

液质联用方法测定白色念珠菌中海藻糖的含量

董玲玲^a, 曹颖瑛^b, 柴逸峰^a (第二军医大学药学院, ^a物分析教研室, ^b生化药学教研室; 上海 200433)

[摘要] 目的 采用液质联用方法测定白色念珠菌中海藻糖的含量, 考察白色念珠菌在感应分子法尼醇作用后海藻糖的变化。方法 色谱柱: Shisheido CAPCELL NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温: 25 °C, 流动相: 乙腈-水溶液 (75: 25, V/V), 流速: 1 ml/min, 分流比 3: 1。质谱检测器, ESI(-)模式, 选择离子检测, 碎片电压 120 V。结果 海藻糖和内标峰形均良好, 海藻糖含量在 0.05~ 50 μg/ml 范围内线性关系良好, $r = 0.9993$ 。日内日间精密度 RSD 值分别为 1.8% 和 2.1%。结论 该方法简便易行, 选择内标之后含量测定更精确, 灵敏度提高。

[关键词] 海藻糖; 液质联用; 白色念珠菌; 含量测定

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0186-03

Detem ination of trehalose in *Candida albicans* by HPLC-MS

DONG Ling-ling CAO Ying-ying CHAI Yifeng (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high performance liquid chromatography-mass spectrum (HPLC-MS) method to determine trehalose in the biofilm of *Candida albicans*. **Methods** Shisheido CAPCELL NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used in this method and the mobile phase is 75% acetonitrile and 25% pure water. MS detector with an ESI ion source in negative mode was used. **Results** It has a good separation of trehalose and internal standard and there is no interference of endogenous impurity. Linear was from 0.05~ 50 μg/ml ($r = 0.9993$), recovery was in the range of 81.50% to 96.29% and the RSD of precision is less than 2.1%.

Conclusion This method is a simple method for quantification of trehalose in fungus.

[Key words] trehalose; LC-ES/MS; *Candida albicans*; quantification

海藻糖是细胞中的一种应急代谢物, 在细胞处于应激时可大量合成, 恢复平常状态下又迅速降解。海藻糖含量的变化从某种程度上反映了机体对外界环境的响应。研究表明在培养基中外加感应分子法尼醇可以抑制白色念珠菌生物被膜的形成。本研究正是建立了一种简便快速准确的测定海藻糖的方法, 以测定法尼醇干扰下白色念珠菌中海藻糖的含量变化, 为进一步研究海藻糖在白色念珠菌中的代谢途径提供参考。

文献报道海藻糖的含量测定常用 HPLC-ELSD 或者 GC-FID 等方法^[1-3], 但是 ELSD 的动态量程相对较小, 稳定性较弱; GC-FID 测糖类物质需要经过衍生化, 操作相当繁琐; 因此, 本实验选用 HPLC-ES/MS 来测定白色念珠菌中海藻糖的含量, 能够快速、灵敏、准确的实现定量的要求。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent 1100 SL 液相色谱-质谱联用仪 (含双高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化

接口、四极杆质谱检测器); 色谱工作站为 Agilent ChemStation, BP211D 分析电子天平。Eppendorf 公司离心机, 型号为 Centrifuge 5415; 宁波新芝生物科技股份有限公司超声细胞粉碎机。

1.2 试剂 海藻糖对照品及蔗糖 (内标) 对照品均购自 Sigma 公司; 试验用水为去离子; 所用乙腈为 Merck 公司的色谱纯乙腈。

1.3 菌株与培养基 SC5314 国际标准株, 由 William A. Fonzi (Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington, D. C.) 提供。改良型 RPM F1640 培养液, 含 2.05 mmol 谷氨酰胺, 购自 Thermo 公司。

2 实验方法

2.1 被膜型白色念珠菌的培养 从平板上挑取白色念珠菌单克隆, 接种至 1 ml YPD 培养液, 于 30 °C, 200 r/min 振荡培养至对数生长后期, 收集细胞, 新鲜 RPM F1640 培养液洗涤 3 次, 重悬于 RPM F1640 培养液中, 各培养瓶中加入 5 ml 1640 培养液, 约 20 μl 菌液, 以血细胞计数板计数, 调整菌液浓度至 1×10^6 个 / ml 于 37 °C 静置培养 2 h 后, 更换新鲜 RPM F1640 培养液。一份加入法尼醇的甲醇溶

[作者简介] 董玲玲 (1985-), 女, 硕士研究生. E-mail: linglingdong85@yahoo.com.cn.

[通讯作者] 柴逸峰. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

液 (40 mmol/L) 作为给药组, 另外一份不加作为对照组, 平行培养 3 批, 于 60 h 收集被膜。

2.2 样品制备 收集样品, 弃去上清, 再用纯水清洗 2 次, 刮下被膜, 纯水重悬, 于 13 200 r/min 离心 3 min 收集沉淀, 加 2 ml 甲醇水 (60:40 V:V) 于 -70 °C 冷冻 15 min, 然后于 0 °C 融解, 重复一次, 超声破碎 (800 W, 15 s 间歇, 90 min), 13 200 r/min 离心 5 min 收集上清, -80 °C 冻存样品。

2.3 海藻糖及蔗糖储备液的配制 精密称取海藻糖对照品 0.01036 g 置 10 ml 容量瓶中, 加水定容备用。精密称取蔗糖 0.00930 g 置于 10 ml 容量瓶中, 加水定容备用。

2.4 色谱条件 色谱柱: Shishido CAPCELL NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水溶液 (75:25, V/V); 流速: 1 ml/min; 柱温: 25 °C。

2.5 质谱条件 离子检测方式: 选择性离子检测 (SM); 离子极性: 负离子检测 (Negative); 离子化方式: 气动辅助电喷雾离子化 (ESI); 检测对象: 海藻糖 [M-H]⁻ 离子 m/z: 341; 蔗糖 [M-H]⁻ 离子 m/z: 341; 传输区电压: 120 V; 干燥气流速: 10 l/min; 雾化室压力: 40 psig; 干燥气温度: 350 °C。

2.6 方法学确证

2.6.1 线性关系 取上述储备液, 以纯水稀释至 0.05180, 0.1036, 0.5180, 2.0725, 18.0, 103.6, 207.2, 518.0 μg/ml 得到一系列标准溶液, 分别向等量标准溶液中加入等量的蔗糖储备液作为内标, 记录色谱图, 计算海藻糖峰面积和内标峰面积的比值 (f), 以峰面积比值对海藻糖浓度与内标浓度的比值 (x) 作权重回归计算, 得权重回归方程, $f = 0.0404 + 1.7620x$ (权重系数 $w = 1/x$), 相关系数 $r = 0.9993$ 表明海藻糖在 0.05180~51.80 μg/mL 范围内线性关系较好。

2.6.2 精密度考察 制备浓度为 25.90 μg/ml 的海藻糖标准含内标溶液, 连续 3 d 每天测定 6 次, 记录色谱图, 计算海藻糖峰面积和内标峰面积的比值 f 代入当天的标准曲线求得实测浓度, 计算日内日间 RSD 值分别为 1.8% 和 2.3%。

2.6.3 回收率考察 将已知浓度样品均分为 3 份, 分别加入对照品, 使加入浓度为 0.1036, 25.90, 41.44 μg/ml 记录色谱图, 计算海藻糖峰面积和内标峰面积的比值, 将该比值代入当天随行标准曲线方程算出测定浓度后再计算加样回收率, 低中高三浓度的加样回收率分别为 81.50%、96.29%、93.89%, RSD 值分别为 4.5%、0.2%、0.9%。

2.6.4 样品稳定性考察 取同一样品均分为 9 份, 3 份立即测定, 3 份于室温放置 12 h 后分析; 3 份于

配制好后放入冰箱于 -20 °C 冰冻后取出化冻, 如此反复冻融各 3 次后分析。记录色谱图, 计算海藻糖峰面积和内标峰面积的比值, 其响应值 RSD 为 0.6%, 表明样品在 12 h 内稳定, 且反复冻融对样品无明显影响。但是, 生物样品稳定性较一般样品比较差, 还是应该尽早测量。

3 样品中海藻糖含量的测定

按 2.1 和 2.2 项制备样品后, 向样品中加入蔗糖溶液作为内标, 记录色谱图。对照品及样品色谱图见图 1。

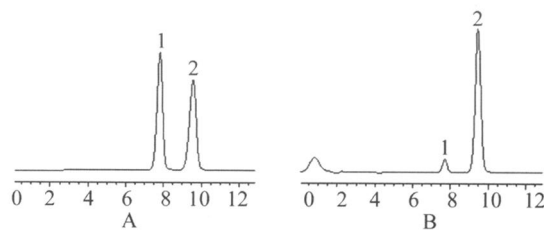


图 1 海藻糖对照品 (A) 及样品 (B) 色谱图
1-内标 (蔗糖) 色谱峰; 2-海藻糖色谱峰

经过 60 h 的培养后, 被膜已经成熟, 给药组海藻糖含量明显高于对照组, 结果如下表所示, 测定 3 批样品, 趋势一致, 这说明为了应对外加感应分子的刺激, 海藻糖在细胞体内积聚。

表 1 海藻糖含量变化结果表

序号	对照组 (μg/mg)	给药组 (μg/mg)
1	1.04	16.47
2	2.21	17.56
3	1.42	16.50

4 讨论

4.1 白色念珠菌中海藻糖提取方法的选择 比较微波破碎法、超声提取法及冻融提取法, 发现超声法效果较好, 提取完全。经过超声波法得到的样品提取液中, 待测物的含量高于反复冻融法得到的样品提取液, 而且将反复冻融处理后剩下的残渣再进行超声处理, 同样能检测到一定浓度的待测物, 因此, 本试验采取冻融法与超声法相结合的方法来提高白色念珠菌中海藻糖的提取效率。提取溶剂的选择按照文献报道, 使用甲醇-水 (60:40) 提取效率最高^[4]。

4.2 色谱柱的选择 由于待测物质海藻糖极性较大, 在一般的反相色谱柱上保留效果差, 待测物和内

标不能分离,所以选择氨基柱进行实验,得到了良好的分离效果。

4.3 质谱条件的选择 试验过程中,尝试在不同的裂解电压,干燥气流速及温度条件下检测,发现在裂解电压为 120 V、干燥气温度为 350 °C、流速为 10 l/min 条件下,海藻糖有最大的响应。

【参考文献】

[1] 陈永,徐宁. 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测

定[J]. 中国高新技术企业, 2007, 6: 82

[2] 魏 决,丁明玉. 液相色谱-蒸发光散射测定转基因烟草提取液中的海藻糖[J]. 色谱, 2001, 19(3): 226
 [3] 廖洪梅,戴 玲,魏晓飞,等. 单糖乙酰化条件的优化[J]. 理化检验·化学分册, 2008, 44: 5.
 [4] Villas-Bóas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, *et al*. Global metabolite analysis of yeast - evaluation of sample preparation methods [J]. *Yeast* 2005, 22(14): 1155.

[收稿日期] 2010-01-25

[修回日期] 2010-03-08

(上接第 163 页)

[7] Leffvre G, Sedek G, Jhee S, *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel daily rivastigmine transdermal patch compared with twice-daily capsules in Alzheimer's disease patients [J]. *Clin Pharmacol Ther* 2008, 83: 106
 [8] Winblad B, Cummings J, Andreasen N, *et al*. A six-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease rivastigmine patch versus capsule [J]. *Int J Geriatr Psychiatry* 2007, 22(5): 456.
 [9] 全球医药快讯 FDA 连线 [J]. 世界临床药物, 2008, 29(10): 636
 [10] Minville V, Lubrano V, Bounes V, *et al*. Postoperative analgesia after total hip arthroplasty: patient-controlled analgesia versus transdermal fentanyl patch [J]. *J Clin Anesth* 2008, 20(4): 280
 [11] Lehmann KA, Zech D. Transdermal fentanyl: clinical pharmacology [J]. *J Pain Symptom Manag* 1992, 7(3 suppl): 8.
 [12] Gordon DB, RN, C, *et al*. New opioid formulations and delivery systems [J]. *Pain Management Nursing* 2007, 8(3 suppl): 6.
 [13] Yin DS, Jang JJ, Shin SC, *et al*. Pharmacokinetic and skin irritation of transdermal ketoprofen [J]. *Kor J Clin Pharmacol Ther* 1994, 2: 21.
 [14] Noda K, Nakagawa A, Yamagata T, *et al*. Anti-inflammatory and analgesic gel composition [P]. US Patent, 4393076 1983-07-12.
 [15] Itoh Y, Kato H, Matsumura K, *et al*. Anti-inflammatory and antipyretic cream [P]. US Patent 4534980 1985-08-13
 [16] Hemmi T, Fujim M, Kikuchi K, *et al*. Application of an oily gel formed by hydrogenated soybean phospholipids as a percutaneous absorption type ointment base [J]. *Chem. Pharm. Bull* 1994, 42: 651.
 [17] Tashiro Y, Kato Y, Hayakawa E, *et al*. Iontophoretic transdermal delivery of ketoprofen: Novel method for the evaluation of plasma drug concentration in cutaneous vein [J]. *Biol Pharm. Bull* 2000, 23(5): 632.
 [18] Rhee YS, Choi JG, Park ES, *et al*. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions [J]. *Int J Pharm* 2001, 228: 161.
 [19] Maestrelli F, Gonzalez Rodriguez ML, Rabasco AM, *et al*. Prepr

aration and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery [J]. *Int J Pharm* 2005, 298(1): 55.

[20] 陈端霞,游 凯. 经皮硝酸甘油贴(NitroDur®)治疗心绞痛的临床观察 [J]. 综合临床医学, 1990, 6(4): 201
 [21] Zhan XP, Chen SJ, Tang GC, *et al*. A new poly(2-hydroxy-3-phenoxypropylacrylate-4-hydroxybutyl acrylate diethyl malate) membrane controlled combined linear release in the transdermal drug delivery system [J]. *Eur Polym J* 2007, 43(4): 1588.
 [22] 杜洪光,张恩宏,王 丽,等. 可乐定透皮贴剂体外透皮性能研究 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(8): 712.
 [23] Pomel B, Genazzani AR, Costes D, *et al*. Efficacy and tolerability of Menorest® 50 compared with estraderm® TTS 50 in the treatment of postmenopausal symptoms: A randomized multicenter parallel group study [J]. *Maturitas* 1995, 22(3): 207.
 [24] Paoletti AM, Piloni M, Orzi M, *et al*. Efficacy and safety of oral and transdermal hormonal replacement treatment containing levonorgestrel [J]. *Maturitas* 2002, 42(2): 137.
 [25] Gooren LJG, Bunck MCM. Transdermal testosterone delivery: testosterone patch and gel [J]. *World J Urol* 2003, 21(5): 316.
 [26] Moeller EH, Jørgensen L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals [J]. *Drug Discov Today Technol* 2008, 5(2-3): 89.
 [27] Park JH, Lee JW, Kim YC, *et al*. The effect of heat on skin permeability [J]. *Int J Pharm* 2008, 359(1-2): 94.
 [28] Praustz MR, Langer R. Transdermal drug delivery [J]. *Nat Biotechnol* 2008, 26(11): 1261.
 [29] Chen H, Zhu H, Zheng J, *et al*. Iontophoresis-driven penetration of nanovesicles through microneedle induced skin microchannels for enhancing transdermal delivery of insulin [J]. *J Control Release* 2009, 139(1): 63.
 [30] Laurent PE, Bonnet S, Alhas P, *et al*. Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system [J]. *Vaccine* 2007, 25(52): 8833.

[收稿日期] 2009-12-29

[修回日期] 2010-02-22