

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0653-03

## 紫外检测-反相高效液相色谱法测定 唾液富组蛋白5的实验研究

李岩<sup>1,2</sup> 曾红燕<sup>1</sup> 邹晓莉<sup>1</sup> 李庆福<sup>3</sup> 周红梅<sup>3</sup>

(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;

2.四川安全生产检测检验技术研究院 职业危害检测所, 四川 成都 610000;

3.四川大学华西口腔医院 黏膜科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 建立测定唾液中富组蛋白5的紫外检测-反相高效液相色谱法。方法 将收集的唾液样品用pH2.5的磷酸盐缓冲液适度稀释后, 离心, 取上清液进样, 于0.01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH3.5)中洗脱, 经反相 $\text{C}_{18}$ 柱分离, 紫外检测器在276 nm波长处测定其中的富组蛋白5含量。结果 方法的线性范围为1.0~50.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 检出限为0.12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 标准溶液测定保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为0.68%和4.13%。将所建立的方法用于唾液样品的分析, 获得了较为满意的结果, 样品测定的相对标准偏差为4.41%, 加标回收率为88.4%~109.0%。结论 紫外检测-反相高效液相色谱法准确快速, 样品处理简单, 15 min内可完成1次分析周期, 适用于唾液中富组蛋白5的快速检测。

**[关键词]** 富组蛋白5; 唾液; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R 781.7 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.021

**Determination of histatins 5 in salivary by reversed-phase high performance liquid chromatography method with ultraviolet detection** LI Yan<sup>1,2</sup>, ZENG Hong-yan<sup>1</sup>, ZOU Xiao-li<sup>1</sup>, LI Qing-fu<sup>3</sup>, ZHOU Hong-mei<sup>3</sup>. (1. Dept. of Sanitary Technology, West China School of Public Health of Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Examination Institute of Occupational Hazards, Sichuan Academy of Inspecting and Testing Technology for Safety Production, Chengdu 610000, China; 3. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** The determination method of histatins 5 in human saliva with reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. **Methods** Salivary samples were collected and diluted with phosphate buffer (pH2.5). The upper solution was determined with HPLC. Phosphate buffer (pH 3.5) of the mobile phase and  $\text{C}_{18}$  column was used throughout the experiment. The detection wavelength was 276 nm. **Results** The linear ranges were 1.0~50.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The detection limit was 0.12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The relative standard derivations (RSD) of standard solution for reserved time and peak area were 0.68% and 4.13% respectively. The proposed method was applied for analysis of salivary samples and the satisfactory results were obtained. RSD for sample determination was 4.41% and the average recoveries were 88.4%~109.0%. **Conclusion** The method was quick, simple and accurate. Analytical time was less than 15 min. It was adapted for analysis of salivary histatins 5 in salivary samples.

**[Key words]** histatins 5; salivary; reversed-phase high performance liquid chromatography

富组蛋白是一族富含组氨酸的阳离子同源多肽, 主要存在于人类和灵长类的唾液腺、颌下腺和舌下腺分泌物中。迄今为止, 人类已经从唾液腺和

颌下腺唾液中分离出至少12种富组蛋白, 其主要成分为富组蛋白1、富组蛋白3和富组蛋白5, 占富组蛋白总量的85%~90%。富组蛋白虽占唾液蛋白总量的0.1%~0.2%, 但该蛋白质在宿主非免疫防御系统中扮演着重要的角色, 可参与牙获得性膜的形成, 调节牙菌斑的pH, 具有抗微生物作用, 对维护口腔正常生理功能和口腔微生态的动态平衡起着重要作用。研究该蛋白质对探索龋病、牙周病和白色假丝

[收稿日期] 2010-05-05; [修回日期] 2010-08-21

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目(NCET07-0591)

[作者简介] 李岩(1980—), 男, 新疆人, 检验师, 学士

[通讯作者] 邹晓莉, Tel: 028-85501301

酵母菌病等的病因和预防有一定的意义<sup>[1-2]</sup>。目前，关于富组蛋白的分离分析有诸多的报道，但大多研究都着重于定性检测和分离纯化<sup>[3-4]</sup>，而定量测定的方法鲜有报道。本文应用高效液相色谱法，建立了一种定量测定唾液样品中富组蛋白5的方法，样品处理简单，分析周期短，适合批量唾液样品的分析。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

HP1100高效液相色谱仪附紫外检测器(Agilent Technologies公司，美国)，标准储备液配制：用0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲溶液(pH2.5)1.0 mL溶解0.1 mg富组蛋白5的标准物质(Sigma公司，美国)，配成100 μg·mL<sup>-1</sup>富组蛋白5标准溶液；0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲溶液(pH3.5)。

1.2 色谱条件

反相C<sub>18</sub>柱(5 μm，250 mm×4.6 mm，Phenomenex公司，美国)；流动相：0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH3.5)；柱温：25℃；流速为：1 mL·min<sup>-1</sup>；检测波长：276 nm。

1.3 标准曲线的绘制

准确吸取不同体积的100 μg·mL<sup>-1</sup>富组蛋白标准储备液，用0.01 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸盐缓冲液(pH2.5)稀释为0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg·mL<sup>-1</sup>标准应用液，分别取20 μL进样测定，以标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线或线性回归。

1.4 样品处理

样品收集后，用0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲溶液(pH2.5)适度稀释，10 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min后，取上清液直接进样测定。

2 结果

2.1 标准和样品的色谱图

在上述测定条件下进行标准和样品的测试，色谱图见图1、2。

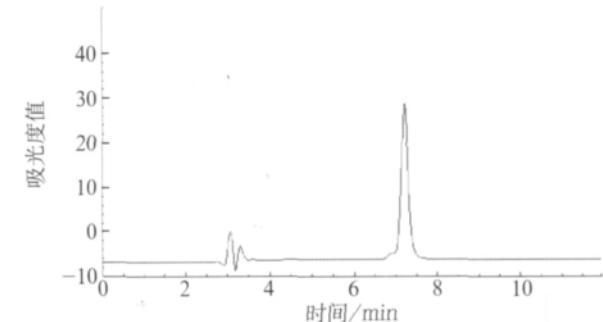


图1 富组蛋白5标准溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of the standard solution of histatins 5

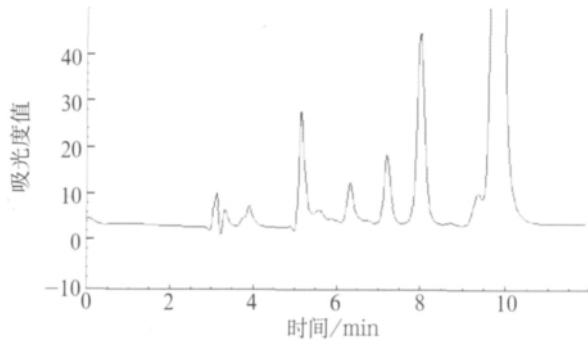


图2 唾液样品溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of the salivary sample solution

2.2 方法性能指标

在选定的测试条件下，对所建立的方法进行了各项性能指标的考察，测定结果表明，方法简单快速，各项指标良好。

2.2.1 线性范围和检出限 在选定的分离条件下，配制不同浓度的标准应用液，进样20 μL进行测定，以标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，富组蛋白在质量浓度1.0~50.0 μg·mL<sup>-1</sup>范围内线性良好( $y=8.4347x+2.72$ ， $r=0.999$ )；以3倍基线噪声对应的标准溶液浓度作为方法的检出限，值为0.12 μg·mL<sup>-1</sup>，灵敏度能满足唾液样品的分析。

2.2.2 精密度实验 对同一浓度的标准溶液，连续进样8次进行色谱分析，以保留时间和峰面积的相对标准偏差考察仪器的精密度，值分别为0.68%和4.13%。取同一样品8份，按1.4步骤进行样品处理后，进样分析，计算测得值的相对标准偏差考察方法的精密度，值为4.41%。

2.2.3 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份用于本底值测定，另9份加入不同浓度水平的标准溶液，按照样品测定步骤进行分析，并计算加标回收率，得到的加标回收率在88.4%~109.0%，结果见表1。

表1 加标回收实验结果

Tab 1 The results of spiked recovery n=3			
本底值/ (mg·L <sup>-1</sup> )	加入量/ (mg·L <sup>-1</sup> )	测得值/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均回收率/ %
28.5	15.0	44.8	108.7
28.5	15.0	42.6	94.0
28.5	15.0	43.3	98.7
28.5	30.0	61.2	109.0
28.5	30.0	60.8	107.7
28.5	30.0	55.3	89.3
28.5	50.0	72.7	88.4
28.5	50.0	75.9	94.8
28.5	50.0	80.4	103.8

2.3 样品的测定

用本法分别测定正常组(a)、用抗生素药1周组

(b)和用药2周组(c)各40例唾液样品,测定结果见表2。从检测数据可见,3组的富组蛋白平均含量有一定程度的变化,但对上述结果进行统计分析(配对秩和检验, Wilcoxon Signed Ranks Test)显示,3组测定结果无显著性差异( $P>0.05$ ),可见该抗生素对唾液中富组蛋白5的含量无明显影响。

表2 唾液样品中富组蛋白5含量的测定结果

Tab 2 The determination results of histatins 5 in salivary samples  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

分组	富组蛋白含量范围	富组蛋白平均含量
a	5.0~211.3	63.9
b	23.3~271.6	72.4
c	14.3~328.1	67.3

### 3 讨论

实验对各项影响分离分析的因素进行了考察和优化,以期达到较好的分离效果,且适合唾液样品的测定。

#### 3.1 色谱条件的选择

3.1.1 测定波长的选择 蛋白质通常在210~220 nm和270~280 nm处有吸收峰,根据文献报道<sup>[5]</sup>,实验选择了214 nm和276 nm波长进行比较。实验结果表明,在214 nm波长处进行检测,富组蛋白5的测定灵敏度较高,但样品分离时,却有杂质峰严重干扰,改变色谱条件也无法分辨;在276 nm波长处进行分析,虽然灵敏度比214 nm波长时下降了2~3倍,但样品测定时基底干扰很少,富组蛋白5和干扰物质能得到有效地分离。因此实验选择测定波长为276 nm,在该波长下进行检测,灵敏度亦能满足样品分析的需要。

3.1.2 流动相的选择 实验选择与样品处理相同的磷酸盐缓冲液作为流动相缓冲液,并在缓冲液中添加甲醇和乙腈两种常用的色谱有机溶剂来考察富组蛋白的分离,结果表明,加入甲醇和乙腈,均会使富组蛋白保留时间大幅度缩短,而影响其与杂质峰的分离。因此实验用纯磷酸盐缓冲液作为流动相。

组氨酸( $\text{pI}=7.59$ )、精氨酸( $\text{pI}=10.70$ )和赖氨酸( $\text{pI}=9.74$ )均为3种碱性氨基酸,它们是富组蛋白的优势氨基酸,在富组蛋白分子组成中,其相对含量较高,使得整个蛋白质分子呈碱性( $\text{pI}>9.5$ )。因此,流动相的pH值对富组蛋白的分子解离可能会有一定的影响,从而影响其色谱分离。本实验在流动相pH2.0~8.0范围内对色谱测定的影响进行了考察。实验结果表明,流动相的pH值对富组蛋白的出峰时间有较大影响,随着pH增高,出峰时间明显缩短。当pH增至4.0以上,富组蛋白5的峰与样品干扰峰不能

得到有效分离。综合考虑样品分离效果和分析时间,实验选择流动相pH为3.5。

3.1.3 流速的选择 高效液相色谱的流速与出峰时间成反比,流速越大,出峰越快,分析周期越短。实验在0.8~1.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围内考察了流速对富组蛋白测定的影响,因样品有一定的黏度,流速增大会引起柱压很快地升高,流速1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时柱压已达15 MPa。综合考虑柱压和分析时间,选择1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速进行实验。

#### 3.2 样品处理

因样品黏度过大,进样前需进行适度的稀释。考虑到人唾液样品中磷的含量较高,选用了磷酸盐缓冲液作为稀释液,可以很大程度降低用缓冲液处理样品带来的定性定量信号的改变。

实验了不同pH(pH2.5~7.0)的磷酸盐缓冲液作为样品稀释液。结果表明,随着缓冲液pH的增高,柱压会随之增大,且峰形拖尾。这说明唾液样品需用酸性溶液进行稀释,分析其原因可能为酸性溶液能使样品中部分大分子蛋白质析出,降低了唾液样品的黏度,防止大分子蛋白对柱子的堵塞。另外,酸性溶液可抑制样品中内源性蛋白酶的活性,使得样品在分析前保持稳定。实验选择用酸性磷酸盐缓冲液(pH2.5)进行样品的稀释,然后离心后即可直接进样分离分析,取得了较为满意的结果。

#### [参考文献]

- [1] 冯新秋,石四箴. 儿童唾液富组蛋白含量与患龋状况的分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(6): 800-803.  
FENG Jin-qiu, SHI Si-zhen. The relationship between contents of histadine-rich proteins of saliva and caries susceptibility in children[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(6): 800-803.
- [2] 赵心臣. 唾液富组蛋白[J]. 国外医学口腔医学分册, 1995, 22(1): 24-27.  
ZHAO Xin-chen. Histadine-rich proteins of saliva[J]. Foreign Medical Sciences: Stomatology, 1995, 22(1): 24-27.
- [3] 景娟,侯铁舟,赵东方,等. 人唾液蛋白的高效疏水色谱分离纯化[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2003, 24(1): 82-84.  
JING Juan, HOU Tie-zhou, ZHAO Dong-fang, et al. Separation and purif ication of human salivary protein by high-performance hydrophobicity chromatography[J]. J Xi'an Jiao Tong University: Medical Science Edition, 2003, 24(1): 82-84.
- [4] Flora B, Gusman H, Helmerhorst EJ, et al. A new method for the isolation of histatins 1, 3, and 5 from parotid secretion using zinc precipitation[J]. Protein Expr Purif, 2001, 23(1): 198-206.
- [5] Castagnola M, Congiu D, Denotti G, et al. Determination of the human salivary peptides histatins 1, 3, 5 and statherin by high-performance liquid chromatography and by diode-array detection [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 751(1): 153-160.

(本文编辑 汤亚玲)