

· 论著 ·

红色诺卡菌细胞壁骨架中化学成分的鉴别与单糖含量测定

万众¹, 于丹², 王菲², 李伟², 张海³ (1. 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科, 上海 200080; 2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 3. 同济大学附属第一妇婴保健院药剂科, 上海 201204)

[摘要] 目的 分析鉴别红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)中的化学成分, 并对其中的单糖成分进行分析测定。方法 首先, 采用UHPLC-Q-TOF/MS方法对Nr-CWS提取物中的化学成分进行分离与分析, 通过与Metlin数据库中代谢物成分信息比对, 快速鉴别其中化学成分。然后, 对Nr-CWS提取物中多糖水解后衍生化, 采用UHPLC-MS/MS法对单糖衍生物进行定量分析, 测定单糖的含量。结果 共鉴别出Nr-CWS提取物中的64个化学成分, 主要包括氨基酸、单糖、脂肪酸等成分。此外, 建立了8种单糖柱前衍生化的UHPLC-MS/MS含量测定方法, 含量测定结果表明, Nr-CWS中阿拉伯糖和半乳糖的含量最高, 说明阿拉伯糖、半乳糖是组成Nr-CWS中多糖的主要组成成分。结论 通过对Nr-CWS中的主要化学成分进行了分离与分析, 对多糖水解后的单糖成分进行含量测定, 为今后开展Nr-CWS活性成分的筛选及药理作用机制的研究奠定基础。

[关键词] 红色诺卡菌细胞壁骨架; 化学成分; 鉴别; 单糖; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)05-0423-08

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202003073

Identification of chemical components and monosaccharide assay in *Nocardia rubra* cell wall skeleton

WAN Zhong¹, YU Dan², WANG Fei², LI Wei², ZHANG Hai³ (1. Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; 2. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Department of Pharmacy, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University, Shanghai 201204, China)

[Abstract] **Objective** To analyze and identify the chemical components in the *Nocardia rubra* cell wall skeleton (Nr-CWS), and to determine the contents of monosaccharides accurately. **Methods** The extract of Nr-CWS was separated and analyzed by UHPLC-Q-TOF/MS method. The chemical components were quickly identified by matching the data with the information in the Metlin database. The monosaccharide contents in the Nr-CWS extract were determined by UHPLC-MS/MS method after derivatization. **Results** A total of 64 chemical components were identified in the extract of Nr-CWS, including amino acids, monosaccharides and so on. A assay method for 8 monosaccharides by UHPLC-MS/MS was successfully established. The content of arabinose in Nr-CWS was the highest, followed by galactose, which indicated that the main polysaccharide components in Nr-CWS may be composed of these monosaccharides. **Conclusion** In this study, we analyzed the main chemical components of Nr-CWS, which are amino acids, fatty acids and so on. The content of monosaccharide after polysaccharide hydrolysis was determined by UHPLC-MS/MS. This will lay a foundation for the screening of the active components of Nr-CWS and the study of its pharmacological mechanism.

[Key words] *Nocardia rubra* cell wall skeleton; chemical component; identification; monosaccharide; determination

红色诺卡菌(*Nocardia rubra*, Nr)是一种放线菌, 其细胞壁骨架(*Nocardia rubra* cell wall skeleton, Nr-CWS)具有免疫调节作用^[1]。Nr-CWS

作为一种治疗药物现已在国内上市并在临床使用。研究表明, Nr-CWS在增强体内巨噬细胞、T细胞和自然杀伤细胞活性的同时, 还能诱导机体产生LAK细胞, 提高机体内T辅助性细胞和杀伤细胞活力、增强巨噬细胞和天然杀伤细胞免疫活性, 抑制肿瘤和增强免疫能力的功效^[2-4]。但Nr-CWS在发挥作用的同时, 往往还伴随一些副作用的发生。究其主要原因是由于红色诺卡菌细

[基金项目] 上海市卫健委科研面上项目(201740217)

[作者简介] 万众, 硕士研究生, Tel: (021) 63240090, Email: smmuwz@126.com

[通讯作者] 张海, 副教授, 研究方向: 药物分析, Tel: (021) 20261401, Email: zhxdks2005@126.com

胞壁是个细胞粗提物^[5], 其中的成分复杂, 具体哪种成分起相应的药理作用还不清楚, 这极大地影响了其临床使用及后续药理作用机制的研究。本研究拟采用 UHPLC-Q-TOF/MS 分析方法首先对 Nr-CWS 提取物中化学成分进行分离分析, 鉴别其中的化学成分; 并对其中的多糖成分进行水解, 然后对水解后的单糖进行衍生化处理, 与其他分析方法相比, UHPLC-MS/MS 具有较大的优越性^[6-8], 其灵敏度高、专属性强、可以快速准确地测定单糖的含量。所以本研究采用 UHPLC-MS/MS 方法对单糖衍生化产物进行定量分析测定, 这将为后期开展 Nr-CWS 活性成分筛选及药理作用机制的研究奠定基础。

1 材料

1.1 实验仪器

安捷伦-1290 Infinity 高效液相色谱系统-电喷雾离子源(安捷伦, Palo Alto, CA, USA)串联安捷伦 6538 四级杆-高分辨飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF/MS), 安捷伦-1290 Infinity 高效液相色谱系统-电喷雾离子源(安捷伦, Palo Alto, CA, USA)串联安捷伦 6460 三重四级杆质谱(UHPLC-MS/MS), AMIDE 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.5 μm, Waters, USA), Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), Milli-Q50 SP 纯水制备系统制备(Millipore Corporation, MA, USA), 电热干燥箱(上海恒科仪器有限公司, DHG-9145AZ)。

1.2 材料与试剂

Nr-CWS 提取物(辽宁格瑞士特生物科技有限公司, 按照产品工艺提取); Sephadex G-100(国药集团化学试剂有限公司); D-甘露糖、D-核糖、L-鼠李糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖(纯度>98%, 国药集团化学试剂有限公司); 三氟乙酸(TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP, 国药集团化学试剂有限公司); HPLC 色谱级甲醇、乙腈(默克公司, Darmstadt, Germany); 乙醇、甲酸(Fluka 公司, Buchs, Switzerland)。

2 方法与结果

2.1 Nr-CWS 提取物中化学成分分析与鉴别

2.1.1 UHPLC-Q-TOF/MS 成分分析与鉴别的条件

UHPLC-Q-TOF/MS 分析在安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统和安捷伦 6538 四级杆-高分辨飞行时间串联质谱仪(Agilent, USA)上进行, 色谱分离在 Amide 色谱柱上进行(3.0 mm×100 mm,

3.5 μm, Waters, USA), 柱温 40 °C, 流动相 A 为 0.1 % 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈溶液, 流速 0.4 ml/min, 流动相采用梯度洗脱, 洗脱条件为: 0~1 min, 5 % A; 1~5 min, 5%~20 % A; 5~20 min, 20%~45 % A; 20~30 min, 45 % A, 进样量为 5 μl, 自动进样器温度保持在 25 °C。电喷雾离子源(ESI)采用正、负离子模型。Q-TOF/MS 质谱参数如下: 毛细管电压, 正离子模式下 4 kV, 负离子模式下 3.5 kV; 干燥器流速 11 L/min; 气体温度 350 °C; 雾化器压力 45 psig; 碎片电压 120 eV; Skimmer 电压 60 eV。质谱的采集范围 m/z 50~1 100, 分析碰撞能量 10~40 eV。

2.1.2 Nr-CWS 提取物样品溶液的制备

取 Nr-CWS 提取物溶于 1 ml 纯水中, 充分涡旋溶解后制成 Nr-CWS 提取物母液, 取 100 μl 于 1.5 ml EP 管中, 加入 3 倍量的乙醇进行蛋白沉淀。然后 4 °C 下 13 000 r/min 离心 15 min, 吸取 200 μl 上清液, 于进样瓶中用于 UHPLC-Q-TOF/MS 分析。

2.1.3 Nr-CWS 提取物中化学成分的分析与鉴别

采用 UHPLC-Q-TOF/MS 分析方法对 Nr-CWS 提取物样品溶液进行快速地分离与分析, 获得正、负离子模式下的总离子流图, 通过与 Metlin 数据库中代谢物信息比对分析, 可对 Nr-CWS 提取物中化学成分进行快速分析与鉴别, 结果如图 1 和表 1 所示。

2.2 Nr-CWS 提取物中单糖成分的含量测定

2.2.1 单糖标准溶液的制备

准确称取 D-甘露糖、D-核糖、L-鼠李糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖各 10 mg, 分别置 10 ml 容量瓶, 各加水定容, 即得 1 mg/ml 浓度的各单糖标准品溶液。分别精密取上述单糖标准品溶液, 混合后加重蒸水稀释, 制成 100 μg/ml 的单糖混合标准溶液。

2.2.2 衍生化试剂的制备^[9-12]

精密称取 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP) 1.0 g, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 制得 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液。

2.2.3 单糖衍生化前处理方法^[13-14]

精密吸取单糖及混合标准品溶液 100 μl 置 2 ml EP 管中, 添加 100 μl 氨水, 再加入 100 μl 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液, 涡旋 30~45 s, 于 70 °C 烘箱中加热 30 min, 取出放冷至室温。加入 100 μl 乙酸, 涡旋 30 s 中和, 加重蒸水至 1 ml, 再加 500 μl 氯仿, 涡旋 30 s, 混匀, 弃去下层溶液, 重复 3 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 水层经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取次滤液用于 UHPLC-MS/MS 分析, 见表 2。

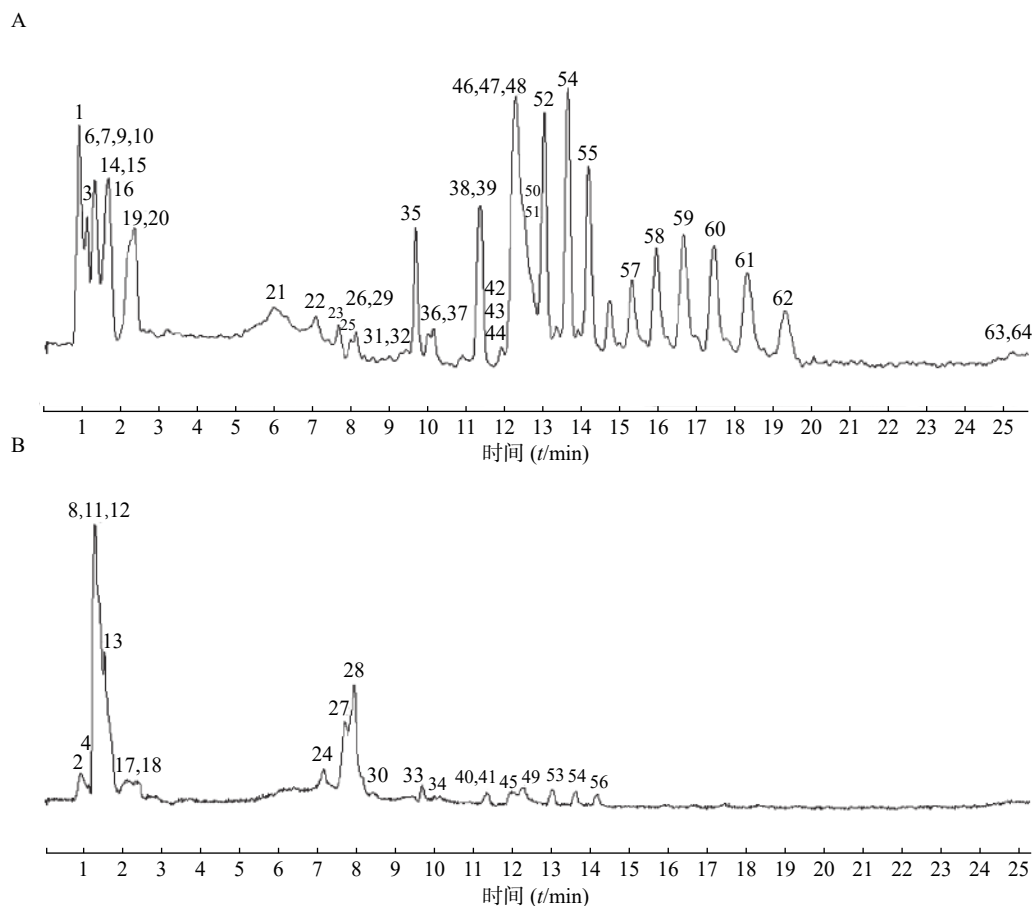


图1 Nr-CWS全成分分析UHPLC-Q-TOF/MS图谱

A.负离子模式; B. 正离子模式

表1 Nr-CWS中化学分析的UHPLC-Q-TOF/MS数据信息

序号	化合物名称	[M+X]	分子式	m/z	保留时间(t/min)
1	2-(S-glutathionyl)acetyl glutathione	M-H	C ₂₂ H ₃₄ N ₆ O ₁₃ S ₂	654.162 5	0.91
2	2-(S-glutathionyl)acetyl glutathione	M+H	C ₂₂ H ₃₄ N ₆ O ₁₃ S ₂	654.668 0	0.91
3	estradiol-17alpha 3-D-glucuronoside	M-H	C ₂₄ H ₃₂ O ₈	448.209 7	1.12
4	tyrosine	M+H	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.190 0	1.13
5	cer(d18 : 0/23 : 0)	M+H	C ₄₁ H ₈₃ NO ₃	637.637 3	1.30
6	palmitic acid	M-H	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.424 1	1.31
7	stearic acid	M-H	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271 5	1.31
8	L-threonine	M+H	C ₄ H ₉ NO ₃	119.120 0	1.33
9	D-xylose	M-H	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.130 0	1.34
10	N-acetyl-D-glucosamine	M-H	C ₈ H ₁₅ NO ₆	221.210 0	1.39
11	meso-2,6-diaminopimelic acid	M+H	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄	190.197 1	1.39
12	linoleic acid	M+H	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.445 5	1.41
13	choline	M+H	C ₅ H ₁₅ NO	104.170 8	1.56
14	L-rhamnose monohydrate	M-H	C ₆ H ₁₂ O ₅	164.160 0	1.64
15	docosapentaenoic acid	M-H	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	330.255 9	1.67
16	proline	M-H	C ₅ H ₉ NO ₂	115.130 0	1.93
17	fructose 1,6-bisphosphate	M+H	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	339.996 0	2.22
18	glucose 6-phosphate	M+H	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	260.135 8	2.28

(续表 1)

序号	化合物名称	[M+X]	分子式	<i>m/z</i>	保留时间(<i>t</i> /min)
19	fucose	M-H	C ₆ H ₁₂ O ₅	164.150 0	2.34
20	<i>L</i> -proline	M-H	C ₅ H ₉ NO ₂	115.063 3	2.34
21	PG(18 : 0/20 : 3(8Z,11Z,14Z))	M-H	C ₄₄ H ₈₁ O ₁₀ P	800.556 7	5.96
22	tetracosanoic acid	M-H	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.636 7	7.07
23	orotidylic acid	M-H	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₁₁ P	368.190 8	7.65
24	sphinganine	M+H	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	301.507 8	7.72
25	valine	M-H	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.150 0	7.74
26	cervonoyl ethanolamide	M-H	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	372.540 8	7.94
27	phytosphingosine	M+H	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	317.507 2	7.94
28	tryptophan	M+H	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.230 0	7.97
29	trihexosylceramide (d18 : 1/12 : 0)	M-H	C ₄₈ H ₈₉ NO ₁₈	967.608 0	8.10
30	histidine	M+H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.160 0	8.45
31	<i>L</i> -asparagine	M-H	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.120 0	9.65
32	galactinol dihydrate	M-H	C ₁₂ H ₂₆ O ₁₃	378.327 0	9.66
33	3-hydroxydodecanoyl carnitine	M+H	C ₁₉ H ₃₇ NO ₅	359.500 8	9.70
34	<i>L</i> -cysteine	M+H	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.120 0	9.84
35	cysteinyl-threonine	M-H	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	222.067 4	9.98
36	<i>D</i> -mannose	M-H	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.160 0	10.10
37	MG (0 : 0/24 : 1(15Z)/0 : 0)	M-H	C ₂₇ H ₅₂ O ₄	440.386 6	10.11
38	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronide	M-H	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₈	385.369 1	11.32
39	<i>D</i> -glucose	M-H	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.160 0	11.34
40	desmosine	M+H	C ₂₄ H ₄₀ N ₅ O ₈	526.603 1	11.38
41	<i>L</i> -methionine	M+H	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	149.210 0	11.59
42	glycogen	M-H	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666.577 7	11.90
43	levan	M-H	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.437 1	11.90
44	<i>D</i> -galactose	M-H	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.160 0	11.92
45	<i>L</i> -beta-aspartyl- <i>L</i> -aspartic acid	M+H	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₇	248.190 1	12.00
46	muramic acid	M-H	C ₉ H ₁₇ NO ₇	251.233 8	12.16
47	1-pyrroline-2-carboxylic acid	M-H	C ₅ H ₇ NO ₂	113.114 6	12.25
48	ADP-glucose	M-H	C ₁₆ H ₂₅ N ₅ O ₁₅ P ₂	589.341 7	12.25
49	DG(42 : 10)	M+H	C ₄₅ H ₆₈ O ₅	688.506 7	12.27
50	isoleucine	M-H	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.170 0	12.55
51	leucine	M-H	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.170 0	12.79
52	PGP(16 : 1(9Z)/18 : 0)	M-H	C ₄₀ H ₇₈ O ₁₃ P ₂	828.491 8	12.99
53	PGP(16 : 0/20 : 4)	M+H	C ₄₂ H ₇₆ O ₁₃ P ₂	850.992 6	13.01
54	TG(62 : 6)	M-H	C ₆₅ H ₁₁₄ O ₆	990.861 5	13.60
55	ganglioside GM3 (d18 : 1/16 : 0)	M-H	C ₅₇ H ₁₀₄ N ₂ O ₂₁	1 152.713 2	14.15
56	valyl-methionine	M+H	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	248.342 0	14.18
57	DG(18 : 2n6/0 : 0/22 : 6n3)	M-H	C ₄₄ H ₇₀ O ₅	678.522 3	15.27
58	PS(16 : 0/18 : 2)	M-H	C ₄₀ H ₇₄ NO ₁₀ P	759.990 0	15.90
59	PGP(18 : 1/22 : 6)	M-H	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₃ P ₂	900.491 8	16.62
60	CDP-DG(16 : 0/18 : 0)	M-H	C ₄₆ H ₈₅ N ₃ O ₁₅ P ₂	981.545 6	17.41

(续表 1)

序号	化合物名称	[M+X]	分子式	m/z	保留时间(t/min)
61	TG(22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/24 : 0/22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	M-H	C ₇₁ H ₁₁₄ O ₆	1 062.861 5	18.28
62	TG(24 : 0/24 : 0/24 : 0)	M-H	C ₇₅ H ₁₄₆ O ₆	1 143.111 9	19.25
63	serine	M-H	C ₃ H ₇ NO ₃	105.090 0	27.23
64	alanine	M-H	C ₃ H ₇ NO ₂	89.090 0	27.28

表 2 UHPLC-MS/MS 分析测定的质谱条件

序号	化合物名称	保留时间(t/min)	分子式	单糖分子量	衍生物分子量	母离子	子离子	碰撞电压(eV)
1	D-甘露糖	2.012	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.1	512.1	511.1	175.0, 217.1	34
2	D-核糖	2.216	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.1	482.1	481.1	175.0, 217.1	31
3	L-鼠李糖	2.423	C ₆ H ₁₄ O ₆	164.1	496.1	495.1	175.0, 217.1	31
4	D-果糖	2.504	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.1	512.1	511.1	175.0, 217.1	34
5	D-葡萄糖	3.725	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.1	512.1	511.1	175.0, 217.1	34
6	D-木糖	3.917	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.1	482.1	481.1	175.0, 217.1	31
7	D-半乳糖	3.918	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.1	512.1	511.1	175.0, 217.1	34
8	D-阿拉伯糖	4.086	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.1	482.1	481.1	175.0, 217.1	31

2.2.4 单糖衍生物的UHPLC-MS/MS分析条件

UHPLC-MS/MS分析采用安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统和安捷伦 6460 三重四极杆串联质谱仪 (Agilent, USA)。色谱分离在 Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温 40 °C, 流动相 A 为 20 mmol/L 的乙酸铵水溶液 (氨水调 pH 8.0), 流动相 B 为乙腈溶液, 流速 0.4 ml/min, 流动相采用梯度洗脱, 洗脱条件为: 0~2 min, 15%~20% B; 2~4 min, 20%~25% B; 4~5 min, 25%~95% B, 5~6 min, 15% B, 样品分析时间 5 min, 柱后平衡时间 1 min。进样量为 2 μl, 自动进样器温度保持 25 °C。三重四级杆质谱条件为: 电喷雾离子源 (ESI) 采用负离子, 多级反应选择离子监测模式; 毛细管电压 3.5 kV; 干燥器流速 11 L/min; 气体温度 350 °C; 雾化器压力 40 psig; 碎片电压 80 eV; Skimmer 电压 60 eV。

2.2.5 Nr-CWS 提取物中多糖的水解

精密吸取 Nr-CWS 提取物溶液 1 ml, 加入 2 mol/L 的 TFA 2.0 ml, 放入 110 °C 的真空干燥箱中, 酸性条件下水解 6 h, 冷却至室温, 4 °C 条件下离心干燥, 挥发三氟乙酸, 加重蒸水 1 ml 复溶, 用于衍生化处理。

2.2.6 Nr-CWS 提取物中单糖成分衍生化样品的制备和UHPLC-MS/MS的含量测定

精密吸取 Nr-CWS 提取物的水解液 100 μl, 按照前述单糖衍生化方法进行前处理后, 精密吸取前处理后的样品溶液 2 μl 进 UHPLC-MS/MS 分析, 混合标准品和 Nr-CWS 样品衍生化后的 UHPLC-

MS/MS 色谱图见图 2。

2.2.7 单糖分析的标准曲线和定量限、检测限

精密吸取单糖混合标准品溶液, 按前述单糖衍生化方法进行前处理后, 精密吸取前处理后的样品溶液 2 μl 用 UHPLC-MS/MS 法分析, 以各单糖峰面积与相应浓度进行线性回归分析, 计算回归方程和相关系数, 逐步稀释后, 按照信噪比 S/N=10 和 3, 分别计算其定量限和检测限, 结果见表 3。

2.2.8 精密度试验

取经水解和衍生化反应后的单糖混合标准溶液, 按照前述 UHPLC-MS/MS 分析测定条件, 连续进样 6 次, 计算其测定结果的 RSD 为 3.13%, 结果表明该方法的精密度良好, 符合分析测定的要求。

2.2.9 单糖衍生化样品的稳定性试验

Nr-CWS 提取物溶液经水解和衍生化反应后, 室温下放置, 分别于 0、5、15、30、60、120 min 进样, 进行 UHPLC-MS/MS 分析, 测定其浓度, 对样品的稳定性进行评价, 结果 6 次测定结果的 RSD 为 7.63%, 表明样品在 2 h 内稳定性良好, 符合分析测定的要求。

2.2.10 重复性试验

取同一批样品, 重复测定 6 次, 计算其测定结果 RSD 为 4.67%, 表明该方法的重复性良好, 符合分析测定的要求。

2.2.11 回收率试验

精密吸取已知含量的 Nr-CWS 提取物加入接近等量的单糖混合标准品溶液, 经水解和衍生化反应后, 进行 UHPLC-MS/MS 分析, 计算其平均回收

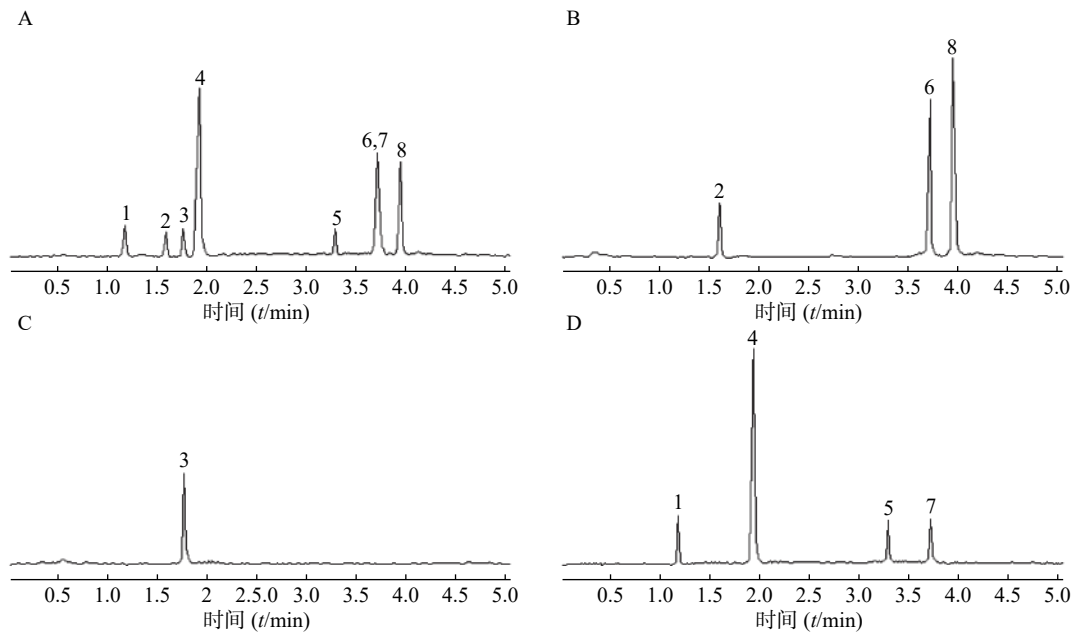


图2 单糖衍生化物的UHPLC-MS/MS色谱图

A. 8个单糖衍生化物的UHPLC-MS/MS一级质谱图; B. UHPLC-MS/MS二级质谱图(m/z 481.1 \rightarrow 175.0, 217.1);
C. UHPLC-MS/MS二级质谱图(m/z 495.1 \rightarrow 175.0, 217.1); D. UHPLC-MS/MS二级质谱图(m/z 511.1 \rightarrow 175.0, 217.1)
1. *D*-甘露糖; 2. *D*-核糖; 3. *L*-鼠李糖; 4. *D*-果糖; 5. *D*-葡萄糖; 6. *D*-木糖; 7. *D*-半乳糖; 8. *D*-阿拉伯糖

表3 单糖衍生物的标准曲线及定量限和检测限

序号	化合物	回归方程	r	浓度范围($\mu\text{g/ml}$)	定量限(ng/ml)	检测限(ng/ml)
1	<i>D</i> -甘露糖	$Y = 383.2X - 92.4$	0.996	0.05~10	20	5
2	<i>D</i> -核糖	$Y = 656.8X - 109.5$	0.994	0.10~20	50	20
3	<i>L</i> -鼠李糖	$Y = 1025.3X - 386.4$	0.992	0.50~100	20	5
4	<i>D</i> -果糖	$Y = 902.3X - 133.1$	0.994	0.10~20	100	50
5	<i>D</i> -葡萄糖	$Y = 2875.3X - 342.9$	0.993	0.50~100	100	50
6	<i>D</i> -木糖	$Y = 2391.1X - 1004.6$	0.995	0.05~10	50	20
7	<i>D</i> -半乳糖	$Y = 3482.4X - 1093.5$	0.998	1.00~200	100	50
8	<i>D</i> -阿拉伯糖	$Y = 5436.8X - 2102.3$	0.992	5.00~1000	50	20

率为86.93%, RSD为9.15%,符合分析测定的要求。

2.2.12 单糖含量测定

精密吸取Nr-CWS提取物样品溶液6份,经水

解衍生化后,按照前述UHPLC-MS/MS分析条件对衍生化后的样品进行分离分析,测定其中单糖的含量,结果见表4,可以看出8种单糖成分都能被

表4 Nr-CWS提取物(1~6)中8种单糖成分的含量测定结果

提取物编号	单糖成分($\mu\text{g/ml}$)							
	<i>D</i> -甘露糖	<i>D</i> -核糖	<i>D</i> -鼠李糖	<i>D</i> -果糖	<i>D</i> -葡萄糖	<i>D</i> -木糖	<i>D</i> -半乳糖	<i>D</i> -阿拉伯糖
1	0.9	5.3	12.2	18.9	55.1	20.9	320.8	456.1
2	2.1	4.6	21.4	12.4	48.3	19.2	205.6	504.8
3	3.2	3.5	30.5	9.8	61.9	23.1	223.0	327.3
4	5.5	6.6	19.8	15.4	45.8	27.8	305.4	462.8
5	1.5	4.9	23.4	14.7	39.1	12.1	311.7	489.1
6	4.7	7.6	25.1	22.5	52.7	27.2	289.2	510.8
平均值	3.0	5.4	22.1	15.6	50.5	21.7	276.0	458.5

检出,其中阿拉伯糖和半乳糖的含量最高。

3 讨论

Nr-CWS 提取物中化学成分的分析鉴别,采用UHPLC-Q-TOF/MS分析方法对Nr-CWS提取物样品溶液进行快速地分离分析^[15-16],获得正、负离子模式下的总离子流图,通过与Metlin数据库中代谢物信息快速地比对分析,共鉴别出Nr-CWS提取物中64个化学成分,其中包含氨基酸、脂肪酸、单糖、胞壁酸、粘肽等成分,说明Nr-CWS提取物中含有很多的细胞代谢产物,且以氨基酸、脂肪酸和糖类成分为主,这些成分就是Nr-CWS提取物发挥作用的主要成分。

由于Nr-CWS提取物中成分复杂,采用UHPLC-Q-TOF/MS方法直接对提取物进行分析,仅能检测到个别单糖成分,如木糖、半乳糖、葡萄糖等,说明Nr-CWS提取物中主要含有多糖成分,经水解衍生化后^[17-20],采用UHPLC-MS/MS方法进行检测,8个单糖都能被检测到,且阿拉伯糖和半乳糖的含量最高,说明Nr-CWS中的多糖主要由阿拉伯糖和半乳糖组成,这将为进一步的多糖成分分析鉴别奠定基础。

对单糖进行分析测定的方法有很多,我们通过比较衍生化和不衍生化方法的检测限和定量限,发现单糖衍生化后,其定量限和检测限更低,测定干扰更少,分析方法学验证结果表明,其精密度、重现性、稳定性和回收率均符合分析测定的要求。

4 结论

本研究采用UHPLC-Q-TOF/MS方法对Nr-CWS提取物中化学成分进行了快速地分离与分析,通过与Metlin代谢物成分数据库比对,共鉴别出Nr-CWS提取物中64个化学成分,主要包括氨基酸、糖类、脂肪酸等成分;对Nr-CWS提取物中糖类成分衍生化后,采用UHPLC-MS/MS分析方法对Nr-CWS提取物中8种单糖成分进行含量测定。结果表明,Nr-CWS中阿拉伯糖的含量最高,其次为半乳糖,说明Nr-CWS中发挥作用的主要多糖成分可能主要由这几种单糖组成。通过本研究为后期开展Nr-CWS活性成分筛选及药理作用机制的研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] 林清强,石颖岚,李琼,等.红色诺卡氏菌细胞壁骨架多糖成分的分离纯化[J].赤峰学院学报(自然科学版),2015,

31(16):17-19.
[2] 黄文伟,谢必峰.基于响应面法对红色诺卡氏菌发酵条件的优化及其发酵动力学研究[J].药物生物技术,2015,22(1):49-52.
[3] 张祝兰,林善,唐文力,等.红色诺卡氏菌细胞壁骨架的理化性质、化学成分及含量测定的研究[J].中国抗生素杂志,2002,27(9):532-534.
[4] AZUMA I, TANIYAMA T, YAMAWAKI M, et al. Adjuvant and antitumor activities of *Nocardia* cell-wall skeletons[J]. Gan, 1976, 67(5): 733-736.
[5] 张元芬.红色诺卡氏菌细胞壁骨架(N-cws)通过产生LAK细胞辅助因子对人LAK细胞的增强作用[J].福建医药杂志,1991,13(5):10.
[6] 梁宇庭,周骏辉,南铁贵,等.柱前衍生化UPLC-MS/MS测定12种单糖含量的方法学研究及其在应用[J].中国中药杂志,2018,43(22):4469-4473.
[7] 胡蓉蓉,姚鑫.UPLC-MS/MS测定银杏叶提取物中10个黄酮类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):90-95.
[8] 王笑笑,周勇,徐国群,等.黄酮类成分在蜂蜜抗菌性中的效能研究[J].中国现代应用药学,2017,34(3):363-369.
[9] 周彦强,吴光斌,陈发河.PMP柱前衍生化HPLC法测定黄秋葵多糖的单糖组成[J].食品科学,2019,40(4):266-271.
[10] XUE S J, WANG L L, CHEN S Q, et al. Simultaneous analysis of saccharides between fresh and processed *Radix rehmanniae* by HPLC and UHPLC-LTQ-orbitrap-MS with multivariate statistical analysis[J]. Molecules, 2018, 23(3): E541.
[11] JIANG W X, DI S X, HUA H M, et al. Structural characterization of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves and its α -glucosidase inhibitory effect[J]. Chin Tradition Herb Drugs, 2017, 48(8): 1524-1528.
[12] 张璐瑶,赵峡,陈欢欢.糖类化合物PMP衍生分析进展[J].分析测试学报,2016,35(3):367-372.
[13] LI H L, LONG C N, ZHOU J, et al. Rapid analysis of monosaccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(9): 1405-1409.
[14] GAO Y Y, JIANG Y, CHEN G C, et al. A sensitive and rapid UPLC-MS/MS method for determination of monosaccharides and anti-allergic effect of the polysaccharides extracted from *Saposhnikovia radix*[J]. Molecules, 2018, 23(8): E1924.
[15] 赵丹,冯峰,粟有志,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定螺旋藻多糖的单糖组成[J].色谱,2017,35(4):413-420.
[16] FAN B L, LI T T, SONG X F, et al. A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 125: 221-231.
[17] 王媛媛,张晖,杨俊松,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析9种多糖中的单糖组成[J].济宁医学院学报,2016,39(4):241-244.
[18] WU X D, JIANG W, LU J J, et al. Analysis of the monosac-

charide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2014, 145: 976-983.

[19] 李婷婷, 王雪吟, 胡丹荔, 等. 柱前衍生法测定桂花多糖中的

6种单糖的含量[J]. *食品工业*, 2019, 40(4): 323-327.

[20] 符梦凡, 赵一帆, 阎卫东. 柱前衍生化HPLC法分析枸杞多糖中单糖组成[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 186-191.

[收稿日期] 2020-03-11 [修回日期] 2020-05-25

[本文编辑] 李春德

(上接第 417 页)

已有研究表明, *ALS* 家族基因在促进白假丝酵母黏附及生物被膜的形成中发挥重要作用^[20]。本实验中, 该家族中的 *ALS1* 和 *ALS3* 基因在山奈酚处理组中表达下降。文献报道转录因子 *BCR1* 位于 *ALS1* 和 *ALS3* 基因上游, 参与调控白假丝酵母的黏附及生物被膜形成。与 *ALS1* 和 *ALS3* 基因下调相反, 本实验中经山奈酚处理的白假丝酵母中 *BCR1* 基因表达升高, 提示山奈酚可能通过不依赖于 *BCR1* 的其他信号通路来调控 *ALS1* 和 *ALS3* 基因的表达^[21]。综上所述, 山奈酚可能通过抑制白假丝酵母的黏附和菌丝形成从而发挥抗生物被膜作用。

综上所述, 本研究首次揭示了山奈酚的体外抗白假丝酵母生物被膜活性, 其作用机制可能与抑制白假丝酵母菌丝形成和降低其细胞表面疏水性相关, 这为治疗临床真菌生物被膜相关感染提供了新思路。

【参考文献】

[1] ACHKAR J M, FRIES B C. *Candida* infections of the genitourinary tract[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2): 253-273.

[2] ANDERSON J B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(7): 547-556.

[3] GULATI M, NOBILE C J. *Candidaalbicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms[J]. *Microbes Infect*, 2016, 18(5): 310-321.

[4] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展[J]. *广东医学*, 2010, 31(8): 1064-1066.

[5] KIM B W, LEE E R, MIN H M, et al. Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(7): 1080-1089.

[6] RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, NANDAKUMAR N, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 86: 103-112.

[7] CAO Y Y, CAO Y B, XU Z, et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candidaalbicans* biofilm exposed to farnesol[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 584-589.

[8] NOBILE C J, ANDES D R, NETT J E, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in*

vitro and *in vivo*[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(7): e63.

[9] YAN Y, TA NF, MIAO H, et al. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1085.

[10] SHAO J, ZHANG M X, WANG T M, et al. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candidaalbicans*[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(6): 984-992.

[11] SUN F J, QU F, LING Y, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(7): 877-886.

[12] AL-FATTANI M A, DOUGLAS L J. Biofilm matrix of *Candidaalbicans* and *Candidatropicalis*: chemical composition and role in drug resistance[J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 8): 999-1008.

[13] NETT J, LINCOLN L, MARCHILLO K, et al. Putative role of beta-1, 3 glucans in *Candidaalbicans* biofilm resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 510-520.

[14] CHAFFIN W L. *Candidaalbicans* cell wall proteins[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(3): 495-544.

[15] BRAUN B R, JOHNSON A D. Control of filament formation in *Candidaalbicans* by the transcriptional repressor TUP1[J]. *Science*, 1997, 277(5322): 105-109.

[16] BRAUN B R, KADOSH D, JOHNSON A D. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction[J]. *EMBO J*, 2001, 20(17): 4753-4761.

[17] CLEARY I A, MULABAGAL P, REINHARD S M, et al. Pseudohyphal regulation by the transcription factor Rfg1p in *Candidaalbicans*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(9): 1363-1373.

[18] LU Y, SU C, WANG A, et al. Hyphal development in *Candidaalbicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance[J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(7): e1001105.

[19] SENEVIRATNE C J, JIN L, SAMARANAYAKE L P. Biofilm lifestyle of *C.andida*: a mini review[J]. *Oral Dis*, 2008, 14(7): 582-590.

[20] TRONCHIN G, PIHET M, LOPES-BEZERRAL M, et al. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi[J]. *Med Mycol*, 2008, 46(8): 749-772.

[21] NOBILE C J, FOX E P, NETT J E, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candidaalbicans*[J]. *Cell*, 2012, 148(1-2): 126-138.

[收稿日期] 2020-04-09 [修回日期] 2020-06-08

[本文编辑] 李睿旻