

# 食物中嘌呤检测方法研究进展

刘亮婷, 任国峰

中南大学湘雅公共卫生学院营养与食品卫生系, 湖南 长沙 410078

**摘要:** 嘌呤是构成体内核酸的重要碱基化合物, 其在体内的代谢终产物为尿酸。当体内尿酸沉积时, 易引发高尿酸血症和痛风。食物中的嘌呤摄入是体内嘌呤的重要来源之一, 因此对食品中的嘌呤含量进行检测对人们膳食摄入有重要指导意义。嘌呤检测早在上世纪 50 年代就引发了关注, 随着检测技术的发展, 现已实现了嘌呤的微量级快速检测。本文对嘌呤检测方法进行了综述, 为食品嘌呤测定提供方法参考。

**关键词:** 嘌呤; 检测; 综述

**中图分类号:** TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)09-1146-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.09.036

## Development of purine extraction and determination in foods

LIU Liang-ting, REN Guo-feng

Department of Nutrition Science and Food Hygiene, Xiangya School of Public Health,  
Central South University, Changsha, Hunan 410078, China

Corresponding author: REN Guo-feng, E-mail: renguofeng@csu.edu.cn

**Abstract:** As a vital component of nucleic acid, the metabolic end-product of purine in human body is uric acid. Researches show that the accumulation of uric acid in blood is closely associated with the development and progression of hyperuricemia and gout. Diet is an important way to intake purine for human body; and hence, determining the content of purine in various foods is conducive to guiding people's daily meals. In 1950s, purine determination was firstly caught attention in academia. With the development of testing technology, micro-sensitive and fast determination of purine has been successfully achieved nowadays. This article reviews methodologies of purine determination so as to offer methods for purine determination in foods.

**Key words:** purine; determination; review

嘌呤是体内核酸的重要组成部分, 同时也在辅酶组成、代谢调节及能量供应等方面起着重要作用。人体内的嘌呤主要有腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤四种, 而嘌呤在体内的代谢终产物为尿酸。当嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄障碍时将导致体内尿酸堆积, 进而引发高尿酸血症, 其中约 10% 的患者将发展为痛风。随着人们生活水平提高, 我国高尿酸血症和痛风的患病率正在迅速增加。本世纪初与上世纪 80 年代相比, 我国高尿酸血症患病率从 1.4% 升至 8.4%<sup>[1]</sup>, 且人均 GDP 处前 1/3 水平的人群高尿酸血症患病率高达 21.4%, 与西方国家持平<sup>[2]</sup>。富含嘌呤的食物摄入是人体尿酸来源的重要部分, 与高尿酸血症及痛风的发展关系密切<sup>[3]</sup>, 因此, 近年来已有学者对部分食物中的嘌呤含量进行了检测。

**基金项目:** 中南大学-昆明黑马软件股份有限公司合作科研项目

**作者简介:** 刘亮婷 (1992-), 女, 湖南湘潭人, 硕士在读, 研究方向: 食物营养素的测定和慢性病预防。

**通信作者:** 任国峰, E-mail: renguofeng@csu.edu.cn。

食物中的嘌呤主要以化合态的形式存在于核酸中, 若要检测其嘌呤含量, 应先水解成四种游离嘌呤碱基后再进一步测定<sup>[4]</sup>。目前, 嘌呤的前处理方法主要有酸水解法、萃取法、超声提取法等, 检测方法有电泳法、气相色谱法、高效液相色谱法、反相离子对色谱法等, 最常使用的方法为高效液相色谱法。本文对近些年来食物中嘌呤检测方法 (主要是高效液相色谱法) 的相关研究进展进行综述。

### 1 嘌呤前处理方法的研究

**1.1 酸水解法** 目前, 食物的酸水解法有高氯酸水解法、三氟乙酸/甲酸水解法、硫酸水解法、盐酸水解法、磷酸水解法等, 表 1 列出了不同酸水解法的具体操作方法和条件。由表 1 可知, 高氯酸水解法、三氟乙酸/甲酸/水水解法和硫酸水解法均能将食物中四种嘌呤组分提取出来, 且回收率均高于 80%。高氯酸水解法由于操作简单、成本较低, 是食物嘌呤前处理过程中最常使用的酸, 但高浓度的高氯酸会降解嘌呤、造成嘌呤损失, 因此前处理时高氯酸浓度不宜太高。三氟乙

酸/甲酸/水水解法水解时间短、嘌呤损失小,水解效果令人满意,但成本较高。而硫酸消化法现仅用作啤酒的前处理过程,并未在其他食物中推广。

表 1 嘌呤酸水解方法

酸水解种类	酸水解条件	水解样品	水浴时间(min)	水浴温度(℃)	水解效果
高氯酸 <sup>[5]</sup>	10%浓度, 2 ml	菌类	60	100	较好,回收率 80%左右
三氟乙酸/甲酸 <sup>[6]</sup>	1:1, 10 ml	啤酒	60	98	能提取四种嘌呤,效果优于盐酸
三氟乙酸/甲酸/水 <sup>[7]</sup>	5:5:1,10 ml	大豆	12	90	较好,回收率 90%以上
硫酸 <sup>[8]</sup>	2 ml	啤酒	10	100	较好,回收率 88%左右
磷酸 <sup>[6]</sup>	10 ml	啤酒	60	98	只能提取鸟嘌呤、腺嘌呤
盐酸 <sup>[6]</sup>	10 ml	啤酒	60	98	能提取四种嘌呤,但损失较大
乙酸 <sup>[6]</sup>	10 ml	啤酒	60	98	极小量提取鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤

1.2 有机溶剂萃取法 有机溶剂萃取法也是提取食物嘌呤的方法之一,影响提取效率的因素有萃取剂的种类、温度、浓度、萃取时间、液固比等。孙培龙等<sup>[9]</sup>分别选取甲醇、乙醇、乙酸和氨水作为萃取剂对香菇中的嘌呤提取效率进行比较,实验结果表明乙醇的提取率最高,甲醇提取率稍低,乙酸和氨水几乎无提取作用。研究者进一步将乙醇浓度、萃取温度、萃取时间和液固比四个因素对嘌呤提取率的影响大小进行正交试验,得出萃取温度对嘌呤提取率影响最大、液固比影响最小,且四种因素最佳组合为乙醇浓度 75%、萃取时间 2 h、温度 85 ℃、液固比 10:1。有机溶剂萃取法对嘌呤的分离效果较好,但因操作复杂、耗时,因此很少被使用。

1.3 超声提取法 超声波能将被测成分从基体物质中分离,因而可以用来提取生物碱的成分。影响超声波提取效果的因素主要有超声溶剂的种类、浓度、超声次数和液固比等。季倩等<sup>[10]</sup>研究了超声溶剂种类对地龙中嘌呤提取效率的影响,分别尝试了生理盐水提取、水提取、甲醇提取和乙醇提取,结果表明提取效率呈“生理盐水>乙醇>水>甲醇”的趋势;崔小兵等<sup>[11]</sup>对海龙中次黄嘌呤及黄嘌呤的提取进行研究,主要研究了超声溶剂甲醇的浓度及超声次数对嘌呤提取效率的影响,结果表明 10%甲醇的提取效率最高,且超声两次、每次超声 30 min 时,嘌呤可基本提取完全。李楠<sup>[12]</sup>研究了不同液固比对药材中嘌呤提取效率的影响,结果表明液固比低时溶剂的提取率也低,随着液固比的增大,溶剂提取率逐渐增大,而当液固比进一步增大时,提取率呈不变或下降趋势。如研究液固比对蟾蜍中嘌呤提取率的影响,当液固比从 25:1 逐渐增大到 100:1 时,嘌呤提取率随之增大,当液固比大于 100:1 时,嘌呤提取率保持不变;而液固比的变化对乌蛇中嘌呤提

取率的影响则稍有不同,当固液比从 20:1 逐渐增大到 40:1 时,嘌呤的提取率逐渐增大,进一步加大液固比时,嘌呤的提取率反而下降。超声波提取法不需要加热,节约了燃料,不破坏提取有效成分,但嘌呤提取时间较长且提取不完全,目前仅作为辅助手段使用。

2 嘌呤检测方法的研究

嘌呤的检测最早可以追溯到上世纪 50 年代,1947 年 Vischer 等<sup>[13]</sup>使用纸层析法对核酸衍生物进行了检测。随着检测方法的不断改进,色谱法的出现成功将嘌呤的检测推进到微量级,反相离子对色谱法<sup>[14]</sup>、高效液相色谱法<sup>[15]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[16]</sup>相继成功测定了嘌呤含量。高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 技术的发展更是因为检测快速、灵敏度高成为了现今嘌呤检测的主流方法。

2.1 HPLC 法测定食物嘌呤含量 HPLC 法是测定食物嘌呤含量的最常用的一种方法。如 Kaneko 等<sup>[17]</sup>对 270 种常见食物中的嘌呤进行检测,采用 Shodex Asahipak GS-320HQ (7.5×300 mm,6 μm) 色谱柱及以 pH 2.5 的 150 mM 磷酸钠缓冲液为流动相,实现了四种嘌呤的分离,保留时间在 40 min 左右;潘洪志等<sup>[18]</sup>则对几种动物性食品进行了嘌呤检测,实验使用 Waters Atlantis T<sub>3</sub> 柱 (4.6 mm×250 mm,5 μm),并以 pH3.6 的甲酸铵:甲醇 (99:1) 溶液为流动相,结果表明四种嘌呤基线分离,保留时间在 13 min 内。上述文献可见,不同的实验检测条件对四种嘌呤组分的保留时间、分离度等影响很大,检测条件对实验结果的优劣起到了重要的作用。影响实验结果的因素主要有色谱柱、流动相、检测波长、柱温和流速等。

2.1.1 色谱柱的选择 色谱柱的选择一直是色谱研

究中最核心的部分,不同的色谱柱对样品组分的分离度、保留时间和出峰峰形有至关重要的作用。嘌呤是一种可溶于水和醇、极性较强的化合物,可选用反相  $C_{18}$  柱对其进行检测<sup>[19]</sup>。如研究者将 Agilent ZORBAX SB- $C_{18}$ 、Agilent ZORBAX Eclipse XDB- $C_{18}$  和 Waters Atlantis d $C_{18}$  三种色谱柱的嘌呤组分分离效果进行比较<sup>[19-20]</sup>,Agilent ZORBAX SB- $C_{18}$  柱出峰效果差、拖尾严重;Agilent ZORBAX Eclipse XDB- $C_{18}$  仅能将四种嘌呤基线分离;而 Waters Atlantis d $C_{18}$  不仅能完全分离四种嘌呤,且峰形好,无拖尾,分离效果好。

**2.1.2 流动相的选择** 流动相是影响高效液相色谱分离效果至关重要的因素,其性质包括流动相的种类、配比、浓度和 pH 值<sup>[21]</sup>。

**2.1.2.1 流动相的种类和比对分离的影响** 流动相中有机溶剂的种类和配比决定着流动相的极性,及洗脱能力。这对嘌呤组分的分离效果和保留时间有重要的影响。流动相中有机溶剂的比例越高,流动相的非极性越大,嘌呤组分的保留时间越短。程庆红等<sup>[22]</sup>对海鲜食品中的三种嘌呤组分进行测定时,比较了甲醇与水 30:70、20:80、10:90、5:95 等不同比对嘌呤组分的分离效果,仅当甲醇与水的配比为 5:95 时,三种嘌呤峰基线分离,但峰型较差,拖尾严重。

嘌呤是一种两性化合物,可通过向流动相中加入少量缓冲盐来提高色谱柱对嘌呤组分的保留作用,达到分离嘌呤组分及改善峰形的目的。如林先军等<sup>[23]</sup>以甲醇与水作为流动相测定啤酒中四种嘌呤的含量时,无论如何调整甲醇与水的比例均不能使四种嘌呤组分分离,向流动相中加入少量的四丁基氢氧化铵后,四种嘌呤组分完全分离。

缓冲盐的种类和比对四种嘌呤组分的出峰影响显著,如使用磷酸与磷酸二氢钾缓冲液做流动相时<sup>[24]</sup>,四种嘌呤组分分离完全、峰形较好;而将甲酸铵与甲醇的缓冲盐溶液作为流动相时<sup>[25]</sup>,四种嘌呤组分仅基线分离,峰形稍有拖尾。Fukuuch 等<sup>[26]</sup>则通过调整缓冲盐中磷酸与磷酸二氢钾的配比,来研究缓冲盐对比对啤酒及饮料中嘌呤检测的影响。结果表明,当磷酸与磷酸二氢钾配比小于 20:100 时,鸟嘌呤峰才能与样品中的未知峰完全分离,而当配比进一步缩小至 15:100 时,嘌呤的保留时间增加,检测时间增长。因此实验最终选择磷酸与磷酸二氢钾的配比为 20:100。

**2.1.2.2 流动相浓度对分离的影响** 当流动相中加入缓冲盐时,缓冲盐的浓度也是影响嘌呤组分分离效果的重要因素之一。缓冲盐浓度直接影响了缓冲盐的离子强度,离子强度将会影响嘌呤组分的出峰。升高

缓冲盐的浓度,增加流动相中离子强度,对峰形具有改善作用。杨海斌等<sup>[20]</sup>研究了磷酸二氢钾溶液的六种浓度对嘌呤组分的分离效果,结果表明尽管所有浓度均可将四种嘌呤组分分离,但当流动相浓度小于  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L 时,腺嘌呤的峰面积减小,当浓度大于等于  $7.0 \times 10^{-3}$  mol/L 时,各嘌呤组分峰面积稳定且峰形较好。

**2.1.2.3 流动相 pH 值对分离的影响** 流动相的 pH 值对样品组分分离起着显著的作用。吕兵兵等<sup>[24]</sup>对带鱼糜中嘌呤含量进行检测,在其他检测条件保持不变的情况下,比较了流动相 pH 范围为 3.0~4.2 时四种嘌呤组分的分离效果。结果表明上述 pH 条件下,四种嘌呤组分均不能完全分离,仅当流动相 pH 为 3.6 和 3.8 时,四种嘌呤组分有分离趋势。进一步对流动相 pH 进行优化,最终将 pH 调至为 3.62 时,四种嘌呤组分实现完全分离。

**2.1.3 检测波长的选择** 嘌呤的检测常使用紫外-可见检测器,因此,HPLC 过程中波长的选择和紫外波长选择一致,即选择嘌呤的最大吸收波长,这样能保证检测的灵敏度和响应值最高<sup>[27]</sup>。Hong<sup>[28]</sup>对四种嘌呤的紫外吸收光谱进行检测,检测结果表明鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤的最大吸收值分别为 246、250、260、267 nm,这四种嘌呤在 254 nm 处均有较大的吸收值。综合考虑之后,选择 254 nm 作为检测波长。

**2.1.4 流速、柱温的选择** 流速和柱温对 HPLC 的分离效果有一定的影响。适当降低流速,可以提高柱效,但流速太小会延长分析的时间;适当提高柱温,可降低流动相的粘度,降低传质阻力,从而提高柱效<sup>[29]</sup>。陈月菊等<sup>[30]</sup>在进行食用菌嘌呤含量检测时,对流速和柱温进行了探讨。在保持其他实验条件不变的情况下,先对四种流速-保留时间的关系进行了分析,结果表明随着流速增大各组分嘌呤保留时间缩短、峰形变窄,但流速过大时,色谱柱压力增大、柱效降低,影响了结果的准确度,因此最终选择 0.8 ml/min 作为流速。接着,在 24℃~36℃ 的范围内对柱温进行调整,发现柱温升高,腺嘌呤保留时间缩短,而次黄嘌呤和黄嘌呤的保留时间受柱温影响不大。

**2.2 其他方法测定食物嘌呤含量** 除高效液相色谱法外,研究者使用其他方法也成功的检测了嘌呤含量。如孙培龙等<sup>[31]</sup>使用纸电泳法检测了香菇中的香菇嘌呤含量,该方法能有效的将香菇嘌呤区带与鸟苷酸、肌苷酸等干扰物质分离,回收率达到 89%。但该方法仅限于测定香菇中特有的香菇嘌呤,未向其他食物推广。Chen 等<sup>[32]</sup>使用高效毛细管电泳法成功检测了人体



DNA 中的嘌呤碱基,该方法能在 14 min 内将几种嘌呤碱基完全分离。毛细管电泳法常用作食品中核苷类和碱基类物质的检测。夏小乐等<sup>[16]</sup>则应用液相色谱-串联质谱的方法成功对清爽型黄酒中的三种嘌呤组分进行了分析,该方法较 HPLC 法更灵敏,且三种嘌呤组分保留时间在 3.2 min 内,但在实际样品检测中鸟嘌呤和次黄嘌呤峰有重叠,且仅对三种嘌呤组分进行了分离测定。目前,还没有更多的文献报道液相色谱-串联质谱法在其他食物嘌呤检测中的应用。

### 3 小 结

综上所述,食品中嘌呤的前处理方法对食物中嘌呤含量检测有很大影响,探索出更高效、简便、环保的前处理方法非常重要。同时,要进一步优化高效液相色谱方法的检测条件、探索新的检测技术,以尽快建立食品嘌呤含量检测的国家标准。

### 参考文献

[1] Zhang LX, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China; a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815-822.

[2] Liu H, Zhang XM, Wang YL, et al. Prevalence of hyperuricemia among Chinese adults; a national cross-sectional survey using multistage, stratified sampling[J]. J Nephrol, 2014, 27(6): 653-658.

[3] 朱迪赞, 吴兴华, 周为文, 等. 广西痛风患者膳食模式与痛风石相关性研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(7): 790-793.

[4] Jankowska DA, Trautweinschult A, Cordes A, et al. A novel enzymatic approach in the production of food with low purine content using *Arxula adenivorans* endogenous and recombinant purine degradative enzymes[J]. Bioengineered, 2015, 6(1): 20-25.

[5] 刘桂英, 杨海斌, 张加玲. 菌类食品中嘌呤含量高效液相色谱测定[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(4): 554-555.

[6] 尤玉如, 张艳萍, 刘士旺. HPLC 法测定啤酒中嘌呤含量的方法研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(1): 76-79.

[7] 刘少林, 李梅青, 丁之恩. HPLC 法测定大豆中嘌呤含量的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 674-676.

[8] 钟晓盈, 陆幼兰. 利用 Hplc 测定啤酒嘌呤含量方法的研究[J]. 啤酒科技, 2007, 14(1): 23-24.

[9] 孙培龙, 吴学谦, 季培军, 等. 香菇嘌呤的提取、纯化和酯化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 47-52.

[10] 季倩, 高守红, 张汉明, 等. HPLC 法测定各沪产地龙和广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的含量[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(4): 443-446.

[11] 崔小兵, 李伟, 张科卫, 等. HPLC 测定海龙中次黄嘌呤及黄嘌呤含量[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(1): 58-60.

[12] 李楠. 动物药材中嘌呤类物质的提取与测定[D]. 长春: 吉林大

学, 2007.

[13] Vischer E, Chargaff E. The separation and characterization of purines in minute amounts of nucleic acid hydrolysates[J]. J Biol Chem, 1947, 168(2): 781-782.

[14] 何忻, 陈静波, 刘绘景, 等. 啤酒中嘌呤的纯化及反相离子对色谱法测定的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 420-422.

[15] 杨海斌, 张加玲, 刘桂英, 等. 鸡鸭不同组织脏器中嘌呤和尿酸的含量及其分布研究[J]. 营养学报, 2013, 35(5): 505-507.

[16] 夏小乐, 夏梅芳, 杨海麟, 等. LC-MS/MS 法分析清爽型黄酒中的嘌呤含量[J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1399-1402.

[17] Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, et al. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(5): 709-721.

[18] 潘洪志, 荣胜忠, 邹立娜, 等. 中国常见动物性食品中嘌呤的含量[J]. 营养学报, 2012, 34(1): 74-78.

[19] 曲欣. 水产品中嘌呤含量分布及其在贮藏加工中变化规律的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

[20] 杨海斌. 各种肉类食物中嘌呤类物质的检测[D]. 太原: 山西医科大学, 2012.

[21] 全红娜, 金松子, 雷勇胜, 等. 反相高效液相色谱中流动相选择与优化的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(10): 1190-1194.

[22] 程庆红, 张颖, 孟凡艳, 等. 高效液相色谱法测定虾仁和牡蛎中嘌呤类物质[J]. 应用化工, 2013, 42(10): 1923-1926.

[23] 林先军, 李永仙, 李崎, 等. 反相离子对色谱法测定啤酒中的嘌呤类物质[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 219-222.

[24] 吕兵兵, 张进杰, 储银, 等. 反相高效液相色谱法检测带鱼糜中的嘌呤含量[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7): 192-198.

[25] Rong S, Zou L, Zhang Y, et al. Determination of purine contents in different parts of pork and beef by high performance liquid chromatography[J]. Food Chem, 2015, 170(5): 303-307.

[26] Fukuuchi T, Yasuda M, Inazawa K, et al. A simple HPLC method for determining the purine content of beer and beer-like alcoholic beverages[J]. Anal Sci, 2013, 29(5): 511-517.

[27] 黄向红, 孟红, 陈德文. 高效液相色谱法分离化妆品中 7 种限用色素[J]. 杭州化工, 2016, 46(1): 20-23.

[28] Li H. Determination of purines in beer by HPLC using a simple and rapid sample pretreatment[J]. J Am Soc Brew Chem, 2015, 73(2): 137-142.

[29] 邹学贤. 分析化学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 322.

[30] 陈月菊. 几种常见食用菌嘌呤含量测定及其加工中动态变化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

[31] 孙培龙, 吴学谦, 季培军, 等. 香菇及其他食用菌中香菇嘌呤含量的检测[J]. 食品工业科技, 2000, 21(1): 70-72.

[32] Chen G, Chu Q, Zhang L, et al. Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Anal Chim Acta, 2002, 457(2): 225-233.

收稿日期: 2017-10-23