

实验技术与方法

高效液相色谱法检测食品中嘌呤含量的方法研究

潘洪志^{1,2}, 荣胜忠², 邹立娜³, 王朝旭², 刘晓岑², 杨月欣¹

- (1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;
2. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081;
3. 牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要:目的 建立测定食品中嘌呤含量的高效液相色谱法。方法 采用不同浓度高氯酸溶液在 100 °C 下水解样品 60 min, 水解液过滤膜, 以 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (pH3.6)-甲醇 (99:1) 为流动相进行色谱分离, 色谱柱为 Waters Atlantis T3 (4.6 mm × 250 mm × 5 μm), 流速 1.0 ml/min; 柱温 30 °C; Waters 2487 型紫外检测器检测, 检测波长 254 nm; 进样量 10 μl。结果 在 0.05 ~ 20.00 μg/ml 浓度范围内, 各嘌呤的响应峰面积与其相应浓度呈良好相关性, $r > 0.9999$ 。方法回收率 93.1% ~ 101.3%, 相对标准偏差 < 12.5%。结论 本方法准确度高, 精密度好, 能够快速检测食品中 4 种主要的嘌呤成分。

关键词: 高效液相色谱法; 嘌呤; 食品

中图分类号: Q526.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)02-0124-04

Determination of purine in food by high performance liquid chromatography

Pan Hongzhi, Rong Shengzhong, Zou Lina, Wang Chaoxu, Liu Xiaocen, Yang Yuexin
(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the determination of four kinds of purine in food. **Methods** Food sample was hydrolyzed with perchloric acid at 100 °C for 60 min, and the hydrolyzate was filtrated with membrane. The chromatographic separation was achieved in Waters Atlantis T3 (4.6 mm × 250 mm × 5 μm) column by using 10 mmol/L formic acid amine solution (pH3.6) and CH₃OH (99:1) as mobile phase with a flow rate of 1.0 ml/min at 30 °C. The detection was performed under Waters 2487 UV detector at 254 nm with a injection volume of 10 μl. **Results** The HPLC response to these four kinds of purine was linear in the range of 0.05 – 20.00 μg/ml, $r > 0.9999$. The average recovery of standard addition was 93.1% – 101.3%, and relative standard deviation (RSD) was less than 12.5%. **Conclusion** The HPLC method for the determination of four kinds of major purine in food was fairly high in accurate and good sensitivity.

Key words: High performance liquid chromatography; purine; food

嘌呤为有机化合物,在人体内嘌呤氧化会变成尿酸,而尿酸过高就会引起痛风。痛风是长期嘌呤代谢障碍、血尿酸增高引起组织损伤的一种疾病^[1]。该病一般在男性身上发病,且会遗传。随着经济发展和人们膳食结构的改变,我国人群高尿酸血症和痛风的患病率呈直线上升趋势^[2-3]。在对痛风患者的治疗中,除药物治疗外,低嘌呤膳食是治疗该病的关键^[4-6]。

目前有很多关于食品中嘌呤含量的研究,但

是只集中在几种被普遍认为高嘌呤含量的食品上,且在我国食物成分表中,目前尚无食物中嘌呤含量的准确数据,临床及有关网站上公布的嘌呤含量数据普遍来源不清且彼此不一致,对嘌呤含量高低类别的划分标准也不尽相同,给广大痛风患者治疗时带来极大疑惑。因此对各类食品中嘌呤的含量进行测定对于指导痛风病人的临床饮食,对其康复和预防发病将有重要意义。嘌呤测定的常见方法主要有气相色谱法^[7]、高效液相色谱法^[8]、偶联酶催化分光光度法^[9]、质谱联用^[10]、毛细管电泳法^[11]等,其中高效液相色谱法为最常用的一种方法。本实验将通过高效液相色谱法对食品中鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤进行测定,建立高效、简单、准确、科学和经济的食品中嘌呤含量的测定方法,为痛风患者健康膳食提供指

收稿日期:2011-10-21

基金项目:达能营养中心 达能营养与宣教基金项目(DIC2008-002)

作者简介:潘洪志 男 博士 教授 研究方向为食品检测与功能食品 E-mail:panhongzhi@163.com

通信作者:杨月欣 女 研究员 教授 博士生导师 研究方向为食物营养 E-mail:yxyang@263.net

导依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪、Waters 2487 型紫外检测器(美国,Waters 公司),Waters Atlantis T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm)(美国,Waters 公司),注射器,酸度计,电子天平,超声振荡清洗仪等。

1.2 试剂

鸟嘌呤标准品(guanine),纯度≥98%;腺嘌呤标准品(adenine),纯度≥99%;次黄嘌呤标准品(hypoxanthine),纯度100%;黄嘌呤标准品(xanthine),纯度99%~100%;全部购自Sigma 公司。超纯水,甲醇(色谱纯),乙腈(HPLC 级)。甲酸铵、甲酸和氢氧化钾等为优级纯。

1.3 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis T3(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相:10 mmol/L 甲酸铵(pH3.6)-甲醇(99:1);流速1.0 ml/min;柱温30℃;进样量10 μl;检测波长254 nm。

1.4 样品前处理

取0.320 0~0.400 0 g 样品置于10 ml 玻璃试管中,向其中加入2.0 ml 不同浓度高氯酸溶液,快速混匀器混匀后100℃水浴60 min 后迅速冷却,2.0 mol/L 氢氧化钾调pH至7.0 后再用5.0% 甲酸调pH至3.6,10 mmol/L 甲酸铵溶液(pH3.6)定容至10 ml,充分混匀过0.22 μm 滤膜待测。

1.5 样品测定

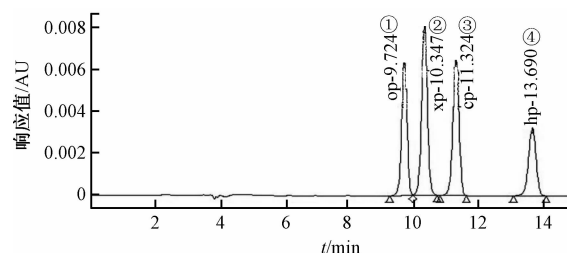
先分别注入10 μl 的标准系列(0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 和20.00 μg/ml),根据浓度与峰面积计算出标准曲线方程后再分别注入10 μl 处理后的样品溶液,将得到的峰面积带入标准曲线方程,从而得到各种嘌呤的含量,并计算总含量。

2 结果与分析

2.1 流动相的确定

流动相组分、流动相pH 和流速等对4 种嘌呤的分离效果均有一定的影响,其中流动相的pH 影响最大。将配制好的流动相(甲酸铵溶液)装入大烧杯中,用2.0 mol/L 的氢氧化钾和甲酸调pH 在3.2 到3.8 之间,对各不同值进行测试,比较各pH 流动相对嘌呤混标的分离情况。经多次测试比较,pH3.6 的甲酸铵溶液对4 种嘌呤的分离效果最好,所以确定以pH3.6 的甲酸铵溶液作为实验的流动相组分之一。4 种嘌呤组分的出峰顺序依次为鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤(图1)。

嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤(图1)。



①:鸟嘌呤;②:腺嘌呤;③:次黄嘌呤;④:黄嘌呤

图1 4 种嘌呤的标准色谱图

Figure 1 Standard chromatogram of four kinds of purine

2.2 保留时间的确定

分别向高效液相色谱仪中进入单一的标准品10 μl,以10 mmol/L 甲酸铵溶液和甲醇(99:1)为流动相,流速1.0 μl/min,测定各单一标准品的出峰时间,即为该标准品的保留时间。将混合标准品使用液稀释至1.0 μg/ml,吸取10 μl,按实验条件测定保留时间,从图1 可以看出,4 种嘌呤出峰情况良好,能够完全分离,依据每种嘌呤的保留时间能够很好地对所检测的物质进行定性。

2.3 样品水解条件的确定

食品中的嘌呤物质一般需先通过水解成游离碱基形式再进行分析。常见的水解方法有高氯酸100℃水解^[8],三氟乙酸:甲酸水解^[12-13],高氯酸超声,沸水浴以及甲醇超声等。本实验分别对以上水解方法进行了比较。结果表明,高氯酸100℃水解60 min 方法效果最好,不但使食品中嘌呤物质完全水解为游离碱基,而且对嘌呤碱基稳定性几乎没有影响。

2.4 线性范围

以各组分不同浓度混合标准品进行测定,记录色谱图。以峰面积(y)对其相应浓度(x)进行线性回归计算,获得标准曲线的回归方程,结果见表1。

表1 线性实验结果

Table 1 The results of linearity

嘌呤	线性方程	相关系数	线性范围(μg/ml)
鸟嘌呤	$y = 8E + 06x + 22736$	0.9999	0.05 ~ 20.00
腺嘌呤	$y = 1E + 07x - 4559$	0.9999	0.05 ~ 20.00
次黄嘌呤	$y = 1E + 07x - 73476$	0.9999	0.05 ~ 20.00
黄嘌呤	$y = 5E + 06x - 13242$	1.0000	0.05 ~ 20.00

2.5 精密度实验

分别选取不同浓度的标准品进行重现性实验,选取浓度分别为0.1、1.0 和10.0 μg/ml 的混合嘌呤标准品在批内和批间平行测定6 份,结果见表2。

由上述结果可以看出,RSD 在1.9%~12.5% 之间,平均<5.0%,可知该方法精密度高,重现性好,实验结果可信。

表2 精密度实验结果

Table 2 The results of precision test (n=6, %)

嘌呤	RSD		
	0.1 μg/ml	1.0 μg/ml	10.0 μg/ml
鸟嘌呤	7.0	3.4	3.4
腺嘌呤	5.8	3.9	2.8
次黄嘌呤	4.6	4.0	1.9
黄嘌呤	12.5	7.6	4.1

2.6 准确度

精密称取大米 0.400 0 g, 按其所含每种嘌呤量的 0.5 倍、1 倍和 2 倍加入各标准品溶液于均匀样品中配制成高(2:1)、中(1:1)和低(1:0.5) 3 种浓度, 混匀后 5 min 进行回收率实验, 经样品前处理后进样测定, 计算回收率, 每种浓度的样品平行测定 3 份取均值和标准差, 结果见表 3。

表3 回收率实验结果

Table 3 Results of recovery test (n=3)

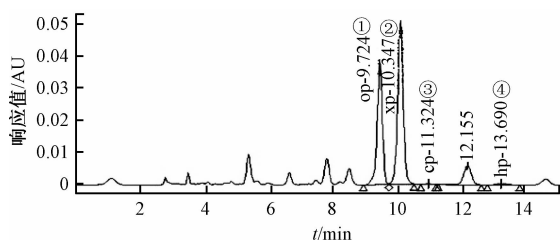
嘌呤	本底值(mg)	加标量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
鸟嘌呤	0.0525	0.0263	0.0781 ± 0.0033	97.3	101.3	4.6
		0.0525	0.1040 ± 0.0077	98.1		
		0.1050	0.1635 ± 0.0083	105.7		
腺嘌呤	0.0487	0.0244	0.0722 ± 0.0055	96.2	100.3	6.3
		0.0487	0.0962 ± 0.0062	97.6		
		0.0974	0.1536 ± 0.0143	107.7		
次黄嘌呤	0.0002	0.0001	0.0002 ± 0.00001	89.4	93.1	4.6
		0.0002	0.0004 ± 0.00004	91.7		
		0.0004	0.0006 ± 0.00005	98.3		
黄嘌呤	0.0077	0.0039	0.0074 ± 0.0005	90.5	95.4	4.8
		0.0077	0.0151 ± 0.0009	95.5		
		0.0155	0.0232 ± 0.0016	100.1		

2.7 方法应用

应用本方法分别对不同种类的动植物性食品进行了测定, 结果表明不同种类食品中嘌呤含量有很大差异, 动物性食品中嘌呤含量普遍高于植物性食品。动物性食品中海鲜(鱼、虾、贝等)及动物内脏类含量最高, 其次为肉类; 植物性食品中, 干豆类及其制品含量较高, 其次为菌类, 而大部分蔬菜和水果中含量普遍较低。

是用来测定化合物的组成、结构及含量的科学方法, 主要用于定性测定, 因本实验主要是对食品中嘌呤含量进行定量测定, 所以不宜选用质谱联用; 毛细管电泳同高效液相色谱法相比, 毛细管电泳法的进样精度比高效液相色谱法低, 同时对 4 种嘌呤的分离也不是很完全, 毛细管电泳定量方法的重现性受很多因素的影响, 如进样量、毛细管内壁的吸附和电压等。因此本实验选用高效液相色谱法对我国常见食品中的嘌呤含量进行了测定。

结果表明, 本实验建立的高效液相色谱法能够简单、快速、准确地对样品中的嘌呤含量进行测定。本方法线性范围广、准确度高、重现性好, 为测定食品中的嘌呤含量提供了有效的测定方法。



①: 鸟嘌呤; ②: 腺嘌呤; ③: 次黄嘌呤; ④: 黄嘌呤

图2 黄豆样品色谱图

Figure 2 Chromatogram of soybean sample

3 小结

气相色谱法是分离测定低沸点混合组分的重要方法, 而嘌呤属于高沸点有机物, 且气相色谱主要测定单一类型嘌呤含量, 所以本实验应用高效液相色谱法较好; 偶联酶催化分光光度法是建立在酶催化反应的基础之上, 主要用于在酶催化体系中对单一物质的定量检测, 因本研究主要针对 4 种嘌呤定量检测, 未涉及酶催化, 因此不宜使用; 质谱联用

参考文献

- [1] 张荣欣, 景洪江, 刘新焕, 等. 不同嘌呤含量饮食对老年高尿酸血症患者血尿酸水平和尿酸排泄的影响[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(1): 30-32.
- [2] 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]. 中华全科医师杂志, 2006, 5(4): 216-219.
- [3] 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.
- [4] 景君刚, 王芳霞, 温如玉. 低嘌呤膳食在痛风治疗中的价值[J]. 陕西医学杂志, 2003, 32(9): 839-841.
- [5] 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): 242-258.
- [6] CHOI H K, KARLSON E W. Purine-rich foods, dairy and

- protein intake, and the risk of gout in men[J]. N Engl J Med, 2004,350:1093-1103.
- [7] 张志宏,陈松康,林昕晨,等. GC 测定噻唑嘧啶中吡啶残留量[J]. 中国现代应用药学杂志,2008,25(6):540-542.
- [8] 李志良,张五九. 高效液相色谱法测定麦汁、发酵液和啤酒中的嘌呤含量[J]. 食品与发酵工业,2006,32:373-374.
- [9] 李忠琴,郭敏辰,许小平,等. 偶联酶催化分光光度法测定黄嘌呤[J]. 化学通报,2007,7:536-540.
- [10] PAOLA D, LUIGI M, LAURA D, et al. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils[J]. J Pharmaceut Biomed,2000,24(1):147-154.
- [11] 张书胜,陈勇,袁倬斌. 无环鸟苷和鸟嘌呤的高效毛细管电泳测定[J]. 分析化学,1996,24(10):1212-1215.
- [12] LOU S N, CHEN T Y. Studies on the analytical method of the purine contents in fishery products[J]. Food Sci,1997,24(1):1-11.
- [13] JOU J H, KER K C. The investigation of analytical method of purine content in high purine foods[J]. Nutr Sci J,1999,24(4):366-378.

实验技术与方法

固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法检测甘蔗中3-硝基丙酸的方法研究

李兵,吴国华,刘伟,赵旭东,赵海燕,薛颖,赵榕
(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 建立甘蔗中3-硝基丙酸的固相萃取-超高效液相色谱串联质谱检测方法。方法 样品经乙腈萃取, Sep-pak 氨基固相萃取柱净化,超高效液相色谱串联质谱法测定甘蔗中3-硝基丙酸含量。色谱柱为 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 柱(1.7 μm, 50 mm×2.1 mm),柱温 40 °C,样品温度 10 °C,进样体积 5 μl,流动相 A 为水,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱。结果 方法的线性范围为 4.0~40.0 μg/kg,基质加标工作曲线线性相关系数为 0.998。方法的定性检出限为 1.0 μg/kg,定量检出限为 4.0 μg/kg。高、中、低 3 个浓度水平的加标回收率为 92.5%~93.6%,相对标准偏差小于 10%。结论 本方法灵敏、快速、准确,可用于甘蔗中3-硝基丙酸的测定。

关键词:甘蔗;3-硝基丙酸;固相萃取;超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:TS242.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)02-0127-06

Detection of 3-nitropropionic acid in sugarcane by solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Li Bing, Wu Guohua, Liu Wei, Zhao Xudong, Zhao Haiyan, Xue Ying, Zhao Rong
(Beijing Centers for Diseases Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To establish a method for the detection of 3-nitropropionic acid in sugarcane by solid-phase extraction (SPE) coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by acetonitrile and cleaned up by Sep-pak NH₂ solid phase extraction column. The 3-nitropropionic acid was determined by UPLC-MS/MS. The chromatographic conditions; using Waters ACQUITY BEH C₁₈ column (1.7 μm, 50 mm×2.1 mm) with water as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B for gradient elution; keeping the column temperature at 40 °C and the samples at 10 °C with an injection volume of 5 μl. **Results** There was a good linearity of the calibration curve for 3-nitropropionic acid standard in the range of 4.0–40.0 μg/kg with correlation coefficient of 0.998. The detection limit of the method was 1.0 μg/kg and the limit of quantification was 4.0 μg/kg. The average recovery at three spiked levels was in the range of 92.5%–93.6%, and the relative standard derivation was lower than 10%. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate, which can be used in the detection of 3-nitropropionic acid in sugar cane.

Key words: Sugarcane; 3-nitropropionic acid; solid-phase extraction; UPLC-MS/MS

收稿日期:2011-07-25

作者简介:李兵 女 技师 研究方向为食品中污染物检测

通信作者:赵榕 女 副主任技师 研究方向为食品中污染物及营养成分检测 E-mail:lxue@yeah.net