

羽苔素 E 对白念珠菌细胞内氟康唑浓度的影响研究*

冷萍^{1,2}, 郭秀丽^{1**}, 邢杰¹, 娄红祥^{1**}

(1. 山东大学药学院, 济南 250012 2 青岛大学附属医院药剂科, 青岛 266003)

摘要 目的: 建立高效液相色谱质谱联用技术测定耐药真菌细胞内氟康唑的浓度并观察羽苔素 E 对细胞内氟康唑聚集的影响。方法: 将白念耐药株菌悬液与氟康唑单独培养或氟康唑和羽苔素 E 联合培养 24 h 后, 经离心、皂化、提取等过程得到菌体细胞内聚集的氟康唑。样品以 Phenomenex-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行分离, 流动相为醋酸铵-乙腈 (3:7, v/v), 流速 0.8 mL·min⁻¹。正离子方式检测, 多反应监测 (MRM) 方式测定样品浓度, 监测离子对分别为 m/z 307.4⁺ 220.3 (氟康唑) 和 m/z 531.2⁺ 489.3 (内标酮康唑)。通过测定氟康唑的浓度, 观察不同浓度羽苔素 E 对细胞内氟康唑浓度的影响。结果: 高效液相色谱质谱联用法可用于真菌细胞内氟康唑浓度的测定。氟康唑在 1~100 μg·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 ($r=0.9956$), 最低定量限为 1 μg·L⁻¹。低、中、高 3 种浓度质控样品的日内、日间精密度小于 6.4%, 方法回收率 94.1%~98.3%。并且羽苔素 E 能显著增加耐药株细胞内氟康唑的浓度, 呈剂量依赖性。结论: 羽苔素 E 能显著提高耐药株菌体细胞内氟康唑的浓度, 是羽苔素 E 和氟康唑合用产生协同作用的重要机理, 提示羽苔素 E 可能具有逆转氟康唑耐药的作用。

关键词: 羽苔素 E; 氟康唑; 白色念珠菌; 液相色谱质谱联用; 真菌耐药

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0564-05

HPLC-MS determination concentration of fluconazole and the impact of plagiocin E in *Candida albicans**LENG Ping^{1,2}, GUO Xiu-li^{1**}, XING Jie¹, LOU Hong-xiang^{1**}

(1 School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

2 Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract Objective To develop a bioanalytical method using HPLC-MS for detecting the concentration of fluconazole (FLC) in *Candida albicans* (*C. albicans*) cells and consequently evaluating the impact of plagiocin E (PLE) on the accumulation of FLC in FLC-resistant *C. albicans* cells. **Methods** FLC-resistant *C. albicans* cells were treated with FLC or FLC with PLE together. Samples of *C. albicans* thallus that were obtained by centrifuging after 24 h incubation saponified and centrifuged to extract FLC. The HPLC separation was performed on a Phenomenex-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, using ammonium acetate-acetonitrile (3:7, v/v) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The sample was analyzed in the positive-ion mode. Then multiple reaction monitoring mode with the transition of m/z 307.4⁺ 220.3 and m/z 531.2⁺ 489.3 were used to quantify fluconazole and ketoconazole (K), respectively. **Results** A good linearity of FLC was obtained in the concentration range of 1~100 μg·L⁻¹ ($r=0.9956$). The lower quantitative limit was 1 μg·L⁻¹. The inter- and intra-day RSDs were less than 6.4%, the method recoveries were in the range of 94.1%~98.3%. Results showed that PLE facilitated the accumulation of FLC in FLC-resistant *C. albicans* cells significantly in a dose-dependent manner. **Conclusion** PLE can increase the concentration of FLC in FLC-resistant *C. albicans* cells markedly. This can be one of the important mechanisms attributed to the synergistic effect of PLE in combination with FLC against the resistant strains.

Key words plagiocin E; fluconazole; *Candida albicans*; HPLC-MS; fungal resistance

* 国家自然科学基金资助课题 (30672531)

** 通讯作者 郭秀丽 Tel (0531) 88382542; E-mail guox@sdu.edu.cn

娄红祥 Tel (0531) 88382019; E-mail luhongxiang@sdu.edu.cn

羽苔素 E (phigibchin E, PLE) 是一种新型的双联苯类化合物, 是由苔藓植物地钱中提取分离得到的一系列天然植物酚类化合物之一。本课题组前期的实验结果表明 PLE 与氟康唑 (fluconazole, FLC) 合用, 可明显降低 FLC 对白念耐药菌株的用量, 使 FLC 在低剂量时仍能发挥抗真菌作用^[1], 提示 PLE 可能升高真菌细胞内 FLC 浓度, 从而逆转白念珠菌对 FLC 的耐药。因此, 本文旨在观察不同剂量的 PLE 对白念耐药菌株中 FLC 浓度的影响。针对白念耐药菌株中 FLC 浓度较低的特点, 我们对以前已建立的高效液相色谱与质谱联用检测 FLC 浓度的方法进行了改进^[2], 从而能够较准确地测定真菌细胞内 FLC 的浓度, 以期对 PLE 逆转 FLC 耐药的机制做初步探讨。

1 材料

1.1 药品与试剂 FLC 对照品 (纯度 99.8%) 由山东省生物药物研究院提供, 内标酮康唑对照品购自中国药品生物制品检定所, PLE 由山东大学药学院天然药化实验室提供。甲醇、乙腈、醋酸铵为色谱醇, 美国 Fisher Scientific 公司生产, 其余试剂均为分析醇, 水为纯净水。

1.2 仪器 HP1100 高效液相色谱仪 (德国 Agilent 公司), API 4000 质谱仪 (美国 AB 公司), 配有电喷雾离子源。

1.3 实验菌株 1 株白色念珠菌耐药菌 QL-28 由山东省齐鲁制药厂真菌研究中心提供, MIC = 128 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为醋酸铵-乙腈 (3:7), 流速 0.8 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样体积为 10 μL ; 样品采集时间为 4.5 min。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源, 离子喷射电压为 5.5 kV; FLC 与内标酮康唑的 DP 电压分别为 120 120 V; 气帘气体 (N₂) 压力为 68.9 kPa 离子源气体 1 (N₂) 压力为 378.95 kPa 离子源气体 2 (N₂) 压力为 344.5 kPa 温度为 550 °C。

正离子方式检测, 扫描方式为多反应监测 (MRM); FLC 与内标酮康唑的碰撞诱导解离电压分别为 30 45 eV。用于定量分析的离子对分别为 m/z

307.4⁺ 220.3 (FLC) 和 m/z 531.2⁺ 489.3 (内标酮康唑)。

2.3 样品制备 白念耐药株 QL-28 在 SDA 培养基上 2 次培养, 以保证菌株的纯度和生长力。调整菌悬液的浓度是 10⁸ cfu · mL⁻¹。加入菌悬液 2 mL, FLC 甲醇溶液 (7.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL, 不同浓度的 PLE 溶液 (PLE 溶解于二甲基亚砷中制得) 适量, 最后加 RPMI-1640 液体培养基至 30 mL, 则菌悬液的终浓度是 0.6 × 10⁷ cfu · mL⁻¹, FLC 的最终浓度是 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。PLE 的浓度分别是 8 32 128 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对应的分别是 0.5 2 8 MIC (PLE 对白念菌株的 MIC 值为 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。在 35 °C 菌悬液振荡培养 24 h 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min 得菌体沉淀。将真菌细胞进行冷冻干燥。称取冻干的白色念珠菌细胞 4 mg 加入 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 0.2 mL, 1% 氢氧化钠甲醇溶液 0.4 mL (15 g 氢氧化钠溶于 10 mL 三蒸水中, 加甲醇至 100 mL), 加入酮康唑甲醇溶液 (终浓度是 200 ng · mL⁻¹), 在 80 °C 进行皂化 60 min, 皂化后, 10000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清液转移至 EP 管中, 用甲醇冲悬剩余的沉淀, 加入冲悬后的溶液 0.4 mL, 再加入甲醇-盐酸溶液 (1:1) 0.2 mL, 10000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取 1 mL 上清液转移至另外的 EP 管中, 真空干燥, 检测前用 0.2 mL 甲醇溶解。所有实验重复 3 次。

2.4 质谱分析 采用正离子方式检测, 于一级全扫描质谱图中获得 FLC 准分子离子峰 [M + H]⁺ m/z 307 (图 1-A), 选择该准分子离子峰进行碰撞诱导电离, 获得 FLC 的主要碎片峰为 m/z 238.3 220.3 (图 1-A')。内标酮康唑准分子离子峰 [M + H]⁺ m/z 531 (图 1-B), 同法获得酮康唑的主要碎片峰为 m/z 489.3 (图 1-B')。选定碎片峰 m/z 220.3 489.3 作为 MRM 定量碎片离子, 分别用于定量分析 FLC 和酮康唑。

2.5 方法学研究

2.5.1 储备液的配制

FLC 储备液: 精密称取 FLC 对照品 0.1080 g 用甲醇溶解, 并定容至 100 mL 量瓶中, 待用时稀释成 1, 2, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

内标储备液: 精密称取酮康唑对照品 0.054 g, 用甲醇溶解, 并定容至 100 mL 量瓶中, 待用时稀释成 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

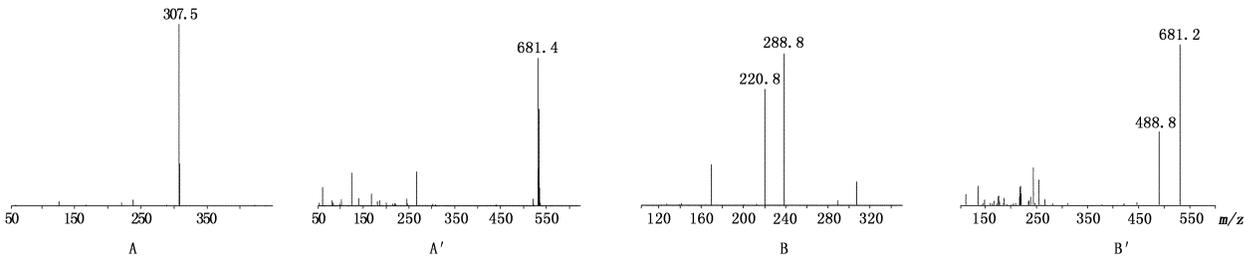


图 1 氟康唑 (A, A') 和内标酮康唑 (B, B') 全扫描质谱图

Fig 1 Full scan mass spectrometry (MS) spectra of fluconazole (A, A') and ketoconazole (B, B')

A, B, 一级全扫描质谱图 (MS full scan) A', B', 二级全扫描质谱图 (MS² full scan)

2.5.2 方法专属性 取空白的白念冻干菌 4 mg 除不加内标溶液外, 按“2.3”项下方法操作, 获得空白样品的色谱图 (图 2-A)。将浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FLC 混合 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标酮康唑加入空白的冻干

菌中, 依同法操作, 获相应的色谱图 (图 2-B)。结果表明, 空白的冻干菌中的内源性物质不干扰 FLC 和内标酮康唑的测定。该法获得的色谱图具有较高的专属性。

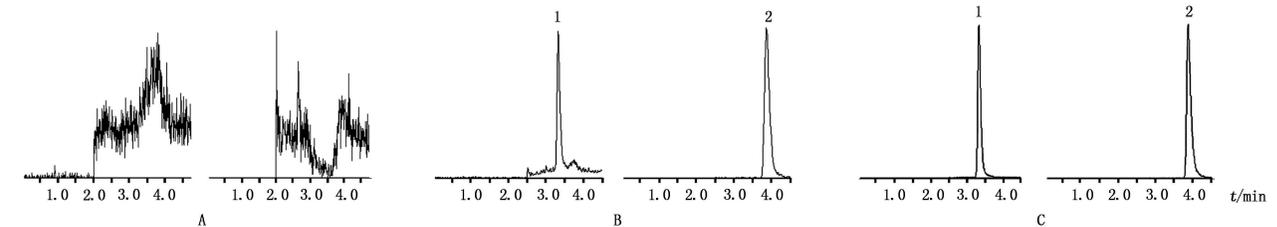


图 2 HPLC-MS 色谱图

Fig 2 HPLC-MS chromatograms of the samples

A. 空白样品 (blank sample) B. 空白样品加 FLC 及酮康唑 (blank sample spiked with $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FLC and $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ketoconazole) C. 白念耐药株与 PLE 以及 FLC 联合培养的样品 (the sample of resistant *C. albicans* cells treated with $128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PLE and $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ FLC)

1 氟康唑 (fluconazole) 2 内标酮康唑 (ketoconazole internal standard)

2.5.3 标准曲线和线性范围 取空白的白念冻干菌 4 mg 加 FLC 系列对照品溶液 0.6 mL, 按“2.3”项下方法操作, 进样, 记录色谱图。以对照品浓度 (X) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算^[3], 求得直线回归方程:

$$Y = 0.11X + 0.607 \quad r = 0.9956$$

线性范围为 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量下限是 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.4 准确度试验 取空白的白念冻干菌 4 mg 按“2.5.3”项下方法制备 FLC 低、中、高 3 个浓度 ($1.50 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 每一浓度进行 6 样本分析, 取平均值。同时另取空白的白念冻干菌 4 mg 除不加系列对照品溶液和内标溶液外, 按“2.3”项下方法制备 1 mL 上清液, 向上清液中加入内标溶液和相应浓度的系列对照品溶液。真空干燥, 检测前用 0.2 mL 甲醇溶解, 取 $10 \mu\text{L}$ 进样分析, 获得相应浓度的

峰面积。以每一浓度的 2 种处理方法的峰面积比值计算回收率, 3 种浓度的回收率分别是 95.9%, 94.1%, 98.3%。见表 1。

表 1 样品的回收率 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recovery of samples

加入浓度 (added) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	测定浓度 (found) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 (recovery) %	RSD %
1.0	0.96 ± 0.06	95.9 ± 6.08	6.3
50.0	47.1 ± 3.10	94.1 ± 6.20	6.6
100.0	98.3 ± 3.35	98.3 ± 3.35	3.4

2.5.5 精密度试验 取空白的白念冻干菌 4 mg 按“2.5.3”项下方法制备 FLC 低、中、高 3 个浓度 ($1.50 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 并与标准曲线同时进行, 以标准曲线计算 QC 样品的浓度, 将 QC 样品的结果进行方法分析, 测定其日间精密度和日内精密度, 结果见表 2。

表 2 样品的精密度 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Result of precision of samples

加入浓度 (added) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	测得浓度 (found) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		RSD %	
	日间 (inter-day)	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	日内 (intra-day)
1.0	1.02 ± 0.07	1.01 ± 0.05	6.4	4.8
50.0	51.22 ± 1.61	51.33 ± 2.00	3.2	3.9
100.0	101.82 ± 3.75	96.33 ± 4.19	3.7	4.4

2.5.6 稳定性考察 本试验考察 FLC 样品经历 3 次冷冻解冻循环的稳定性、样品 - 20 °C 冷冻保存 1 个月的稳定性和处理后的样品在室温放置 24 h 的稳定性。取空白的白念冻干菌 4 mg 按“2.5.3”项下的方法制备低、高 2 个浓度 (1, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的样品, 每一种稳定性考察进行 3 样本分析。结果表明 FLC 样品经过 3 次冷冻解冻循环后稳定 (RSD 为 4.8%), - 20 °C 冷冻保存 1 个月后稳定 (RSD 为 5.9%), 处理后的样品室温放置 24 h 后稳定 (RSD 为 2.9%)。

2.6 PLE 对白色念珠菌中 FLC 浓度的影响 白色念珠菌耐药株与 FLC 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 单独培养, 或与 0.5, 2, 8 MIC 浓度 PLE 加 FLC 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 联合培养。检测白色念珠菌细胞内 FLC 的浓度, 观察 PLE 对菌株中 FLC 浓度的影响。并计算真菌细胞内 FLC 浓度的增长率 (IR), 增长率 (R, %) = (用药组细胞内 FLC 的浓度 - 空白对照组细胞内 FLC 的浓度) / 空白对照组细胞内 FLC 的浓度。实验结果见图 2。2 MIC 和 8 MIC $P < 0.01$ 。表 3 结果显示 PLE 能增加白色念珠菌耐药株中 FLC 的浓度, 且随着 PLE 浓度的增加, 真菌细胞内 FLC 的浓度也上升。

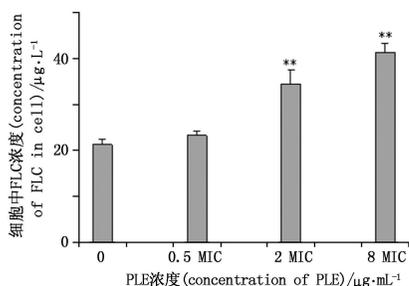


图 3 不同剂量的 PLE 对白色念珠菌中 FLC 浓度的影响

Fig 3 The impact of PLE on the concentration of FLC in resistant *C. albicans*

表 3 PLE 对 FLC 浓度的增长率 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Fig 3 The increasing rate of the FLC concentration on different doses of PLE

C / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	增长率 (rate of increase) %
8	9.5 ± 3.5
32	63.6 ± 14.0
128	96.2 ± 8.8

3 讨论

耐药真菌细胞内 FLC 的浓度很低, 定量限需达到 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级, 一般的检测方法很难较准确的测定其浓度。为了观察 PLE 对白念耐药株中 FLC 浓度的影响, 首先要建立准确性、专属性、灵敏度高的定性定量方法测定真菌细胞内的 FLC 浓度。另外, 由于本实验中测定的样品为生物样品, 具有取样量少、内源性物质干扰多等^[4]多种因素的影响, 所以必须根据待测物的结构、生物介质和预期的浓度范围, 建立灵敏度高、专属性强的生物样品定量分析方法。

本实验中, 菌悬液与 FLC 单独培养及与 FLC 和 PLE 联合培养后, 离心得到真菌细胞, 经皂化、提取等过程得到真菌细胞内聚集的 FLC。FLC 的分析及定量采用高效液相与质谱联用的方法, 经方法学研究证实所建立的检测方法灵敏、可靠。FLC 的定量是通过测定 m/z 307 的分子离子及 m/z 220 的碎片离子信号, 内标酮康唑的定量是测定 m/z 531 的分子离子及 m/z 489 的碎片离子信号来进行的。FLC 的最低检测限是 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 标准曲线的线性范围是 $1.0 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其相关系数为 0.9956。精密度和回收率的 RSD 均小于 10%, 符合生物样品的检测要求。实验结果显示, PLE 与 FLC 合用时, PLE 能明显升高白色念珠菌耐药株细胞内 FLC 的浓度, 且具有一定的剂量依赖关系。此结果提示 PLE 通过提高白念耐药菌株内 FLC 的浓度, 从而显著降低 FLC 对白念耐药株的 MIC 值, 这可能是两者合用对耐药株呈现协同作用的重要原因之一。

对临床分离的 FLC 耐药菌株的研究发现, 细胞内 FLC 浓度的降低是其产生耐药性的重要机制之一。近年来, 更多的研究表明耐药株细胞内 FLC 浓度的降低主要是由于细胞膜上主动外排泵的活化, 使真菌细胞对药物的排出增加所导致^[6]。与多重耐药的肿瘤细胞上存在 P-糖蛋白的活化相似, 所有呈现多重耐药性的菌株中都存在主动外排系统的活化。因此本实验结果提示 PLE 可能会影响白念耐药株的主动外排系统的活化或表达, 为进一步揭示 PLE 逆转 FLC 耐药的作用机制奠定了基础。

参考文献

- 1 LENG Ping (冷萍), GUO Xiu-li (郭秀丽), YANG Yue (杨月), et al. Primary study on antifungal activities and reversal of fluconazole resistance of *P. bergii* in E (羽苔素 E 体外抗真菌活性及逆转氟康唑耐药的初步研究). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, 42 (5): 349
- 2 Sun SJ, Lou HX, Gao YH, et al. Liquid chromatography-tandem mass

- spectrometric method for the analysis of fluconazole and evaluation of the impact of phenolic compounds on the concentration of fluconazole in *Candida albicans* *J Pharm Biomed Anal* 2004, 34(5): 1117
- 3 ZHONG Da-fang (钟大放). Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with weighted least squares method (以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线若干问题). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(5): 343
- 4 Vesman J Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry *J Pharm Biomed Anal*, 1996 14(8-10): 867
- 5 Charot I, Chaimbault P, Hasdentoufel F, et al. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*, 2004 1031(4): 281
- 6 Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, et al. Multiple efflux mechanism are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996 40(12): 2835

(本文于 2008年 7月 8日修改回)

中检所《中国药典》2010年版工作会议

4月3日,中国药品生物制品检定所召开会议要求各部门认真做好《中国药典》(2010年版)科研和编制相关工作。国家药典委员会副秘书长周福成、党委书记、所长李云龙、常务副所长金少鸿、副所长王军志、党委副书记 丽霞出席会议。标准化研究中心常务副主任杨化新主持会议。

做好《中国药典》(2010年版)的科研和编制工作对于完善和提高我国药品质量标准具有重要意义,中检所承担了其中较大一部分工作。高度重视、按照进度、保质保量地完成这项任务是中检所 2009年的重要工作之一。会上,丽霞传达了国家局“《中国药典》(2010年版)科研任务检查会议”精神,细胞室、化学药品室、药用辅料及包材室、中药室、放射药品室负责同志介绍了本部门完成这项工作的基本情况及存在的主要问题,杨化新介绍了中检所标准化研究管理体系的有关情况。

国家药典委员会副秘书长周福成在讲话中指出,中检所对 2010年版药典的科研和编制工作十分重视,为推动我国药典工作作出了很大贡献。他说,国家药典委员会与中检所通力合作,共同做好药典编制工作是确保人民群众饮食用药安全的需要,是促进我国医药产业健康发展的需要。对于如何进一步做好 2010年版中国药典相关工作,周福成强调,要树立“科研为标准服务,标准为监管服务,监管为安全服务”的理念,对药品标准坚定不移地实行“就高不就低”的原则。希望中检所能一如既往地支持国家药典委员会的工作,编制高水平的药典,为推动药品监管工作又好又快发展做出更大贡献。

中检所所长李云龙在讲话中指出,今年中检所工作的一个重点就是要抓好业务建设和业务管理,2010年版药典的科研和编制工作是抓好这两项工作的良好平台。能否高水平地完成这项工作是对中检所能力和形象的考验。各有关部门要尽职尽责,树立高度的责任感,带头树立中国药检新形象。为此,李云龙所长提出了五点要求:

一是领导要高度重视。做好药典科研和编制工作,关键在领导。分管所领导、各业务处领导要高度重视,加强协调,主动发现问题,及时解决问题。二是各业务处要充分发挥对本体系工作的综合、协调和管理职能,帮助和督促各业务科室保质保量地完成药典任务。三是相关科室要抓紧落实。这次的药典工作时间紧、任务重,相关科室要认真对待,克服困难,在保证质量的前提下加快进度,尽快完成。四是标准化研究中心要充分发挥全所药典工作的综合、协调、管理和督办职能,要积极协调,及时帮助各部门解决工作中的具体问题,把这项任务作为今年的重点工作来抓。五是以本次会议为契机,各部门要认真对待后续工作,在本次药典工作中展示中检所应有的能力和水平,为全国药检系统做出表率。

所长办公室、党委办公室负责人以及各有关业务处、业务科室的负责同志参加了会议。

详情请浏览中检所网站: <http://www.nicpbp.org.cn>