

大豆种子中嘌呤含量的 HPLC 测定方法

吕 铎,邢光南,盖钧镒

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要: 根据检测不同高氯酸浓度和水解温度对大豆种子的水解效果,检测不同流动相对鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤4种成分的分离效果,建立了稳定准确的大豆种子中多组分嘌呤含量的高效液相色谱分析方法。结果表明:在100℃条件下,35% (v/v) 的高氯酸处理60 min时豆粉水解效果最佳;使用 Welch Ultimate Polar RP18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) 色谱柱以0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲液 (pH2.9) 作为流动相时,4种嘌呤在0.05~25 mg·L⁻¹浓度范围内均可完全分离且响应峰面积与浓度呈良好线性相关 ($r > 0.9999$),相对标准偏差为2.97%~6.25%,加标回收率为89.19%~110.97%。

关键词: 大豆种子; 嘌呤含量; 高效液相色谱分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0655

HPLC Method for Determining Purine Content in Soybean Seeds

LYU Duo, XING Guang-nan, GAI Jun-yi

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/ National Center for Soybean Improvement/ Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean (General), Ministry of Agriculture/ National Key Laboratory for Crop Genetic and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: A stable and accurate HPLC (high performance liquid chromatography) procedure for measuring multiple components of purines in soybean seeds was established based on choosing an appropriate HClO₄ content and temperature for hydrolysis of mashed soybean specimen and choosing an appropriate buffer solution mobile phase. The optimized hydrolysis condition was hydrolyzing mashed soybean seed with 35% (v/v) of HClO₄ for 60 min at 100℃. The optimized chromatography condition was using Welch Ultimate Polar RP18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) as chromatographic column with 0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ buffer solution (pH2.9) as mobile phase at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Under this system, the adenine, guanine, hypoxanthine and xanthine within 0.05–25 mg·L⁻¹ could be fully separated and the response peak area was linearly correlated with purine content perfectly ($r > 0.9999$) with the range of relative standard deviation (RSD or CV) as 2.97%–6.25% and the range of spiked recovery rate as 89.19%–110.97%.

Keywords: Soybean seed; Purine Content; High performance liquid chromatography (HPLC)

痛风是由于人体嘌呤代谢出现障碍,引起血液中尿酸浓度升高进而导致组织损伤的一种常见疾病^[1-2]。近年来,我国人群的高尿酸血症和痛风的患病率呈上升趋势^[3-5]。研究发现,痛风和高尿酸血症的治疗除了采用药物外,控制高嘌呤食物的摄入也是一种重要的途径^[6-8]。大豆含有优质的植物蛋白,是居民膳食中蛋白质的主要来源,然而近年来有关食用大豆会诱发高尿酸血症和痛风的报道层出不穷,在痛风患者的参考食谱中,大豆及其制品被划分为宜限量食用食物^[9-12],但是有关大豆嘌呤含量全面检测的报道却不常见,相关参考资料公

布的数据也存在着来源不清且互相矛盾的问题。因此,全面测定大豆的嘌呤含量对于指导痛风和高尿酸血症患者的饮食和预防发病具有重要的意义。

食物嘌呤含量的常见检测方法包括液相色谱^[13-17]和毛细管电泳法^[18]等,不同测定方法对样品嘌呤的提取和测定条件具有差别,这也导致了测定结果不尽相同。其中使用高氯酸水解样品,然后使用高效液相色谱法进行检测是最常用的方法,这种方法前处理程序相对简单,试验误差较小。国外 Kaneko 等^[14]应用高效液相色谱法仅测得大豆中腺嘌呤和鸟嘌呤的含量,国内刘少林等^[16]的研究虽然

收稿日期: 2016-01-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973计划”(2011CB1093); 农业部公益性行业专项(201203026-4); 国家自然科学基金(31571694); 教育部111项目(B08025); 教育部长江学者和创新团队(PCSRT13073); 中央高校基本科研业务费项目(KYZ201202-8); 国家现代农业产业技术体系(CARS-04); 江苏省优势学科建设工程专项; 江苏省JCIC-MCP项目。

第一作者简介: 吕铎(1990-),男,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 18298345890@163.com。

通讯作者: 盖钧镒(1936-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种和植物数量遗传学研究。E-mail: sri@njau.edu.cn。

检测到了大豆种子中黄嘌呤和次黄嘌呤的含量,但是回收率偏低。荣胜忠等^[17]的研究结果具有较高的回收率,但是样品前处理过程中,未对高氯酸浓度这一试验条件进行深入摸索。本研究在前人基础上探讨了大豆的水解条件以及高效液相色谱分离条件,并对方法的准确性和重复性进行了研究,建立了大豆种子中4种嘌呤成分(鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤)的测定方法,为大豆中嘌呤含量的全面测定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 测试样品 大豆样品来自南京农业大学国家大豆改良中心,种子经除杂烘干后采用粉碎机粉碎(40目筛,孔径0.425 mm)4℃保存备用。

1.1.2 试剂 腺嘌呤(adenine)、鸟嘌呤(guanine)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、黄嘌呤(xanthine)均购自Sigma公司,纯度>99%;甲醇,色谱纯;高氯酸(HClO₄)、磷酸(H₃PO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)均为优级纯;氢氧化钾(KOH)为分析纯;超纯水由Millipore超纯水系统制备。

嘌呤储备液的制备:精确称取鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤和腺嘌呤各0.01 g,用1 mol·L⁻¹ KOH溶液溶解,定容至50 mL,配制成200 mg·L⁻¹储备液,4℃保存备用。

1.1.3 仪器 Agilent 1100型HPLC配有紫外检测器;Welch Ultimate Polar RP18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5.0 μm);KH-300DE超声清洗机;AB204-N分析天平;METTLER TOLEDO pH计;BECKMAN Avanti J-26S型离心机;电热恒温水浴锅;Millipore超纯水制备仪;SHB-III型循环水式真空抽滤装置。

1.2 色谱条件的建立

采用0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲液作为流动相^[16],并在此基础上根据所采用的Welch Ultimate Polar RP18(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)色谱柱的分离性质,用H₃PO₄将流动相pH调节在2.8~4.0范围内,之后用0.22 μm滤膜对流动相进行抽滤;将柱温设定为30℃,流速1.0 mL·min⁻¹,紫外检测器波长254 nm,进样量为10 μL,考察不同pH的流动相对嘌呤混合标品的分离情况。

1.3 样品水解处理条件的建立

参考前人研究^[16-17],采用高氯酸溶液水解豆粉样品,进而对高氯酸溶液的最佳浓度和适宜水解温度进行优选。

1.3.1 高氯酸浓度的选择 分别称取0.200 g豆粉样品置于不同50 mL离心管中,分别加入10%、

20%、25%、30%和35%(v/v)的HClO₄溶液5 mL,100℃恒温水浴60 min后,迅速冰浴冷却,以不同浓度的KOH溶液中和至pH7.0,并定容至15 mL,随后以4 900 r·min⁻¹离心30 min,取5 mL上清,上清液用H₃PO₄调节至pH2.9,定容至10 mL,再以4 900 r·min⁻¹离心10 min,上清液过0.22 μm滤膜过滤后待测。当HClO₄浓度在35%(v/v)以上时,用KOH中和样品会产生大量沉淀和氯气,对后续试验造成严重影响,故水解处理以HClO₄浓度35%(v/v)为上限。

1.3.2 水解温度的选择 分别称取0.200 g豆粉样品置于不同50 mL离心管中,分别加入已确定浓度为35%(v/v)的HClO₄溶液5 mL,分别置于100、90、80、70、60℃不同温度的水浴锅中恒温水浴60 min后,迅速冰浴冷却,以KOH溶液中和至pH7.0,定容至15 mL,随后以4 900 r·min⁻¹离心30 min,取5 mL上清,上清液用H₃PO₄调节至pH2.9,定容至10 mL,再以4 900 r·min⁻¹离心10 min,上清液用0.22 μm滤膜过滤后待测。

1.4 标准曲线的制作

用超纯水将配置好的嘌呤储备液稀释成梯度浓度0.05~25 μg·mL⁻¹,用0.22 μm的微孔滤膜过滤,依次进样分析,制作标准曲线。

1.5 精确度、准确度和稳定性检验

1.5.1 精确度检验 精确吸取嘌呤标准样品液,连续进样5次,每次10 μL,以5次进样所测定的嘌呤各组分含量计算仪器的相对标准偏差(RSD)。

1.5.2 准确度检验 选取同一品种的干豆粉为试样,分别称取0.200 g,平行测定5次,以5次平行样测定的4种嘌呤组分的峰面积计算相对标准偏差(RSD)来检验水解方法的重现性。

1.5.3 稳定性检验 分别称取同一大豆品种的豆粉样品0.200 g,按其每种嘌呤含量的0.5、1和2倍加入各标准品溶液于均匀样品中,配制成低(1:0.5)、中(1:1)和高(1:2)3种浓度,混匀后进行加样回收率试验,每种浓度的样品平行测定3次,取平均值。

1.6 数据分析

数据均使用SPSS 20.0软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 分离条件选择

将0.02 mol·L⁻¹浓度磷酸二氢钾缓冲液的pH配制在2.8~4.0,流速1.0 mL·min⁻¹,考察嘌呤混合标品的分离情况。发现pH在3.3~4.0时4种嘌呤不能完全分离(图1A和B)。当流动相pH为2.8~3.2时,4种嘌呤可以完全分离,其中pH2.9

时 4 种嘌呤的分离情况最为均匀且保留时间最短 (图 1C 和 D)。因此选择 pH2.9 的 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液作为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 紫外波长为 254 nm。

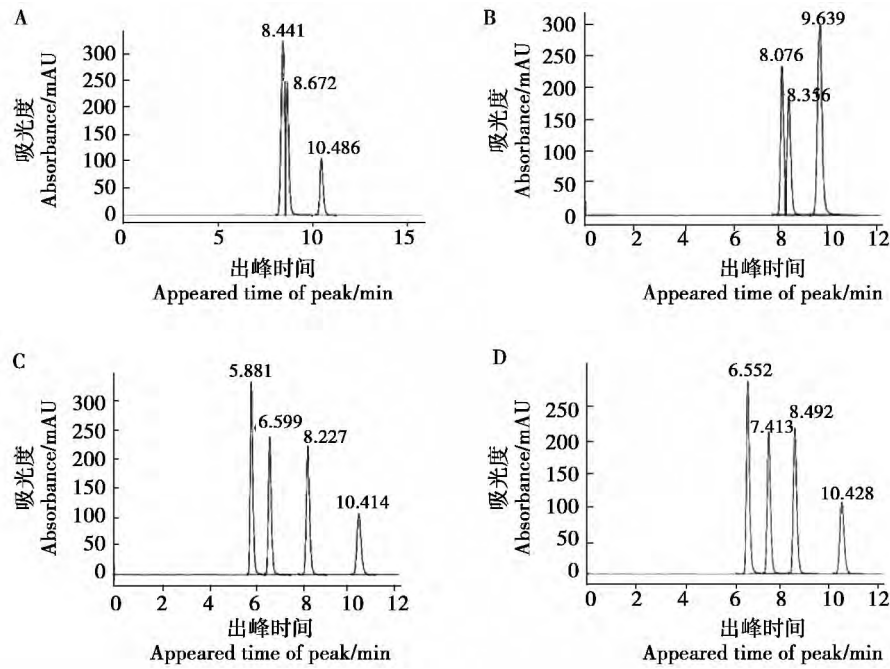


图 1 不同 pH 磷酸二氢钾缓冲液对嘌呤混合标品的分离
Fig. 1 Chromatogram of purine using different pH KH₂PO₄ as mobile phase

2.2 水解条件选择

2.2.1 高氯酸浓度 以 1.4 的处理方法, 分别用 5 mL 的 10%、20%、25%、30%、35% (v/v) 的 HClO₄ 溶液水解豆粉样品, 然后用 2.1 确定的分离条件对样品进行测定。如表 1 所示, 高氯酸浓度在 10% ~ 35% (v/v) 范围内, 4 种嘌呤含量随着 HClO₄ 溶液

浓度增加而增加。在试验过程中发现, 当 HClO₄ 浓度在 35% (v/v) 以上时, 用 KOH 中和样品会产生大量沉淀和氯气, 对后续试验造成不良影响。综上所述, 浓度为 35% (v/v) 的 HClO₄ 溶液是水解的最佳浓度。

表 1 不同高氯酸浓度处理后的嘌呤含量

Table 1 Contents of purines at different HClO₄ concentration (mg·kg⁻¹)

HClO ₄ 浓度 Concentration of HClO ₄ / %	腺嘌呤 Adenine	鸟嘌呤 Guanine	次黄嘌呤 Hypoxanthine	黄嘌呤 Xanthine	总含量 Total content
10	878.81	1004.93	13.15	22.39	1919.27
20	932.15	1064.90	16.84	37.63	2051.53
25	963.13	1078.73	16.33	41.35	2099.54
30	969.01	1114.33	17.52	41.43	2142.29
35	1026.08	1201.93	24.89	58.77	2311.68

2.2.2 水解温度 有研究表明嘌呤具有一定的不稳定性, 水解温度会导致几种组分发生转化^[19-20], 因此为了确定最佳的水解温度, 需要对反应条件进行筛选。采用浓度为 35% (v/v) 的高氯酸溶液 5 mL, 分别置于 100、90、80、70、60℃ 不同温度的水浴锅中恒温水浴 60 min, 再以 1.4 所述的方法对样品进行处理, 然后用 2.1 确定的分离条件对样品进行测定。如表 2 所示, 当水解温度为 60 ~ 90℃, 嘌

呤的总含量随着温度的升高而增加, 当温度升高至 100℃ 时总嘌呤含量基本保持不变, 但是次黄嘌呤和黄嘌呤的含量却随温度的升高而增加, 腺嘌呤和鸟嘌呤的含量则反而减少。鉴于大豆烹饪过程中的实际温度为 100℃ 左右, 且有文献表明次黄嘌呤对尿酸水平的影响比鸟嘌呤更明显^[21-22], 因此选择 100℃ 作为水解温度。

表 2 不同水解温度下的嘌呤含量

Table 2 Contents of purines at different hydrolyzation temperature ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

水解温度 Water temperature/ $^{\circ}\text{C}$	腺嘌呤 Adenine	鸟嘌呤 Guanine	次黄嘌呤 Hypoxanthine	黄嘌呤 Xanthine	总含量 Total content
60	917.21	1081.45	—	—	1998.66
70	938.14	1106.36	—	30.73	2075.23
80	966.76	1107.07	13.41	53.79	2150.42
90	1004.76	1136.33	14.29	52.93	2213.59
100	987.36	1092.57	29.29	102.08	2211.30

— 为未检出。

— means not detected.

2.3 嘌呤线性回归方程和标准曲线的建立

按照 2.1 确定的试验条件,将配置好的嘌呤混合标准溶液系列按照浓度梯度进样分析,以峰面积对相应浓度得到线性回归方程和线性相关系数(表

3)。从表 3 可知,建立了鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤和腺嘌呤峰面积与相应浓度的线性回归方程,且相关系数都高达 0.999 9 以上。

表 3 标准曲线的回归方程及线性范围

Table 3 Regression equation and linear range of the calibration curve

嘌呤组分 Component of purines	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
腺嘌呤 Adenine	$y = 16.83242x + 5.17523$	0.99999	0.05 ~ 25
鸟嘌呤 Guanine	$y = 47.72210x + 15.30172$	0.99998	0.05 ~ 25
黄嘌呤 Xanthine	$y = 39.90579x + 10.27936$	0.99999	0.05 ~ 25
次黄嘌呤 Hypoxanthine	$y = 41.20993x + 9.03078$	0.99999	0.05 ~ 25

2.4 精确度、准确度和稳定性

按 2.1 确定的色谱条件,在高氯酸溶液水解浓度 35% (v/v)、水解温度在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,方法的精确度、准确度和稳定性试验结果见表 4。精确性试验的 RSD 为 0.56% ~ 1.26%。重复性试验的 RSD

为 2.81% ~ 6.25%; 4 种嘌呤的平均加标回收率为 89.19% ~ 110.97%。表明整个试验体系用于测定大豆种子中嘌呤含量的精确度、准确度和重现性均较好,试验结果可信。

表 4 方法的加标回收率和相对标准偏差

Table 4 Spiked recovery rate and RSD of the method(%)

统计数 Statistics	腺嘌呤 Adenine	鸟嘌呤 Guanine	黄嘌呤 Xanthine	次黄嘌呤 Hypoxanthine
加标回收率 Spiked recovery rate	97.54	103.65	110.97	89.19
仪器相对标准偏差 RSD of instrument	0.56	0.64	0.45	1.26
方法的准偏差 RSD of method	2.97	2.81	6.25	6.09

3 结论与讨论

目前关于不同栽培大豆品种中嘌呤含量测定的报道较少,且不同报道中的试验条件不一致,这给人们科学饮食和低嘌呤大豆品种的育种工作带来一定的限制。因此,建立大豆种子嘌呤含量的测定方法并对不同大豆品种进行嘌呤含量的测定具有重要意义。通过对高氯酸水解和液相色谱分离条件的摸索,确定了大豆样品中嘌呤含量的测定方法,色谱条件为:使用 Welch Ultimate Polar RP18 (4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μm) 色谱柱,在检测波长

为 254 nm 的条件下,以 0.02 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液 (pH2.9) 作为流动相,流速设定 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;水解条件为:在温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,用 35% 的高氯酸溶液 (v/v) 水解豆粉 60 min。本研究建立的 HPLC 技术使大豆种子中的 4 种嘌呤组分在 12 min 内达到良好分离,比前人的研究^[16]缩短了 4 min,可以节省大批量测定大豆品种嘌呤含量的试验时间;本试验体系的回收率达到 89.19% ~ 110.97%,也比前人的研究结果 (57.19 ~ 88.37%)^[16]有较大提高。

参考文献

- [1] 杨虎天. 痛风的防治与自我保健[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005. (Yang H T. The prevention and self-care of gout [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2005.)
- [2] Falasca G F. Metabolic diseases: Gout[J]. *Clinics in Dermatology*, 2006, 24(6): 498-508.
- [3] 张学顺, 于文广, 于丽霞, 等. 山东省海阳市社区居民高尿酸血症与痛风流行病学调查[J]. 华全科医师杂志, 2006, 5(4): 216-219. (Zhang X S, Yu W G, Yu L X, et al. An epidemiologic study on hyperuricaemia and gout in residents of coastal areas of Haiyang City in Shandong[J]. *Chinese Journal of General Practitioners*, 2006, 5(4): 216-219.)
- [4] 邵继红, 莫宝庆, 喻荣彬, 等. 南京市社区人群高尿酸血症与痛风的流行病学调查[J]. 疾病控制杂志, 2003, 7(4): 305-308. (Shao J H, Mo B Q, Yu R B, et al. Epidemiological study on hyperuricemia and gout in community of Nanjing[J]. *Chinese Journal of Disease Control and Prevention*, 2003, 7(4): 305-308.)
- [5] 王建, 邵永强, 陈祎, 等. 温州市居民高尿酸血症及影响因素分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2545-2547. (Wang J, Shao Y Q, Chen W, et al. Analysis on Wenzhou citizens hyperuricemia and the influence factor[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2010, 20(10): 2545-2547.)
- [6] 秦秀玲. 痛风病人的饮食研究进展[J]. 医学动物防制, 2007, 23(9): 661-662. (Qin X L. Research progress on diet treatment of gout[J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2007, 23(9): 661-662.)
- [7] 赵新儿, 谭晓冬. 饮食中嘌呤含量对痛风病人疗效的影响[J]. 浙江实用医学杂志, 2003, 8(4): 242-243. (Zhao X E, Tan X D. The influence of purine content in diet on gout[J]. *Zhejiang Practical Medicine*, 2003, 8(4): 242-243.)
- [8] Nuki G, Simkin P A. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment[J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2006, 8(S1): 1186-1906.
- [9] Smith R G. The diagnosis and treatment of gout[J]. *US Pharm*, 2009, 34(5): 40-47.
- [10] Cohen M G. Treatment of gout[J]. *Internal Medicine Journal*, 2011, 41(1a): 70-71.
- [11] 李莉. 高嘌呤饮食诱发大鼠高尿酸血症临床观察[J]. 河北医学, 2007, 13(9): 1060-1062. (Li L. The high adenine diet causing hyperuricemia in rats[J]. *Hebei Medicine*, 2007, 13(9): 1060-1062.)
- [12] 王波. 痛风急性发作 65 例饮食护理[J]. 齐鲁护理杂志, 2008, 14(5): 59-60. (Wang B. Diet nursing in 65 cases of acute gout attack[J]. *Journal of Qilu Nursing*, 2008, 14(5): 59-60.)
- [13] Lou S N, Chen T Y. Studies on the analytical method of the purine contents in fishery products[J]. *Food Science*, 1997, 24(1): 1-11.
- [14] Kaneko K, Kudo Y, Yamanobe T, et al. Purine contents of soybean derived foods and selected Japanese vegetables and mushroom[J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(6): 628-630.
- [15] Fan H, Yang F Q, Li S P. Determination of purine and pyrimidine bases in natural and cultured Cordyceps using optimum acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 45(1): 141-144.
- [16] 刘少林. 大豆中嘌呤含量的测定及分离研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009. (Liu S L. Determination and remove of purines in soybean [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009.)
- [17] 荣胜忠, 邹立娜, 王朝旭, 等. 中国常见植物性食品中嘌呤的含量[J]. 卫生研究, 2012, 41(1): 92-95. (Rong S Z, Zhou L N, Wang C X, et al. Purine in common plant food in China[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2012, 41(1): 92-95.)
- [18] 侯晓蓉, 栾连军, 程翼宇. 冬虫夏草中核苷类成分的毛细管区带电泳定量分析研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 447-449. (Hou X R, Luan L J, Cheng Y Y. Quantitative analysis of the nucleosides in *Cordyceps sinensis* with capillary zone electrophoresis[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(6): 447-449.)
- [19] 王新宴, 凌云, 储晓刚, 等. 肉制品中四种嘌呤含量在水煮过程中的变化[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 67-69. (Wang X Y, Ling Y, Chu X G, et al. Effects of boil processing on content of four kinds of purines in meat products[J]. *Food Science*, 2008, 29(7): 67-69.)
- [20] 凌云, 王新宴, 雍炜, 等. 高效液相色谱法检测肉类食品中 4 种嘌呤碱[J]. 分析化学, 2008(6): 724-728. (Ling Y, Wang X Y, Yong W, et al. Determination of four purines in meat by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008(36): 724-728.)
- [21] Clifford A J, Riumallo J A, Young V R, et al. Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans[J]. *Journal of Nutrition*, 1976, 106(3): 428-434.
- [22] Brulé D, Sarwar G, Savoie L. Changes in serum and urinary uric acid levels in normal human subjects fed purine-rich foods containing different amounts of adenine and hypoxanthine[J]. *Journal of American College of Nutrition*, 1992, 11(3): 353-358.