

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0470-03

牙菌斑中有机酸的高效液相色谱分析

邹晓莉¹, 曾红燕¹, 严次玲², 朱万春³, 李继遥³

(1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验教研室, 四川 成都 610041;

2. 成都市龙泉驿区疾病预防控制中心 检验科, 四川 成都 610100;

3. 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 建立一种同时分析牙菌斑中甲酸、乙酸、琥珀酸和乳酸的高效液相色谱法。方法 选取正常儿童和唇腭裂儿童各20名, 取其全口牙菌斑, 离心, 取2 μ L上清液溶于一定体积重蒸水中, 于Phenomenex C₁₈柱上用磷酸盐缓冲液-甲醇(97:3)为流动相, 在最大吸收波长处测定4种有机酸的质量浓度。结果 甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸线性范围分别为0.110~500、0.049~500、0.047~500、0.084~500 μ g/mL; 检出限分别为0.110、0.049、0.047、0.084 μ g/mL; 相对标准偏差分别为9.5%、7.9%、4.3%、4.2%。对正常和唇腭裂儿童口腔中牙菌斑样品进行检测, 甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸样品加标回收率分别为82%~112%、82%~102.5%、90%~115%、80%~110%。结论 高效液相色谱法灵敏快速, 适合人体口腔牙菌斑中有机酸的检测。

[关键词] 高效液相色谱法; 有机酸; 牙菌斑

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A

Determination of organic acids in dental plaque with high performance liquid chromatography ZOU Xiao-li¹, ZENG Hong-yan¹, YAN Ci-ling², ZHU Wan-chun³, LI Ji-yao³. (1. Dept. of Sanitary Technology, West China College of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Laboratory, Longquanyi District Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610100, China; 3. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To establish determination method of formic acid, lactic acid, acetic acid and succinic acid in dental plaque with high performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** After the samples were centrifuged, 2 μ L supernatant was transferred to a 1 mL centrifuge tube and diluted in water, then was determined with HPLC. The mixture of phosphate buffer and methanol(97:3) as mobile phase throughout the experiment. The determination of organic acid was performed on Phenomenex C₁₈ column and at their maximum absorption wave. **Results** The linear ranges of formic acid, lactic acid, acetic acid and succinic acid were 0.110~500, 0.049~500, 0.047~500, 0.084~500 μ g/mL. The detection limits were 0.110, 0.049, 0.047, 0.084 μ g/mL. The relative standard derivation were 9.5%, 7.9%, 4.3%, 4.2%. The average recoveries of samples were 82%~112%, 82%~102.5%, 90%~115%, 80%~110%. **Conclusion** The method was simple, quick and adapt for analysis of organic acid in dental plaque.

[Key words] high performance liquid chromatography; organic acid; dental plaque

随着口腔微生物学的不断深入发展, 人们对口腔疾病和口腔微生物之间的关系有了更深刻的认识。有机酸是厌氧细菌的代谢产物, 已有研究报道, 牙菌斑中有机酸的含量与多种口腔疾病有关, 如龋病、单纯性龈炎和牙周炎^[1]等。因此建立一种

测定牙菌斑中有机酸的方法, 可为细菌的鉴定分型和口腔疾病的诊断提供可靠的测试手段。

目前, 有机酸的测定方法主要有气相色谱法、离子色谱法和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。气相色谱法^[2]需用醇衍生化或甲酯化处理, 操作较为繁琐。离子色谱法^[3]虽然样品预处理步骤简单, 但高浓度的无机离子可能会干扰有机酸根离子的测定, 且仪器普及率也较低。而HPLC^[4-5]简便快速、灵敏准确, 在有机酸检测中应用日益广泛。本研究拟建立检测牙菌斑中

[收稿日期] 2008-02-13; [修回日期] 2008-05-01

[基金项目] 国家科技支撑计划课题基金资助项目(07KJB-01); 四川大学青年基金资助项目(0040405505016);

[作者简介] 邹晓莉(1971-), 女, 四川人, 副教授, 博士

[通讯作者] 邹晓莉, Tel: 028-85501301

有机酸的HPLC分析,并用于测定唇腭裂患儿牙菌斑中有机酸的质量浓度。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和仪器

有机酸标准品(Sigma公司,美国),本实验所用水均为超纯水(MilliQ纯水系统制得),其余试剂均为分析纯。HP1100高效液相色谱仪附紫外检测器(Agilent Technologies公司,美国),pHS-3C精密酸度计(上海雷磁仪器厂)。分别精密称0.010 0 g甲酸、乙酸、琥珀酸、乳酸,放置在100 mL容量瓶中,超纯水溶解并定容到刻度,制备1 mg/mL有机酸标准溶液,摇匀,备用。

1.2 色谱条件

色谱柱为Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为磷酸盐缓冲液-甲醇(体积比为97:3);流速为1.0 mL/min;检测波长0~8 min为217 nm,8~15 min为232 nm;柱温为20 ℃。

1.3 标准曲线的绘制

分别取适量有机酸标准溶液,用超纯水稀释成质量浓度为10~100 μg/mL的标准系列,取10 μL进样测定,以有机酸标准溶液浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线或线性回归。

1.4 样品测定

随机抽取正常儿童和唇腭裂儿童各20名,分别作为正常对照组和病例组。取2组儿童的全口牙菌斑,1 000 r/min离心,静置。取2 μL上清液溶解于一定体积重蒸水中,进样测定。

2 结果

2.1 有机酸标准溶液和样品的色谱图

按上述选定条件进行有机酸标准溶液和样品的测试(图1~3),在正常和唇腭裂儿童牙菌斑中均检出甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸4种有机酸,以乙酸质量浓度最高。

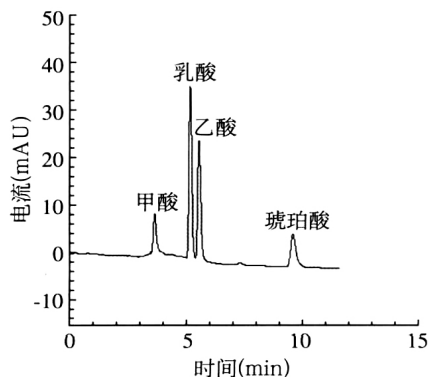


图1 有机酸标准色谱图

Fig 1 Chromatogram of the standard solution

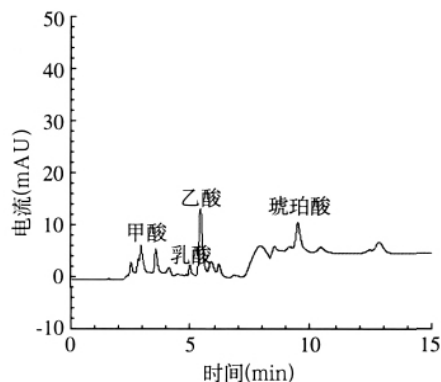


图2 正常儿童牙菌斑样本色谱图

Fig 2 Chromatogram of the sample solution for health children

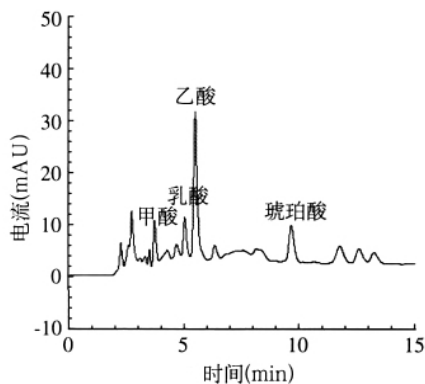


图3 唇腭裂儿童牙菌斑样本色谱图

Fig 3 Chromatogram of the sample solution for cleft lip and palate children

分别测定病例组和正常对照组各20例牙菌斑样品,正常对照组甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸含量的平均值分别为0.35、0.96、0.32、0.09 mg/mL;病例组中甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸含量的平均值为0.37、1.36、0.97、0.16 mg/mL。经秩和检验分析,2组间甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 线性范围和检出限

配制不同质量浓度有机酸标准溶液,按标准曲线步骤进行测定,考察方法的线性范围;根据3倍基线噪声所对应的有机酸质量浓度计算方法的最低检出限,灵敏度均能满足牙菌斑中有机酸的测定,结果见表1。

表1 方法线性范围和检出限

Tab 1 The linear range and detection limit

组分	线性范围 (μg/mL)	线性方程	相关系数	检出限 (μg/mL)
甲酸	0.110~500	$y=14.219x+9.815$	0.999 3	0.110
乙酸	0.049~500	$y=30.808x+4.046$	0.995 6	0.049
乳酸	0.047~500	$y=31.704x+8.723 1$	0.999 7	0.047
琥珀酸	0.084~500	$y=17.812x-3.430 8$	0.999 0	0.084

2.3 加标回收实验

混合多份样液并分装成12份平行样品,其中3份样品用于本底值测定,9份样品加入不同质量浓度的标准溶液,进行加标回收实验。甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸样品加标回收率分别为82%~112%、82%~102.5%、90%~115%、80%~110%。平均回收率为80%~112%,即可满足分析测试的要求(表2)。

表2 样品加标回收实验结果(n=3)

Tab 2 The results of spiked recovery(n=3)

组分	本底值 (mg/L)	加入量 (mg/L)	测得值 (mg/L)	平均加标回收率 (%)
甲酸	0.54	0.25	0.82	112
	0.54	0.5	0.95	82
	0.54	1.0	1.44	90
乙酸	1.20	0.5	1.61	82
	1.20	1.0	2.06	86
	1.20	2.0	3.25	102.5
乳酸	0.22	0.1	0.31	90
	0.22	0.2	0.45	115
	0.22	0.3	0.51	96.7
琥珀酸	0.15	0.1	0.26	110
	0.15	0.2	0.31	80
	0.15	0.3	0.48	110

2.4 精密度实验

对同一标准溶液连续测定8次,以峰面积的相对标准偏差来考察精密度,甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸的相对标准偏差分别为9.5%、7.9%、4.3%、4.2%,均小于10%。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

3.1.1 测定波长的选择 对甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸标准溶液进行波长扫描,结果表明,甲酸、乙酸、乳酸和琥珀酸最大吸收波长分别为217、217、217、232 nm,选择各自的最大吸收波长作为4种有机酸的检测波长。

3.1.2 流动相种类和pH值的选择 对于有机酸的测定,常用磷酸盐作为缓冲液。实验发现,加入少量的甲醇可改善有机酸的分离和峰形。改变甲醇浓度1%~10%,考察其对待测有机酸分离的影响。结果表明,随着甲醇浓度的增大,有机酸峰形更好,但保留时间缩短。当甲醇浓度为3%时,4种有机酸可得到有效地分离。因此实验采用3%甲醇-磷酸盐缓冲液作流动相。

有机酸大多数为弱酸,易在水系流动相中解离

而不能在固定相上保留,而较高的酸度有利于有机酸在柱上得以保留而分离。考虑到过低的pH值会缩短分离柱的寿命,实验在pH值2.5~4.0范围考察pH值对有机酸分离的影响,当pH<3.2时,4种有机酸标准溶液能够得到有效分离,而在pH值为2.8时可实现样品的完全分离,故选用流动相的pH值为2.8。

3.2 样品前处理

实验分别采用乙醚、三氯甲烷、乙酸乙酯进行样液的提取,结果表明,乙酸乙酯提取液浑浊,不能很好地分层;而经乙醚、三氯甲烷提取后,有机酸的峰面积急剧下降,而样品杂质峰并未减少。所以本研究选择牙菌斑溶于水后直接进样测定。

本研究建立了牙菌斑中有机酸的高效液相色谱分析方法,此方法简便快速,精密度、准确度良好,检出限均在0.12 μg/mL以内,能满足牙菌斑中有机酸的微量分析要求。

[参考文献]

- [1] 徐莉. 菌斑液与龋易感性关系的研究近况[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(Suppl) 28-31.
XU Li. A review on relationship between dental plaque fluid and caries[J]. Foreign Medical Sciences(Stomatology), 2004, 31(Suppl) 28-31.
- [2] 李继遥, 周学东, 张萍, 等. 气相色谱及气相色谱-质谱联用技术分析牙菌斑脂肪酸方法的建立[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(6) 386-388.
LI Ji-yao, ZHOU Xue-dong, ZHANG Ping, et al. Establishment of a GC and GC/MS method for analysis of fatty acids in human dental plaque[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(6) 386-388.
- [3] 袁蕙, 王瑛, 庄国顺. 气溶胶、降水中的有机酸、甲磺酸及无机阴离子的离子色谱同时快速测定法[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6) :11-14.
YUAN Hui, WANG Ying, ZHUANG Guo-shun. Simultaneous determination of organic acids, methanesulfonic acid and inorganic anions in aerosol and precipitation samples by ion chromatography[J]. J Instrumental Analysis, 2003, 22(6) :11-14.
- [4] 刘晨明, 曹宏斌, 曹俊雅, 等. 梯度洗脱高效液相色谱法快速检测厌氧菌代谢物中的有机酸[J]. 分析化学, 2006, 34(9) :1231-1234.
LIU Chen-ming, CAO Hong-bin, CAO Jun-ya, et al. Fast detection of organic acid in anaerobe medium with gradient elution-high performance liquid chromatography[J]. Chin J Analytical Chemistry, 2006, 34(9) :1231-1234.
- [5] Chen SF, Mowery RA, Castleberry VA, et al. High performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates[J]. J Chromatogr A, 2006, 1104(1/2) 54-61.

(本文编辑 王晴)