

柱前衍生化-高效液相色谱法测定白念珠菌中多胺的含量

纪松岗¹, 杨宇², 李康³, 吴海棠², 朱臻宇² (1. 解放军第 401 医院药剂科, 山东 青岛, 266071; 2. 第二军医大学药学院, 上海, 200433; 3. 解放军第 169 医院, 湖南 衡阳, 421000)

[摘要] 目的 建立同时测定白念珠菌中 4 种多胺(腐胺、尸胺、亚精胺和精胺)的 HPLC 方法。方法 样品经苯甲酰氯衍生化, 资生堂 C₁₈ 色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 3.0 μm)分离, 以甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B)为流动相进行梯度洗脱, 0~5 min, 30%~48% B; 5~12 min, 48% B; 12~15 min, 48%~70% B; 15~25 min, 70% B, 流速 0.6 ml/min, 检测波长 254 nm。结果 腐胺、尸胺、亚精胺和精胺浓度分别在 0.775~77.50 μg/ml ($r=0.9999$)、1.160~116.0 μg/ml ($r=0.9999$)、5.800~580.0 μg/ml ($r=0.9998$)、2.533~192.7 μg/ml ($r=0.9999$) 的范围内线性关系良好。4 种多胺的加样回收率为 94.27%~109.3%, 精密度的 RSD < 4%。结论 该含量测定方法灵敏、重现性好, 能同时测定白念珠菌中 4 种多胺的含量。

[关键词] 多胺; 柱前衍生化; 高效液相色谱法; 白念珠菌

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)06-0412-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.06.04

Determination of polyamines in *Candida albicans* by Pre-column derivation-HPLC

Ji Song-gang¹, Yang Yu², Li Kang³, Wu Hai-tang², Zhu Zhen-yu² (1. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. No. 169 Hospital of PLA, Hengyang 421000, China)

[Abstract] **Objective** To develop a HPLC method for simultaneous determination of four polyamines (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine) in *Candida albicans*. **Methods** HPLC analysis was performed on a Shiseido C₁₈ column (100 mm × 3.0 mm, 3.0 μm) after benzoyl chloride derivatization. The mobile phase consist of methanol (A) and water containing 0.1% methane acid (B). The gradient elution program was as follow: 0~5 min, 30%~48% B; 5~12 min, 48% B; 12~15 min, 48%~70% B; 15~25 min, 70% B, the flow rate was 0.6 ml/min, the detection wavelength was 254 nm. **Results** The linearity was obtained over 0.775~77.50 μg/ml ($r=0.9999$) for putrescine, 1.160~116.0 μg/ml ($r=0.9999$) for cadaverine, 5.800~580.0 μg/ml ($r=0.9998$) for spermidine and 2.533~192.7 μg/ml ($r=0.9999$) for spermine. The average recoveries were between 94.27%~109.3%. The RSDs of precision were less than 4%. **Conclusion** The present study provided a sensitive and reproducible method for the simultaneously determination of four polyamines levels in *Candida albicans*.

[Key words] polyamines; pre-column derivation; HPLC; *Candida albicans*

多胺是一类具有生物活性、低分子量的含氮有机化合物的总称^[1], 广泛存在于原核及真核生物细胞中。多胺具有多种重要的生理功能, 如: 稳定核酸上的电荷、清除活性氧^{2,3}; 调节细胞的生长和分化⁴。有研究表明, 通过控制多胺水平可影响白念珠菌菌丝形成⁵, 所以多胺可能是诱导白念珠菌被膜形成的重要因素之一。要研究多胺在白念珠菌被膜形成的作用, 则需建立一种简单、有效的测定白念珠菌中多胺含量的方法。

目前, 多采用化学衍生化-高效液相色谱

(HPLC)法测定生物样品中的多胺。常见的衍生化试剂有邻苯二甲醛⁶、丹磺酰氯⁷或苯甲酰氯等。邻苯二甲醛反应快速, 但只能与伯胺反应, 采用柱前衍生化不能对精胺和亚精胺进行测定; 丹磺酰氯具有荧光响应, 但稳定性较差; 苯甲酰氯则具有洗脱时间短, 稳定性好, 价格便宜的优点。故本实验采用苯甲酰氯柱前衍生化-HPLC法测定白念珠菌中多胺的含量, 比较浮游型和被膜型白念珠菌中多胺的含量变化, 为进一步探讨其作用机制奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 试剂 多胺标准品: 腐胺、尸胺、精胺、亚精胺均购自上海晶纯实业公司; 苯甲酰氯(美国 Sigma 公司); 甲醇为色谱纯(Merk 公司); 水为超纯水; 其他

[基金项目] 国家自然科学基金(81273474, 81271798)。

[作者简介] 纪松岗(1964-), 男, 博士, 主任药师。E-mail: jisonggang@126.com。

[通讯作者] 朱臻宇。Tel: (021)81871261, E-mail: zzyzfzhu163.com。

试剂均为分析纯。

1.2 菌株和培养基 白念珠菌 SC5314 由 William A. Fonzi 教授惠赠。

YPD 培养液:酵母浸膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 ml 溶解,定容至 1 000 ml,高压灭菌(121 °C,15 min)后 4 °C 保存备用。

SDA 固体培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,琼脂 18 g,加三蒸水 900 ml 溶解,调整 pH 值至 7.0,以三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌(121 °C,15 min)后于 4 °C 保存备用。

RPMI-1640 液体培养液:RPMI-1640(Gibco BRL) 10 g,NaHCO₃ 2.0 g,吗啡啉丙磺酸(MOPS)(Sigma 公司)34.5 g,加三蒸水 900 ml 溶解,NaOH 调 pH 值至 7.0(25 °C),三蒸水定容至 1 000 ml,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后于 4 °C 保存备用。

PBS 液:NaCl 8.0 g,KCl 0.4 g,Na₂HPO₄ 0.133 g,KH₂PO₄ 0.06 g,NaHCO₃ 0.35 g,加三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌后 4 °C 保存备用。

1.3 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪;G1314 紫外检测器;十万分之一电子天平(美国梅特勒公司);微型漩涡混合仪(Thermo 公司);MJX 型智能霉菌培养箱;SW-CT-1F 型超净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 白念珠菌样品制备

2.1.1 真菌培养

浮游型:从平板上挑取白念珠菌单克隆,接种于 1 ml YPD 培养液,于 30 °C,200 r/min 振荡培养至对数生长期后期,收集细胞,PBS 洗涤 3 次,重悬于 RPMI-1640 培养基,以血球计数板计数,调整细胞浓度至 1.0 × 10⁶/ml。各锥形瓶中加入 20 ml,37 °C,50 r/min 振荡培养后,于 24 h 收集样品,备用。浮游型白念珠菌平行培养 5 份。

被膜型:从平板上挑取白念珠菌单克隆,接种于 1 ml YPD 培养液,于 30 °C,200 r/min 振荡培养至对数生长期后期,收集细胞,PBS 洗涤 3 次,重悬于 RPMI-1640 培养基,以血球计数板计数,调整细胞浓度至 1.0 × 10⁶/ml。各塑料组织培养瓶中加入 20 ml,37 °C 静置 1 h,弃上清,重新加入新鲜 RPMI-1640 培养基,37 °C,50 r/min 振荡培养 24 h,收集样品,备用。被膜型白念珠菌平行培养 5 份。

2.1.2 样品前处理 样品淬灭:往样品中加入等体积的 60% 甲醇溶液(预冷 -20 °C)后,迅速混匀,-40 °C 冰箱放置 5 min,取出后,6 000 r/min 离心。

胞内多胺的提取:收集培养的白念珠菌,用

PBS 清洗 3 次,加入 1 ml 预冷的 5% 高氯酸水溶液,-80 °C 冰冻 15 min,取出至 60 °C 水浴溶解,重复冻融操作 3 次,13 200 r/min 离心,取上清液。

菌体干重的测定:将所有提取后的样品沉淀在室温下风干至恒重,称样品干重。至少称量 3 次以确保样品完全干燥。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取腐胺、尸胺、亚精胺和精胺对照品 33.0、27.6、20.8、33.3 mg,蒸馏水溶解,定容于 10 ml 容量瓶中,摇匀。置于 -20 °C 冰箱储存。

2.3 混合标准溶液的配制 精密移取对照品储备液用蒸馏水逐级稀释,得 7 个浓度梯度的混合标准溶液(腐胺为:0.775、1.938、3.875、7.750、19.38、38.75、77.50 μg/ml,尸胺为 1.160、2.900、5.800、11.60、29.00、58.00、116.0 μg/ml,亚精胺为 5.800、14.50、29.00、58.00、145.0、290.0、580.0 μg/ml,精胺为 2.533、5.632、11.20、21.83、55.67、110.5、192.7 μg/ml)。测定前配制。

2.4 衍生化 取胞内提取液 0.8 ml,加到 10 ml 带盖塑料离心管中,加入 50 μl 苯甲酰氯,2 mol/L NaOH 溶液 1 ml,混匀,37 °C 水浴反应 10 min,加入 2 ml 饱和 NaCl 溶液,混匀后用乙醚振荡提取(2 ml × 2),合并醚相,真空干燥。300 μl 甲醇溶解,0.45 μm 滤膜过滤,以备色谱进样。

2.5 色谱条件 色谱柱:资生堂 C₁₈ 色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 3.0 μm);流动相:A 相为甲醇,B 相为 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱,洗脱程序:0 ~ 5 min,30% ~ 48% B;5 ~ 12 min,48% B;12 ~ 15 min,48% ~ 70% B;15 ~ 25 min,70% B;流速:0.6 ml/min,柱温:35 °C;进样量:5 μl;检测波长:254 nm。

3 结果与讨论

3.1 衍生化条件的优化 实验表明,温度和时间对多胺衍生物的影响较大,37 °C 反应 10 min 时,衍生物产率最高。因此,最终采用在 37 °C 的水浴中反应 10 min。对照品的色谱图见图 1。

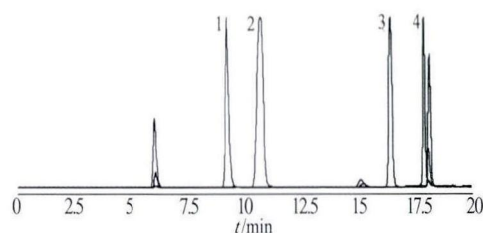


图 1 混合对照品的 HPLC 色谱图

1-腐胺;2-尸胺;3-亚精胺;4-精胺

3.2 线性关系 将系列混合标准溶液分别按“2.4”项下方法进行衍生化,色谱进样测定。分别以峰面积和浓度进行回归得线性方程,结果表明 4 种多胺的线性关系良好(表 1)。

表 1 4 种多胺的线性回归方程、定量限及检测限

多胺名称	回归方程	r	定量限 ($\mu\text{g/ml}$)	检测限 ($\mu\text{g/ml}$)
腐胺	$y = 0.0465x - 0.1991$	0.9999	0.38	0.12
尸胺	$y = 0.3543x - 0.4776$	0.9999	0.58	0.19
亚精胺	$y = 0.2530x - 15.0430$	0.9998	2.90	0.87
精胺	$y = 0.5429x + 2.5316$	0.9999	1.20	0.38

3.3 加样回收率 向样品中分别加入精密称取的腐胺、尸胺、精胺和亚精胺对照品适量,按“2.4”项下方法制备测定,用标准曲线计算,并求回收率,结果表明此方法的准确性良好,符合含量测定的要求(表 2)。

3.4 精密度实验 取低、中、高 3 个浓度的混合标准溶液,按上述衍生化及色谱条件于一天内连续进样 3 次,连续 3 d 进样,进行日内精密度和日间精密度考察,结果显示 4 种多胺峰面积的 RSD 均 < 4%,表明方法的重现性良好。

表 2 4 种多胺的回收率实验结果 ($n = 3$)

多胺名称	供试品含量 ($\mu\text{g/ml}$)	加入量 ($\mu\text{g/ml}$)	测得量 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
腐胺	21.62	19.38	38.86	88.96	94.27
	20.94		39.19	94.17	
	21.79		41.11	99.69	
尸胺	5.648	5.800	12.42	116.8	109.3
	5.613		11.99	109.9	
	5.726		11.60	101.3	
亚精胺	366.7	145.0	536.4	117.0	102.6
	368.4		492.5	85.59	
	363.8		516.3	105.2	
精胺	322.4	432.0	782.2	106.4	109.2
	326.5		796.4	108.8	
	319.8		805.1	112.3	

3.5 检测限与定量限 各待测物的检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别以信噪比(S/N)3 和 10 来计算。结果详见表 1。

3.6 样品测定 收集浮游型和被膜型白念珠菌的胞内提取液,按上述方法对 4 种多胺进行定量测定分析,每个样品的各个峰面积除以各自细胞的干重,含量变化柱状图见图 2。

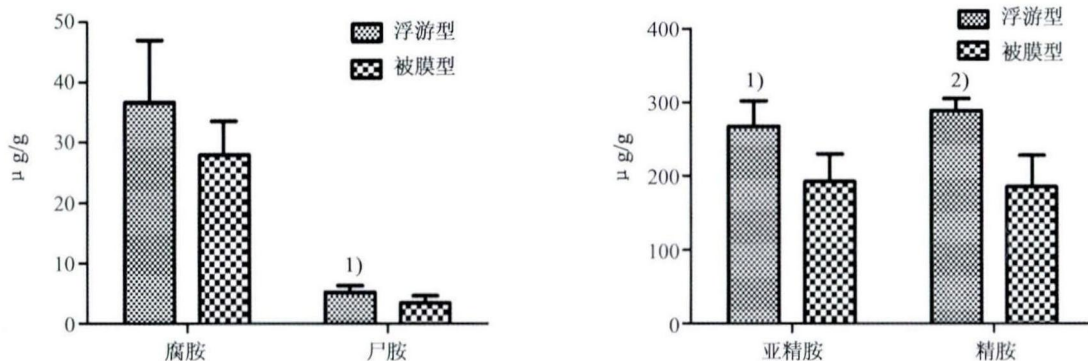


图 2 浮游型 () 和被膜型 () 白念珠菌胞内 4 种多胺的含量柱状图

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与被膜型白念珠菌比较

从图 2 可以看到,白念珠菌胞内精胺和亚精胺的含量明显高于腐胺和尸胺,这与 Cao 等⁸的报道相一致。有报道称,控制多胺含量可以影响白念珠菌的形态转化⁵。本文的研究结果表明,浮游型白念珠菌中多胺的含量均高于被膜型白念珠菌,其中尸胺、亚精胺和精胺有明显差异,有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这从另一方面揭示了多胺在白念珠菌形态转化过程中起重要作用,但其潜在的作用机制尚需进一步研究。

4 结论

本实验采用柱前衍生化-高效液相色谱柱法测定白念珠菌中多胺的含量。方法学考察和样品测定

结果表明该方法灵敏度高、重现性好,可用于测定白念珠菌中多胺的含量,从而为进一步研究多胺对白念珠菌被膜形成机制的作用奠定基础。

【参考文献】

- [1] 赵新颖,焦霞,夏敏,等. 离子色谱法同时测定水源水中的 5 种生物胺[J]. 色谱,2009,27(4):505.
- [2] Tabor CW, Tabor H, Tyagi AK, et al. The biochemistry, genetics, and regulation of polyamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fed Proc, 1982, 41(14): 3084.
- [3] Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism[J]. Biochem J, 2003, 376(Pt1): 1.

(下转第 453 页)

表2 加样回收率试验

成分	取样量(ml)	样品中量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
黄芩苷	1.0	415.4	425.6	849.2	101.93	101.68	2.85
	1.0	415.4	425.6	854.8	103.25		
	1.0	415.4	425.6	834.7	98.53		
	1.0	415.4	425.6	831.4	97.75		
	1.0	415.4	425.6	858.7	104.15		
	1.0	415.4	425.6	860.1	104.49		
肉桂酸	1.0	25.98	25.35	51.83	101.97	101.46	2.07
	1.0	25.98	25.35	51.34	100.04		
	1.0	25.98	25.35	51.67	101.36		
	1.0	25.98	25.35	50.98	98.61		
	1.0	25.98	25.35	51.82	101.92		
	1.0	25.98	25.35	52.56	104.85		

表3 样品含量测定结果(n=3, μg/ml)

编号	批号	黄芩苷	肉桂酸	编号	批号	黄芩苷	肉桂酸
1	111121	415.4	25.98	11	120320	512.8	23.11
2	111128	295.2	24.58	12	120326	868.3	14.71
3	111205	163.9	22.05	13	120409	785.7	14.83
4	111212	271.9	22.49	14	120410	622.0	24.91
5	111219	458.2	15.63	15	120416	719.7	18.42
6	111226	271.9	19.60	16	120423	650.2	15.38
7	120305	269.2	17.11	17	120424	525.7	16.55
8	120306	430.7	17.74	18	120507	676.4	13.70
9	120312	265.7	24.21	19	120521	698.2	11.91
10	120319	702.5	14.97	20	120528	645.7	11.37

笔者前期曾对扁咽口服液中黄芩苷的含量进行测定,并对其在生产过程中的转移率进行了评价^[4,5]。为了更加准确地检测有效成分,提供扁咽口服液质量评价与控制的相关依据,本实验通过HPLC法同时测定黄芩苷和肉桂酸含量,能够有效保证制剂的一致性和稳定性。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010年版一部[S].

北京:中国化学工业出版社,2010:108.

[2] 雷 芳. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(15): 87.
[3] 张春乐,宋康康,陈祥仁,等. 肉桂酸及其衍生物的抑菌活性研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006, 45(增):16.
[4] 李 翔,刘饭阳,马建丽,等. HPLC法测定扁咽口服液中黄芩苷的含量[J]. 解放军药学学报,2012,28(3):254.
[5] 李 翔,刘饭阳,马建丽,等. 扁咽口服液生产过程中黄芩苷转移率的研究[J]. 药学实践杂志,2012,30(4):289.

[收稿日期]2012-12-17

[修回日期]2013-04-08

(上接第414页)

[4] Heby O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation[J]. Differentiation,1981,19(1): 1.
[5] Herrero AB, Lopez MC, Garcia S, et al. Control of filament formation in Candida albicans by polyamine levels[J]. Infect Immun, 1999,67(9): 4870.
[6] 江 丽,杭太俊,张婷婷,等. 柱前衍生化 HPLC法测定复方布洛芬片中精氨酸的含量[J]. 药学进展,2006,30(5):221.

[7] 付 敏,赵卫红,苗 辉,等. 高效液相色谱法测定海水中游离态腐胺、亚精胺和精胺[J]. 分析化学研究报告,2010,38(10):1445.
[8] Cao YY, Zhu ZZ, Chen XF, et al. Effect of amphotericin B on the metabolic profiles of Candida albicans[J]. J Proteome Res, 2013,12(6): 2921.

[收稿日期]2013-08-28

[修回日期]2013-10-31