

气质联用法定量分析白念珠菌中甾醇含量

王添琦¹, 李祥², 李玲¹, 吴海棠¹, 徐立³ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 解放军 62380 部队, 北京 100071; 3. 解放军第 113 医院医械科, 浙江宁波 315040)

[摘要] 目的 建立气质联用法(GC-SIM-MS)测定白念珠菌中羊毛甾醇和麦角甾醇的含量。方法 白念珠菌经离心、皂化、提取出甾醇部分后溶解于环己烷中,采用 HP-5 毛细管柱进行气相色谱分析,柱温:程序升温 150~320℃,起始温度 150℃,按 10℃/min 升至 300℃,再按 20℃/min 升至 320℃;检测器温度 270℃;进样口温度 270℃;载气:氮气 1 ml/min;质谱检测器:EI 离子源,电力电压 70 eV;SIM Scan; the selected ions:3.00~17.50 min, 275,386; 17.50~19.00 min, 363,396;19.00~30.00 min, 411,426;进样量:1 μl;无分流比。结果 羊毛甾醇和麦角甾醇线性关系良好(r 分别为 0.999 8 和 0.999 5),回收率在 91.2%~117.3% (RSD < 2.5%),最低检测限分别为 18.29 ng/ml 和 68.13 ng/ml,日内及日间精密度良好(RSD 均小于 1.2%)。结论 本方法准确、灵敏、专属性强,结果可靠,为抗真菌药物研究提供了有力的工具。

[关键词] 气质联用法;羊毛甾醇;麦角甾醇;含量测定;白念珠菌

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0277-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.010

Determination of sterols in *Candida albicans* by GC-SIM-MS

WANG Tian-qi¹, LI Xiang², LI Ling¹, WU Hai-tang¹, XU Li³ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433 China; 2. No. 62380 PLA troops, Beijing 100071 China; 3. Department of Medicinal Instrument, The 113th Hospital of PLA, Ningbo 315040 China)

[Abstract] **Objective** To establish a method of GC-SIM-MS for the determination of sterols in *Candida albicans*, including lanosterol and ergosterol. **Methods** The sterols extracted from *Candida albicans* were analyzed by gas chromatography with a HP 50 capillary column, temperature from 150℃ to 300℃, 10℃/min, then, increased from 300℃ to 320℃, 20℃/min; detected temperature was 270℃; injection temperature was 270℃; carrier gas was Helium, flow rate was 1 ml/min; no splic. Mass spectrometry: EI Ion source, Ionization voltage: 70 eV; SIM Scan; the selected ions: 3.00~17.50 min, 275,386; 17.50~19.00min, 363,396; 19.00~30.00 min 411,426. **Results** Linear relation of lanosterol and ergosterol were good ($r=0.999 8$ and $0.999 5$ respectively). The average recoveries were between 91.2%~117.3%, RSD < 2.5%. The lowest limit of detect was 18.29 ng/ml and 68.13 ng/ml respectively, the precision within day were good (RSD < 1.2%). **Conclusion** This method was accurate, sensitive and specific. The results were reliable, which provided a powerful tool for the study of antifungal agents.

[Key words] gas chromatography mass spectrometry; lanosterol; ergosterol; determination; *Candida albicans*

过去的 20 年里,深部真菌感染日益成为院内主要的感染,在真菌感染中最为多见的是念珠菌。白念珠菌是所有这些致病性念珠菌中最常见的,约占 76%^[1]。麦角甾醇是真菌细胞质膜的重要成分,它参与多种细胞生物功能,包括细胞膜的完整性、流动性和键合在细胞膜上的酶的作用例如蛋白质的营养传输和壳多糖的合成^[2,3]。羊毛甾醇是麦角甾醇合成途径中主要的前体。目前临床应用最成功且仍作为一线药物而被广泛应用的酮康唑、氟康唑、特比萘芬等都是以麦角甾醇为作用靶点,发挥其抗真菌作用的^[4]。同样,多烯类药物包括两性霉素、制霉菌素等

药物分子也是通过与麦角甾醇结合而破坏了细胞的正常代谢^[5]。另外,有多类化合物已发现有抗真菌作用,这些物质的抗真菌作用部位、机制尚不明确,因此研究抗真菌药物的作用机制,探究真菌耐药机制,建立一种切实可靠的分析方法,可以为寻找更好的高效、低毒、广谱的抗真菌药物提供分子水平上的重要依据。

目前,已发展出广泛的分析技术测定甾醇类的含量,主要有薄层色谱法(TLC),毛细管气相色谱法(cGC),超临界流体法(SFC),高效液相色谱法(HPLC)等。其中最常见的是高效液相与质谱检测器串联(HPLC-MS/MS)^[6,7]和气相色谱法(GC)^[8]及气质联用(GC-MS)^[9,10]。液相色谱与质谱联用的方法重现性常常比较差。笔者通过气质联用法(GC-SIM-

[作者简介] 王添琦(1987-),女,硕士。E-mail: wangtianqistar@126.com.

[通讯作者] 徐立。E-mail: lerli@163.com.

MS), 定量分析测定了白念珠菌中麦角甾醇和羊毛甾醇等主要甾醇含量, 获得了理想的效果, 为抗真菌药物研究提供了有力的工具。

1 仪器与材料

1.1 仪器 DSQII 单重四极杆气质 (Thermo Fisher Scientific 公司); TRACE GC Ultra 气相色谱仪, EI 离子源, TriPlus 自动进样器, Xcalibur 数据系统软件, DSQII 单重四极杆质谱仪; 色谱柱: HP-5 柱 (30 mm × 0.25 mm, 0.25 μm); 德国 Eppendorf Research 微量移液器; THZ-C 振荡培养箱 (江苏太仓实验设备厂)。THZ-82A 台式恒温振荡器 (上海跃进医疗器械厂), 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂), Biofuge stratos 高速冷冻离心机 (Heraeus)。

1.2 试剂与培养基 麦角甾醇、羊毛甾醇和胆固醇对照品 (Sigma 公司), 环己烷、石油醚均为 GC 级 (Sigma 公司), 无水乙醇为分析纯。其余试剂购自上海生工有限公司。新鲜制备的皂化剂 (15% NaOH 的 90% 乙醇溶液); SDA 培养基, YPD 培养液; 0.1 M PBS 缓冲液 (pH 7.4)。

2 真菌的培养与样品制备

从 SDA 平板上挑取一个单克隆菌落于 1 ml YEPD 培养基, 30 °C, 200 r/min 振荡培养 16 h。取菌液 1.5 ml 于含 150 ml YPD 培养液的 250 ml 锥形瓶中。30 °C, 200 r/min 振荡培养 16 h 后 3 000 × g 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次至上清无色。去上清, 称各菌湿重, 分别精密称取约 0.5 g 于 50 ml 无塞玻璃管中, 加 PBS 缓冲液 6 ml 和新鲜制备的皂化剂 12 ml, 混匀, 80 °C 水浴皂化 60 min 冷却至室温。加石油醚 (沸程 40 ~ 60 °C) 10 ml, 涡旋混匀 1 min, 提取 3 次后合并提取液, 加水 10 ml 涡旋混匀洗涤, 移去水层。醚层在 60 °C 水浴挥干, 得未皂化脂, 加环己烷 500 μl 混匀后加封保鲜膜放置于 4 °C 冰箱备用。

3 结果与讨论

3.1 GC-MS 分析条件的选择和优化 为了提高灵敏度, 减少其他组分的干扰, 在 GC-MS 定量分析中, 经常采用选择离子扫描方式 (SIM)。采用合适的 SIM 方法, 选择特征质量峰检测, 以保留时间和离子碎片信息, 作为化合物定性定量的依据, 可最大化发挥 GC-MS 的优势。优化后的气质条件, 色谱柱: HP-5 柱 (30 mm × 0.25 mm, 0.25 μm); 柱温: 程序升温 150 ~ 320 °C, 起始温度 150 °C, 按 10 °C/min 升至 300 °C, 再按 20 °C/min 升至 320 °C; 检测器温度 270 °C; 进样口温度 270 °C; 载气: 氮气 1 ml/min; 质谱检测器: EI

离子源, 电力电压 70 eV; SIM Scan; the selected ions: 3.00 ~ 17.50 min, 275, 386; 17.50 ~ 19.00 min, 363, 396; 19.00 ~ 30.00 min, 411, 426; 进样量: 1.0 μl; 无分流比。按照以上 GC-MS 条件, 取细胞提取液 1 μl, 注入 GC-MS 仪所得质谱提取离子流图 (图 1)。

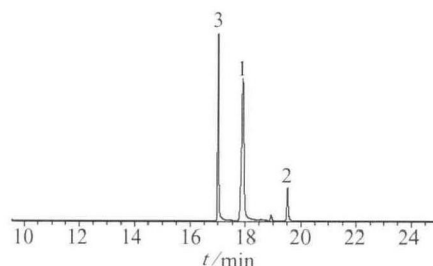


图 1 混合对照品色谱图

1-麦角甾醇, 2-羊毛甾醇, 3-胆固醇 (内标)

3.2 方法学验证

3.2.1 标准曲线、定量限和检测限 ①标准溶液的配制: 分别精密称取麦角甾醇、羊毛甾醇适量, 用环己烷定容至 5 ml 容量瓶, 使浓度分别为 2.004、0.540 4 mg/ml; 按照倍比稀释法, 制得不同浓度的麦角甾醇和羊毛甾醇混合对照品溶液。精密称取胆固醇 (内标) 适量, 用环己烷定容, 配制成浓度为 4.080 mg/ml 的母液。精密吸取胆固醇贮备液 80 μl 至各浓度的混合对照品中, 摇匀, 作为标准溶液。分别取 1 μl 依次连续进样, 按照优化后气质联用条件进行测定, 以对照品溶液浓度为横坐标 (X), 峰面积比值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。②最低定量限: 取麦角甾醇和羊毛甾醇储备液, 用环己烷依次稀释成不同浓度的样品液, 进样 1 μl 测定最低定量限, 以信噪比大于 10 计 (S/N ≥ 10)。③最低检测限: 取麦角甾醇和羊毛甾醇储备液, 用以上方法稀释, 以信噪比大于 2 ~ 3 (S/N ≥ 3) 估计麦角甾醇和羊毛甾醇的最低检测限, 详见表 1。

3.2.2 精密度考察 在气质联用条件下, 分别取高、中、低 3 种浓度的对照品溶液, 在 1 d 之内连续进样 5 次, 以及连续 3 d 分别进样, 计算各成分浓度的相对标准偏差 (RSD), 进行日内精密度和日间精密度考察, 结果显示日内和日间精密度良好, 见表 2。

3.2.3 稳定性试验 取同一样品溶液, 按上述色谱条件分别于 0、2、4、6、9、12 h 依次进样, 结果麦角甾醇和羊毛甾醇的 RSD 值均小于 2.7%, 表明样品溶液至少在 12 h 内稳定。

3.2.4 加样回收率 精密称取麦角甾醇、羊毛甾醇适量, 用环己烷定容, 使浓度分别为 5、0.35 mg/ml; 另精密称取胆固醇适量, 用环己烷定容, 配制成浓度为 3.2 mg/ml 的贮备液。精密取上述标准混合溶液

10, 20, 30 μl 各 3 份于 1.5 ml 离心管中,另取上述胆固醇溶液 20 μl 于上述各离心管中与样品溶液混合,充分混匀溶解,进样 1 μl ,计算回收率。本实验采用加样回收率法,在已知含量样品中加入定量对

照品,按照下式计算回收率:加样回收率(%) = $(C - A)/B \times 100\%$ 式中 A 为样品中被测成分含量;B 为加入对照品量;C 为实际测出成分含量。结果见表 3。

表 1 线性范围、检测限和定量限

甾醇	线性回归数据			LOD(ng/ml)	LOQ(ng/ml)
	回归方程	线性范围($\mu\text{g}/\text{ml}$)	r		
麦角甾醇	$Y=0.0074X-0.2113$	31.31~2003.85	0.9995	68.13	203.5
羊毛甾醇	$Y=0.0041X-0.0233$	8.444~540.38	0.9998	18.29	54.88

表 2 分析方法的日内、日间精密度测定结果

甾醇	对照品浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	日内(n=5)		日间(n=3)	
		峰面积比值	RSD(%)	峰面积比值	RSD(%)
麦角甾醇	62.62	0.266	0.65	0.268	0.83
	250.48	1.534	0.49	1.546	0.92
	1001.92	7.482	1.04	7.511	1.10
羊毛甾醇	16.89	0.052	0.46	0.052	1.05
	67.55	0.242	0.63	0.244	0.63
	270.19	1.077	2.18	1.063	1.24

表 3 回收率测定试验结果

甾醇	原有量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	RSD(%, n=3)
麦角甾醇	84.639	25.00	112.661	112.09	1.53
	84.639	50.00	135.921	102.57	0.58
	84.639	100.00	201.923	117.28	1.72
羊毛甾醇	5.223	1.75	6.875	94.36	2.56
	5.223	3.50	8.414	91.18	1.22
	5.223	7.00	13.288	115.21	1.39

3.2.5 GC-MS 方法用于样品的测定 将上述各石油醚提取液于试管中用环己烷复溶,另取浓度为 4.080 mg/ml 的胆固醇母液 20 μl 于每管样品中,充分混匀溶解,分别进样 1 μl 。用本法测定了 6 批样品,结果见表 4。

表 4 白念珠菌含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mg}$, n=3)

样品	麦角甾醇	羊毛甾醇
1	0.1829	0.0100
2	0.1875	0.0105
3	0.1870	0.0107
4	0.2029	0.0100
5	0.2048	0.0100
6	0.2132	0.0101

4 小结

麦角甾醇和羊毛甾醇等是真菌细胞膜的重要组成部分,研究药物对真菌甾醇生物合成的影响作用非常重要。由于甾醇类化合物的结构特性的原因,以往

的分析方法,如高效液相色谱、薄层色谱等,虽能达到分离和定性定量的目的,但存在不少缺点,诸如操作复杂且结果不直观、分离效果不理想、定量不准确等。本研究建立了同时测定白念珠菌中麦角甾醇和羊毛甾醇的 GC-SIM-MS 方法。经方法学研究表明,所建立的气质联用方法简便、快速、准确,重复性好,可为白念珠菌中的麦角甾醇和羊毛甾醇的测定提供依据。

由于甾醇类化合物本身的挥发性比较好,适合采用气质联用方法分析,省去了复杂的衍生化过程,并且此方法结合了 GC 的高分辨率和质谱的高灵敏度,可以较好的分离待测成分与内源性组分,避免干扰,提高测定结果的准确性。

此外,利用在 MS 上得到的总离子信息和 NIST 数据库中已知化合物的质谱图对比进行定性,进行验证,结果表明数据库中的质谱图与实测样品图相符。

【参考文献】

- [1] 吴绍熙.深部真菌感染的诊断与治疗[C].抗真菌药物与真菌感染诊治研究学术会议论文集,2003:21.
- [2] Lupetti A, Danesi R, Campa M, et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(2): 76.
- [3] Joseph HT, Hollomon DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 149(2): 141.
- [4] Kauffman CA, Carver PL. Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developments[J]. Drugs, 1997, 53(4): 539.

(下转第 320 页)

相关知识并建立解决方案,鼓励学生充分利用互联网和医学文献数据库等方式寻找答案,汇报方式以PPT为主,带教药师和其他学员针对汇报的不足,进行提问。在此形式下学生们可以轻松主动的进行学习,更能够畅所欲言,充分表达自己的观点,同时也可以获得来自其他同学和老师的信息;其次,可使存在的问题尽可能多地当场暴露,在讨论中可以加深对正确理论的理解,还可以不断发现新问题,解答新问题,使学习过程缩短,印象更加深刻;第三,它不仅对理论学习大有益处,还可锻炼学生们多方面的能力,如文献检索、查阅资料的能力,归纳总结、综合理解的能力,逻辑推理、口头表达的能力,主导学习、终身学习的能力等,这些将对今后开展临床工作打下良好基础。

3 建立标准化考核制度

参照药剂科实习生培养制度规定的内容对实习生进行考核,建立标准化考核制度,将实践考试与理论考试相结合。

3.1 对实习生的考核主要包括出科考试和基本技能考核两类 ①实习出科考试:采用理论考试,我院药剂科自行建立了药剂科实务考核标准化试题库,考题由该题库自行生成,考核成绩以百分制计算。②基本技能考核:考核内容根据实习大纲要求,结合各实习岗位情况,由带教老师进行基本技能考核。考核成绩以百分制计。

3.2 毕业实习成绩由三部分组成 平时考核占50%,由实习带教老师根据实习生平时表现,着重考查实习生的工作作风、组织纪律和完成实习任务情况;理论考试占30%;基本技能考核占20%。综合以上3部分所得成绩为毕业实习成绩,记入实习生实习档案。加强平时考核分数所占的比例,目的在

于督促学生做好日常工作,培养其良好的工作作风与态度,认真的工作亦能促进其掌握相关知识。

4 结语

21世纪医院药学发展方向是“以患者为中心”,临床药师应对用药结果负责,保证患者合理用药。我院药剂科在接受毕业学生前来实习时,坚决杜绝将实习学生当成免费劳动力使用的情况。在摸清每个学生各自特点的基础上,实施从病例出发、提出问题、分析问题、解决问题为导向的突出临床技能训练的毕业实习,实习学生不但接受了模拟真实工作环境下的业务训练,还增加了对医院药学工作的认识和理解,培养了适应医院工作环境的工作方法和思维方式,在实习的过程中培养了自主学习的能力,为将来进入医院参加临床药学工作、服务患者打下了坚实的基础。

【参考文献】

- [1] 胡晋红. 医院药学[M]. 第2版. 北京:人民军医出版社, 2002: 1.
- [2] 胡晋红,石力夫,蔡 溱,等. 适应药学模式的发展,探索本科生实习改革[J]. 药学服务与研究, 2003, 3(1): 16.
- [3] 蒋君好. 我国高等临床药学教育现状及人才培养模式研究[D]. 重庆医科大学, 2011.
- [4] 梁美凤,林锦魁,魏金婷,等. 药学本科临床实践教学的探讨[J]. 海峡药学. 2011, 23(2): 189.
- [5] 亢泽春,张树平,王垣芳. PBL教学在药学专业临床药物治疗学中的应用[J]. 黑龙江教育(高教研究与评估). 2012, 6: 37.
- [6] 刘燕敏,廖慧钰,黄云丽,等. PBL教学方法在传染病学临床见习带教中应用探讨[J]. 中国高等医学教育. 2012, 5: 97.

[收稿日期] 2012-09-18

[修回日期] 2012-11-28

(上接第279页)

- [5] White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1): 382.
- [6] Toh, TH, Prior BA, Merwe MJ. Quantification of plasma membrane ergosterol of *saccharomyces cerevisiae* by direct-injection atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2001, 288(1): 44.
- [7] Headley JV, Peru KM, Verma B, et al. Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural wetland[J]. J Chromatogr A, 2002. 958(1-2): 149.
- [8] 刘洪涛,吴 洪,曹永兵,等. 衍生化-毛细管气相色谱法定量分析白念珠菌中甾醇含量[J]. 药物分析杂志, 2001: 264.
- [9] Saraf A, Larsson L, Burge H, et al. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a limulus amoebocyte lysate assay[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(7): 2554.
- [10] Axelsson BO, Saraf A, Larsson L. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995, 666(1): 77.

[收稿日期] 2012-12-04

[修回日期] 2013-02-28