 有限公司) 超纯水系统 (电阻率 $>18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$)。酰基肉碱分析纯标准品购买于 Sigma-Aldrich 试剂有限公司(中国)、百灵威科技有限公司(中国)或阿拉丁化学试剂有限公司(上海)。

2 实验方法

2.1 系统性红斑狼疮患者中类固醇提取

(1) 取 50 μL 血清或血浆, 加入 10 μL 氘代内标、与 500 μL MeOH 混合, 离心 10 min (14000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), 得到 500 μL 提取物用于 UPLC-MS 分析。

2.2 超高效液相色谱-质谱法参数

(1) LC-ESI-MS-MRM 系统包括 Agilent Eclipse Plus-C18 色谱柱 (100 mm*2.1 mm i.d., 1.8 μm)、Shimadzu UPLC 与 6500+。含有 0.1% FA 的水与 ACN 分别作为洗脱溶剂 A 与 B, 并采用 2 种色谱洗脱方法 (M_0 与 M_1 , 具体参数见表 1)。其中, 流速均为 0.5 min, 色谱柱温均为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 M_0 与 M_1 色谱洗脱梯度

Time min	A	B	flow rate ml/min
0.00	60.00 %	40.00 %	0.5
1.00	60.00 %	40.00 %	0.5
3.00	20.00 %	45.00 %	0.5
6.00	40.00 %	60.00 %	0.5
8.00	10.00 %	90.00 %	0.5
9.00	2.00 %	98.00 %	0.65
12.00	0.00 %	100.00 %	0.65
14.00	0.00 %	100.00 %	0.65

质谱采集模式为 MRM。

表2 质谱源参数信息

CUR:	40
CAD:	Medium
IS:	5500
TEM:	550
GS1:	55
GS2:	60
DP:	100
EP:	10
CXP:	10
CUR:	40
CAD:	Medium
IS:	5500

3 结果与讨论

3.1 实验结果

内标法检测系统性红斑狼疮患者血浆内类固醇代谢物的浓度，并与健康人群比较

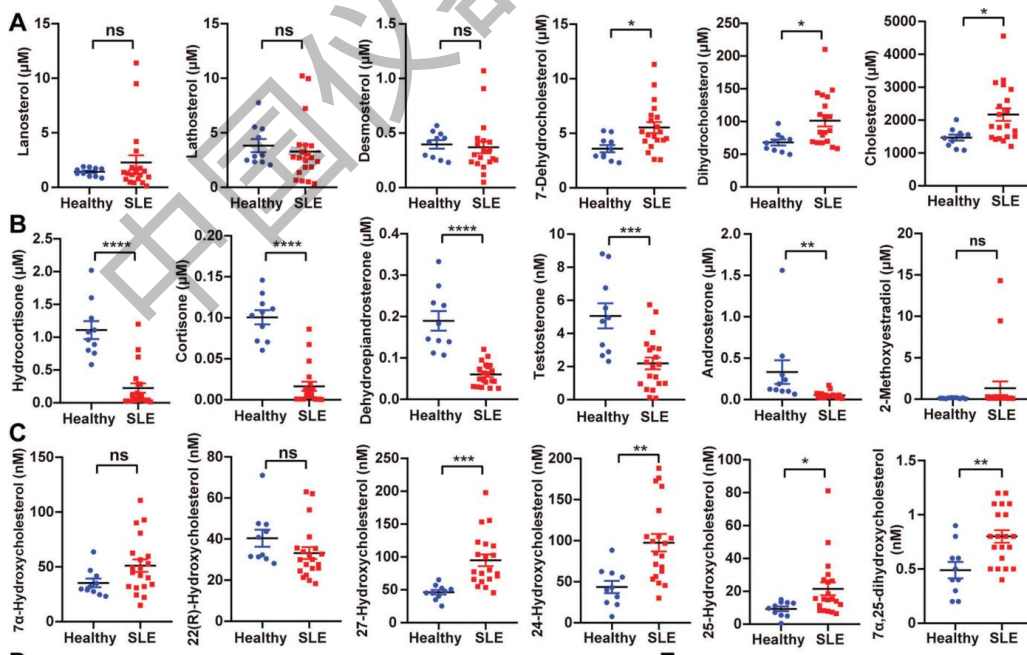


图1 健康人与系统性红斑狼疮患者血浆中类固醇差异

3.2 结论

能够有效检测系统性红斑狼疮患者血浆中类固醇代谢物。

参考文献:

- [1]Zhang, F., Zhang, B., Ding, H., Li, X., Wang, X., Zhang, X., Liu, Q., Feng, Q., Han, M., Chen, L., Qi, L., Yang, D., Li, X., Zhu, X., Zhao, Q., Qiu, J., Zhu, Z., Tang, H., Shen, N., Wang, H., Wei, B., The Oxysterol Receptor EBI2 Links Innate and Adaptive Immunity to Limit IFN Response and Systemic Lupus Erythematosus. *Adv. Sci.* 2023, 10, 2207108. <https://doi.org/10.1002/advs.202207108>

中国仪器仪表表学会