

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220678

· 论 著 ·

超高效液相色谱-串联质谱法测定白念珠菌群体感应分子的含量

李玲¹, 吕磊^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)药学系分析测试中心, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)第三附属医院药剂科, 上海 200438

[摘要] **目的** 建立一种简便、可靠和灵敏的超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)方法,用于检测白念珠菌分泌的3种群体感应分子(法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇)的含量。**方法** 样品经乙酸乙酯萃取后,采用Agilent 6470型三重四极杆串联质谱仪,通过正离子监测模式,以卡马西平为内标,在Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm)上进行色谱分离。采用梯度洗脱,流动相为0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B),洗脱梯度为0~3 min 20%~40% B、3~4 min 40%~80% B、4~8 min 80% B,流速为0.5 mL/min,进样量为5 μL,柱温为25 °C,分析时间为8 min,平衡时间为2 min。采用电喷雾离子源、正离子多反应监测模式进行质谱分析。**结果** 法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇的专属性和线性关系良好(r 均>0.999),精密度和准确度均良好(日内、日间精密度均<5%,准确度的绝对值均<10%),平均回收率为90%~115%;3种条件(室温放置4 h、4 °C自动进样器放置24 h及冻融3次)下的稳定性均符合方法学要求。在浮游型样品中,3种群体感应分子的含量均随培养时间的延长而增加;而在被膜型样品中,法尼醇和酪醇在被膜成熟阶段含量降低。**结论** 该UHPLC-MS/MS方法可用于测定白念珠菌分泌的法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇的含量,为真菌群体感应分子的快速、准确检测提供参考。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱法;白念珠菌;群体感应分子;法尼醇;酪醇;3-吡啶乙醇

[中图分类号] R 917; R 378.993

[文献标志码] A

[文章编号] 2097-1338(2023)06-0712-06

Determination of quorum sensing molecules in *Candida albicans* by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Ling¹, LÜ Lei^{2*}

1. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To establish a convenient, reliable and sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for detecting the content of 3 kinds of quorum sensing molecules (farnesol, tyrosol, and 3-indoleethanol) secreted by *Candida albicans*. **Methods** With carbamazepine as the internal standard, the samples were extracted with ethyl acetate and separated by gradient elution on Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) using Agilent 6470 triple quadrupole tandem mass spectrometry in positive ion monitoring mode. The mobile phase A was 0.1% formic acid in water, and the mobile phase B was acetonitrile. The elution gradient was 0-3 min 20%-40% B, 3-4 min 40%-80% B, and 4-8 min 80% B; flow rate was 0.5 mL/min; injection volume was 5 μL; column temperature was 25 °C; the analysis period of each sample was 8 min; and the equilibrium time was 2 min. The mass spectrometry was performed using electrospray ionization source and positive ion multiple reaction monitoring mode. **Results** Farnesol, tyrosol and 3-indoleethanol had good specificity and linear relationship (all r >0.999), and had good precisions and accuracy (intra- and inter-day precisions were <5% and absolute values of accuracy were <10%). The average recovery rate was 90%-115%. The stability under 3 conditions (4 h at room temperature, 24 h at 4 °C with autosampler, and 3 freeze-thaw cycles) met the requirements of the methodology. In the planktonic samples, the contents of the 3 kinds of quorum sensing molecules were increased with the growth of the strains. However, in the biofilm samples, the contents of farnesol and tyrosol were decreased at the mature stage of the biofilm. **Conclusion** This UHPLC-MS/MS method can be used to determine the contents of farnesol, tyrosol and 3-indoleethanol secreted by *Candida albicans*, and it provides a reference for

[收稿日期] 2022-08-19 **[接受日期]** 2022-12-22

[基金项目] 国家自然科学基金(82104127). Supported by National Natural Science Foundation of China (82104127).

[作者简介] 李玲,高级实验师. E-mail: 316262150@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875578, E-mail: k_owen2002@126.com

rapid and accurate detection of quorum sensing molecules in fungi.

[Key words] ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Candida albicans*; quorum sensing molecules; farnesol; tyrosol; 3-indoleethanol

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(6): 712-717]

白念珠菌 (*Candida albicans*) 是一种常见的条件致病菌, 近年来被用作研究真菌基础生物学的模型。研究表明白念珠菌在一定条件下可形成生物被膜, 使其耐药性和致病性增强, 导致感染持续难愈和死亡率增加^[1-2]。白念珠菌生物被膜形成主要包括3个关键步骤: 黏附(0~3 h)、微克隆和菌丝形成(3~6 h)及生物被膜成熟(24~48 h), 这3个步骤连续发生且存在重叠现象^[3-4]。群体感应是微生物间通过释放一些特定的化学信号, 即群体感应分子 (quorum sensing molecule, QSM), 并感知其浓度变化, 来监测菌群密度和调控自身的某些生理行为, 从而适应周围环境的一种信号交流机制。QSM是影响生物被膜形成的重要因素之一。在白念珠菌中发现QSM法尼醇是真核生物群体感应研究的一个重大突破。法尼醇是白念珠菌生物合成麦角固醇的中间产物, 其通过多种信号通路影响形态相关基因的表达, 最终抑制白念珠菌酵母相向菌丝相的转变^[5]。法尼醇是一种具有萜类结构的挥发性成分, 气相色谱或气相色谱-质谱联用是测定其含量的常用方法^[6]。酪醇和3-吲哚乙醇的检测通常用液相色谱或液相色谱-质谱联用方法, 对于常规生物分析来说这些方法操作烦琐或耗时较长^[7]。本研究建立了同时测定法尼醇、酪醇、3-吲哚乙醇的超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 方法, 可用于测定白念珠菌生长各阶段QSM的含量及评价QSM浓度与白念珠菌不同阶段生长形态的相关性。采用UHPLC-MS/MS检测QSM提高了方法的速度和效率, 保证了方法的高选择性和高灵敏度。

1 材料和方法

1.1 仪器 Agilent 1290 Infinity 型超高效液相色谱系统, Agilent 6470 型三重四极杆串联质谱仪, 配有 Agilent 喷射流电喷雾离子源, 使用 MassHunter 软件进行系统控制及数据处理 (美国 Agilent 公司); FRESCO 冷冻型台式离心机 (美国 ThermoFisher

公司); METTLER AE 240 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); 微型涡旋混合仪 (美国 ThermoFisher 公司); HZQ-F160 恒温振荡培养箱 (江苏太仓市实验设备厂); SW-CT-IF 型超净化工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 药品与试剂 法尼醇、酪醇、3-吲哚乙醇标准品 (美国 Sigma 公司), 卡马西平 (内标, 大连美仑生物技术有限公司), 乙腈、甲醇和甲酸均为色谱纯 (德国 Merck 公司)。

1.3 菌株与培养基 白念珠菌标准株 SC5314 (由瑞士洛桑大学附属医院 Dominique Sanglard 教授惠赠)。沙氏葡萄糖琼脂 (Sabouraud's dextrose agar, SDA) 培养基: 大豆蛋白胨 10 g, 加入三蒸水 900 mL 搅拌混匀, 然后加入 D-葡萄糖 40 g 搅拌溶解, 再用三蒸水定容至 1 000 mL, 搅拌均匀后加入琼脂 18 g, 高压灭菌, 4 °C 保存。酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 琼脂培养基: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 溶解于 1 000 mL 三蒸水, 高压灭菌, 4 °C 保存。RPMI 1640 培养基: RPMI 1640 培养基粉末 10 g, 吗啡啉丙磺酸 34.5 g, 碳酸氢钠 2.0 g, 加入三蒸水 900 mL 溶解, 然后用氢氧化钠室温下调节 pH 值至 7.0, 最后用三蒸水定容至 1 000 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后于 4 °C 保存。

1.4 分析条件

1.4.1 液相色谱 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm)。采用梯度洗脱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B); 洗脱梯度为 0~3 min 20%~40% B、3~4 min 40%~80% B、4~8 min 80% B, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 5 μL, 柱温为 25 °C。

1.4.2 质谱 采用电喷雾离子源, 正离子多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式。氮气作为雾化气和干燥气; 高纯氮气为碰撞气, 压力为 0.1 MPa; 雾化器压力为 40 psi (1 psi=6 894.8 Pa), 干燥气温度为 350 °C, 干燥气流速为 11 L/min; 毛细管电压为 4 kV, 各成分检测参数见表 1。

表1 法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇及内标的质谱检测参数

Tab 1 Mass spectrum parameters of farnesol, tyrosol, 3-indoleethanol and internal standard

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor/V	Collision energy/eV
Internal standard (carbamazepine)	237.0	194.0	100	20
Farnesol	205.2	121.1	100	13
3-indoleethanol	144.1	117.0	140	21
Tyrosol	121.1	77.0	120	25

m/z: Mass-to-charge ratio.

1.5 溶液配制

1.5.1 对照品溶液 精密称取法尼醇、3-吡啶乙醇、酪醇适量(约10.0 mg),分别置于10 mL容量瓶中,用80%甲醇溶解,制得质量浓度约为1.0 mg/mL的对照品储备液。取对照品储备液适量,用80%甲醇逐级稀释,配成3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为0.5、1、2、5、10、20、50、100 μg/mL及法尼醇质量浓度为0.2、0.4、1、2、4、10、20、40 μg/mL的系列混合对照品溶液,置于4℃冰箱保存、备用。

1.5.2 内标储备液 精密称取卡马西平标准品约10.0 mg,置于10 mL的容量瓶中,用甲醇溶解,制得质量浓度为1.0 mg/mL的内标储备液。

1.5.3 标准对照溶液及质控样品 取空白RPMI 1640培养基950 μL,精密加入1.5.1节制备的系列混合对照品溶液50 μL,涡旋混匀,配成3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为25、50、100、250、500、1 000、2 500、5 000 ng/mL及法尼醇质量浓度为10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 ng/mL的系列标准对照溶液,同法配制低(3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为50 ng/mL,法尼醇为20 ng/mL)、中(3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为500 ng/mL,法尼醇为200 ng/mL)、高(3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为2 500 ng/mL,法尼醇为1 000 ng/mL)3个浓度的质控样品待用。

1.6 样品制备

1.6.1 白念珠菌的培养 将-80℃保存的白念珠菌标准株SC5314复苏,接种到SDA固体培养基,37℃培养24 h。取单克隆菌株在YPD琼脂液体培养基中200 r/min 30℃培养16 h,达到对数生长期后收集液体培养基中的细菌,重悬于RPMI 1640培养基中,按照实验需要制备成密度为 1×10^5 /mL的菌悬液。被膜型样品取5 mL菌液置于25 cm²的透气贴壁培养瓶中,37℃静置培养3 h,用PBS沿培养瓶内壁轻轻冲洗2次,加入新的

RPMI 1640培养基;浮游型样品置于50 mL灭菌三角烧瓶中。2种形态的菌株都置于37℃、20 r/min培养箱中孵育,并分别于3、6、12、24、48 h取样测定,每组平行测定3份。

1.6.2 样品前处理 将上述样品转移至10 mL离心管中,2 780×g离心5 min,取上清液1 mL,加入3 mL乙酸乙酯萃取后,氮气吹干。用1 mL 80%甲醇(含20 ng/mL内标)复溶,涡旋1 min,11 000×g高速离心3 min,取上清液5 μL进行UHPLC-MS/MS分析。

2 结果

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性 分别取空白RPMI 1640培养基、质控样品(3-吡啶乙醇、酪醇质量浓度为500 ng/mL,法尼醇质量浓度为200 ng/mL)和培养12 h的浮游型样品适量,按1.6.2节样品前处理方法操作,按1.4节液相色谱和质谱条件采集数据,获得色谱图(图1)。结果显示,空白培养基中的成分不干扰待测物和内标出峰,专属性良好。

2.1.2 标准曲线与定量限 取1.5.3节制备的标准对照溶液,按1.6.2节样品前处理方法操作,进样分析并记录色谱图。以待测物浓度为横坐标(*x*)、待测物与内标峰面积比值为纵坐标(*y*)进行线性回归分析。以信噪比>10确定定量限进行分析,结果如表2所示,法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇线性关系良好。

2.1.3 精密度和准确度 按1.5.3节制备低、中、高3个浓度的质控样品,每个浓度平行操作5份,按1.6.2节样品前处理方法操作,并于每天制备3个浓度质控样品各5份,进样分析,连续3 d,计算日内精密度、日间精密度及准确度。结果见表3,法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇的日内精密度、日间精密度及准确度均良好。

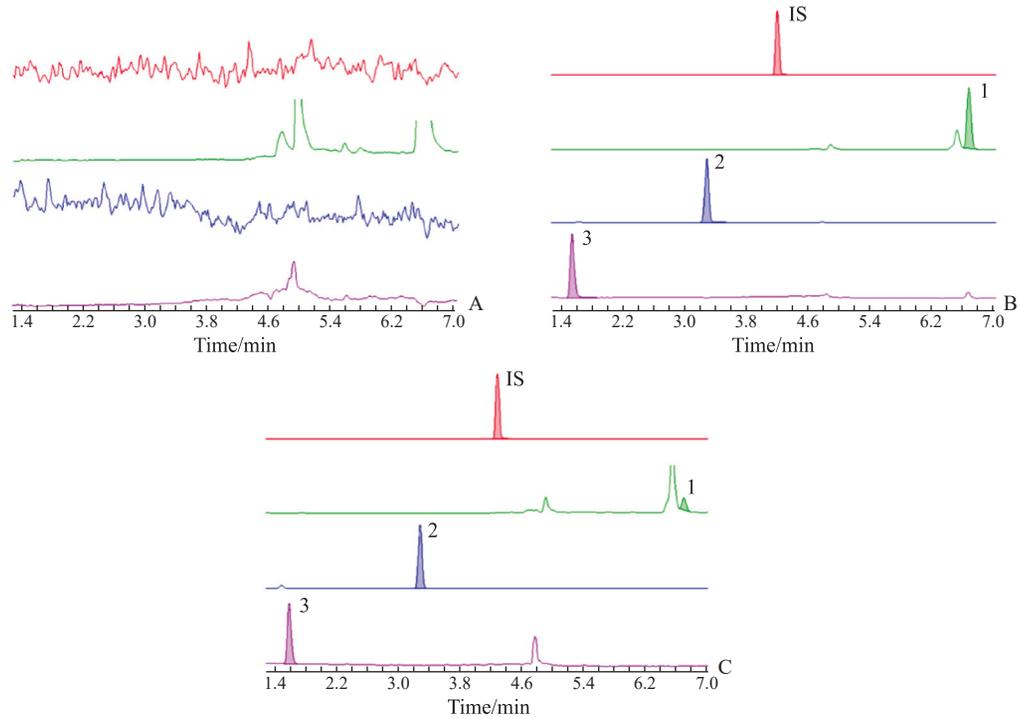


图1 典型的液相色谱-串联质谱图

Fig 1 Typical chromatograms of liquid chromatography-tandem mass spectrometry

A: Blank matrix; B: Blank matrix combined with standard samples; C: Actual samples. IS: Internal standard (carbamazepine) (237.0>>194.0); 1: Farnesol (205.2>>121.1); 2: 3-indoleethanol (144.1>>117.0); 3: Tyrosol (121.1>>77.0).

表2 酪醇、3-吲哚乙醇、法尼醇的标准曲线及定量限

Tab 2 Calibration curve and limit of quantification results of tyrosol, 3-indoleethanol and farnesol

Analyte	Regression equation	r	Linear range/(ng·mL ⁻¹)	Limit of quantification/(ng·mL ⁻¹)
Tyrosol	y=2.418 7x+0.069 2	0.999 9	25-5 000	4.0
3-indoleethanol	y=3.476 3x+0.191 7	0.999 5	25-5 000	0.5
Farnesol	y=2.080 4x+0.026 0	0.999 9	10-2 000	2.5

表3 酪醇、3-吲哚乙醇、法尼醇的精密度和准确度试验结果

Tab 3 Precision and accuracy results of tyrosol, 3-indoleethanol and farnesol

Analyte	Concentration/ (ng·mL ⁻¹)	Intra-day n=5		Inter-day n=15	
		Precision/%	Accuracy/%	Precision/%	Accuracy/%
Tyrosol	50	2.29	-2.82	3.54	-2.57
	500	2.05	2.93	3.26	2.32
	2 500	0.64	1.48	3.57	-0.02
3-indoleethanol	50	2.20	-8.34	2.22	-8.25
	500	1.87	3.41	1.15	2.51
	2 500	1.17	1.04	2.04	2.35
Farnesol	20	1.49	3.56	0.46	-3.72
	200	1.21	-0.43	3.78	-3.68
	1 000	1.01	-0.01	3.72	-0.50

2.1.4 回收率 取空白RPMI 1640培养基, 分别配制低(3-吲哚乙醇、酪醇质量浓度为50 ng/mL, 法尼醇为20 ng/mL)、中(3-吲哚乙醇、酪醇质量浓度为500 ng/mL, 法尼醇为200 ng/mL)、高(3-吲哚乙醇、酪醇质量浓度为2 500 ng/mL, 法尼醇为1 000 ng/mL)3个浓度的混合对照品溶液, 按1.6.2节方法处理, 每个浓度平行测定5份,

计算回收率和测定的RSD。结果见表4, 不同浓度法尼醇、酪醇、3-吲哚乙醇的平均回收率在90%~115%范围内。

2.1.5 稳定性 首先取新鲜配制的对照品溶液和内标储备液, 考察对照品溶液于4℃下放置30 d的稳定性, 结果显示准确度的绝对值均<10%, 说明稳定性良好。然后在质控样品的3个浓度下, 分别考

察3种条件(室温放置4h、4℃自动进样器放置24h及冻融3次)下的稳定性,每个浓度平行操作5份。按1.6.2节样品前处理方法操作,进样分析,将各目标化合物和内标峰面积的比值代入标准曲线方程求得实测浓度,计算相对误差及RSD,结果(表5)表明稳定性良好。

2.2 样品测定结果 将样品按1.6.2节样品前处理方法操作,按1.4节色谱和质谱条件进行测定,代入标准曲线方程计算各目标化合物的浓度,结果如表6所示。在浮游型样品中,3种QSM的含量随培养时间的延长而增加;而在被膜型样品中,法尼醇和酪醇在被膜成熟阶段含量降低。

表4 酪醇、3-吡啶乙醇、法尼醇的回收率试验结果

Tab 4 Recovery results of tyrosol, 3-indoleethanol and farnesol

Analyte	Concentration/ (ng·mL ⁻¹)	n=5	
		Recovery/%	RSD/%
Tyrosol	50	92.47	7.32
	500	97.17	3.34
	2 500	97.32	5.77
3-indoleethanol	50	101.11	5.99
	500	109.27	1.21
	2 500	112.59	1.63
Farnesol	20	108.70	3.64
	200	104.92	5.46
	1 000	108.57	6.85

RSD: Relative standard deviation.

表5 酪醇、3-吡啶乙醇、法尼醇的稳定性试验结果

Tab 5 Stability results of tyrosol, 3-indoleethanol and farnesol

Analyte	Concentration/ (ng·mL ⁻¹)	n=5					
		Room temperature for 4 h		4℃ autosampler for 24 h		3 freeze-thaw cycles	
		RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%
Tyrosol	50	-2.69	6.26	-3.89	8.20	-1.49	3.07
	500	-3.52	3.37	-5.31	3.79	-0.97	3.43
	2 500	-1.55	2.69	-6.49	3.08	-1.55	2.68
3-indoleethanol	50	-6.98	4.53	-6.79	8.58	-6.31	2.14
	500	1.76	3.75	2.56	3.56	0.75	3.37
	2 500	0.98	1.58	1.61	2.10	0.98	1.58
Farnesol	20	-3.34	7.51	-3.14	8.49	-2.92	2.31
	200	-2.62	2.90	-2.53	3.89	-2.31	1.55
	1 000	-2.98	1.61	-2.95	2.10	-2.97	1.61

RE: Relative error; RSD: Relative standard deviation.

表6 白念珠菌培养基中酪醇、3-吡啶乙醇和法尼醇的含量测定结果

Tab 6 Determination of tyrosol, 3-indoleethanol and farnesol in culture medium of *Candida albicans*

Time/h	(ng·mL ⁻¹), n=3, $\bar{x} \pm s$					
	Tyrosol		3-indoleethanol		Farnesol	
	Biofilm	Planktonic	Biofilm	Planktonic	Biofilm	Planktonic
3	126.5±4.0	152.0±2.1	205.8±4.0	230.2±5.6	189.0±8.2	17.2±1.2
6	910.5±40.0	192.9±4.7	1 715.6±162.3	534.1±23.4	387.1±15.8	16.7±1.3
12	1 722.1±103.8	228.5±14.8	2 287.6±69.2	665.8±25.7	184.3±5.8	16.6±0.3
24	4 567.8±396.9	300.5±7.2	3 638.5±193.0	1 136.0±93.9	1 007.2±32.5	22.6±0.7
48	3 408.8±73.3	737.3±17.4	5 169.4±158.9	2 294.1±63.4	176.6±11.6	72.6±2.6

3 讨论

本研究运用UHPLC-MS/MS方法检测白念珠菌分泌的QSM法尼醇、酪醇、3-吡啶乙醇的含量,相关文献中质谱都采用电喷雾离子源正离子模式,在全扫描模式下这3个成分的[M+H-H₂O]⁺离子峰稳定且响应较好^[8-9],因此本实验也选择[M+H-H₂O]⁺作为含量测定的前体离子。文献报道,采用液相色谱-质谱联用方法检测时,在流动相中加入不同比例的甲酸和乙酸能提高质谱的响应,0.1%的甲酸

水溶液-乙腈体系梯度洗脱满足检测灵敏度和分离度的要求^[10-11]。

本研究综合文献方法^[12-13]对提取条件进行了简化和改良,采用乙酸乙酯萃取,分别考察了样品和乙酸乙酯体积比为1:1、1:2、1:3和1:4的提取效率,发现法尼醇和酪醇的提取效率随乙酸乙酯体积的增加变化不明显,3-吡啶乙醇的提取效率随乙酸乙酯体积的增加而增加,当样品与乙酸乙酯的体积比为1:3时能够满足检测的需求,进一步提高乙酸乙酯的比例对提取效率没有显著改善。

群体感应是包括真菌在内的微生物种群内或种群间的信号传递方式,是在长期进化过程中逐步形成的。群体感应是生物膜形成的基础,它能反馈性抑制菌群的复制,使定植群落在生理上达到大小最适,从而形成成熟的生物膜。本研究测定了白念珠菌生物被膜形成阶段 QSM 的含量,同时比较了相同培养条件下浮游型样品中各成分的含量。结果显示,被膜型白念珠菌培养基中的 QSM 含量随着被膜的成熟呈升高趋势,但是法尼醇和酪醇含量在培养 24 h 后降低。浮游型样品中酪醇和 3-吡啶乙醇含量低于被膜型样品,且随着培养时间的延长含量逐渐增加;法尼醇含量在培养前 12 h 几乎没有变化,在 24~48 h 呈现迅速增加的趋势。

法尼醇是首个被发现的真核生物 QSM,它不仅可以通过多种信号通路抑制白念珠菌酵母相向菌丝相的转变,而且可以在高密度时控制细胞过量生长造成的营养竞争^[14]。酪醇衍生于酪氨酸,在细胞生长过程中被持续释放到培养基中,可以促进白念珠菌的形态转变和生长。研究表明,酪醇在白念珠菌形态调节中的作用次于法尼醇,只有当环境中法尼醇含量很低或缺乏时才能发挥其调节作用^[4]。随着生物被膜的形成及成熟,增多的法尼醇抑制生物被膜的形成,将生物被膜的形成维持在相对平衡状态。同时,环境中可利用营养成分的不断减少也能降低法尼醇浓度,减弱其对生物被膜的抑制作用。因此,生物被膜形成 24 h 后大量积累的法尼醇占据了调控主导地位,抑制细胞过度生长而导致生物被膜的形成减慢,同时也使促进生物被膜成熟的酪醇产生减少^[4,15]。

本研究建立了一种快速、灵敏、简便的 UHPLC-MS/MS 方法,用于测定白念珠菌培养基中法尼醇、酪醇和 3-吡啶乙醇含量,样品处理采用乙酸乙酯萃取,方法简单、快速且经济;3 种成分和内标通过 MRM 模式实现分离,其测定不受培养基中其他物质的干扰,专属性很好。方法学验证表明法尼醇、酪醇和 3-吡啶乙醇的线性、精密度和稳定性均符合分析的要求,适用于白念珠菌培养基中 3 种成分的测定,这为迅速、准确检测真菌 QSM 的含量提供了参考。

[参考文献]

[1] KAUR J, NOBILE C J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms[J/OL]. *Curr Opin Microbiol*, 2023,

- 71: 102237. DOI: 10.1016/j.mib.2022.102237.
- [2] ATRI WAL T, AZEEM K, HUSAIN F M, HUSSAIN A, KHAN M N, ALAJMI M F, et al. Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition[J/OL]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 638609. DOI: 10.3389/fmicb.2021.638609.
- [3] AHMAD PADDER S, PRASAD R, SHAH A H. Quorum sensing: a less known mode of communication among fungi[J]. *Microbiol Res*, 2018, 210: 51-58.
- [4] KRUPPA M. Quorum sensing and *Candida albicans*[J]. *Mycoses*, 2009, 52: 1-10.
- [5] LEE J H, KIM Y G, KHADKE S K, LEE J. Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against *Candida albicans* via mimicking of the quorum-sensing molecule farnesol[J]. *Microb Biotechnol*, 2021, 14: 1353-1366.
- [6] BOONE C H T, GUTZMANN D J, KRAMER J J, ATKIN A L, NICKERSON K W. Quantitative assay for farnesol and the aromatic fusel alcohols from the fungus *Candida albicans*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106: 6759-6773.
- [7] MATTIVI F, VRHOVSEK U, VERSINI G. Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 855: 227-235.
- [8] BORDIGA M, LORENZO C, PARDO F, SALINAS M R, TRAVAGLIA F, ARLORIO M, et al. Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration[J]. *Food Chem*, 2016, 197(Pt B): 1038-1045.
- [9] GREGUS P, VLCKOVÁ H, BUCHTA V, KESTRANEK J, KRIVČÍKOVÁ L, NOVÁKOVÁ L. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 674-681.
- [10] KOSALEC I, PUEL O, DELAFORGE M, KOPJAR N, ANTOLOVIC R, JELIC D, et al. Isolation and cytotoxicity of low-molecular-weight metabolites of *Candida albicans*[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 6893-6904.
- [11] PILAŘOVÁ V, KOČOVÁ VLČKOVÁ H, JUNG O, PROTTI M, BUCHTA V, MERCOLINI L, et al. Unambiguous determination of farnesol and tyrosol in vaginal fluid using fast and sensitive UHPLC-MS/MS method[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 6529-6541.
- [12] HORNBY J M, JENSEN E C, LISEC A D, TASTO J J, JAHNKE B, SHOEMAKER R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2982-2992.
- [13] ALEM M A S, OTEEF M D Y, FLOWERS T H, DOUGLAS L J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development[J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5: 1770-1779.
- [14] 李婷, 刘朝晖. 真菌群体感应信号分子的研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19: 207-211.
- [15] SEBAA S, BOUCHERIT-OTMANI Z, COURTOIS P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 3201-3209.

[本文编辑] 尹茶