

## 超高效液相色谱法检测 58 种大豆中的 4 种嘌呤化合物

孙玉凤, 黄亚涛, 刘佳萌, 贾东艳, 范蓓, 王凤忠\*

(中国农业科学院农产品加工研究所 农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室 北京 100193)

**摘要** 嘌呤化合物是大豆中重要的天然毒素,过量摄入会诱发高尿酸血症和痛风。为揭示嘌呤化合物在不同大豆中的含量水平,本文建立检测大豆中 4 种嘌呤化合物的超高效液相色谱法,并对我国 58 种主栽大豆中 4 种嘌呤化合物——鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤的含量进行检测。结果表明,该方法在线性范围(0.2~10 mg/L)线性关系良好( $R^2>0.9995$ ),检出限为 0.0412~0.1001 mg/L,精密性 RSD 小于 0.6000%,腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤 RSD 值依次为 1.1103%,1.0728%,1.3762%,0.9457%,4 种嘌呤化合物加标回收率在 92.5902%~100.1373%之间。试验确定了理想的提取溶剂(等体积三氟乙酸、甲酸溶液)及水解时间(30 min)。不同大豆品种中嘌呤含量为高蛋白品种>常规品种>高油、蛋脂双高品种,无腥大豆品种中嘌呤含量差异较大(2 013.06~2 824.54 mg/kg)。

**关键词** 大豆; 嘌呤化合物; 超高效液相色谱法; 检测

文章编号 1009-7848(2023)06-0304-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.06.031

大豆是豆科、蝶形花亚科、大豆属植物,古代称“菽”,在我国已有 5 000 多年的栽培历史。大豆在我国各地均有栽培,品种丰富,至今为止资源库中已保有 30 000 多个大豆种质<sup>[1]</sup>。大豆富含多种营养物质及功能因子,是我国重要的粮食、油料及饲料来源。大豆中同时存在天然毒素嘌呤化合物,它是一种含氮杂环类有机化合物,由鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤组成。嘌呤化合物代谢的最终产物为尿酸,由肠黏膜吸收进入体液后随尿液排出,人体中尿酸过高可诱发痛风<sup>[2]</sup>。医学界普遍认为痛风病人不宜摄入大豆食品。一项对亚太地区的医学工作者的调查显示,48%的医学工作者认为摄入大豆会导致痛风<sup>[3]</sup>。明确大豆中嘌呤化合物的含量,可为大豆加工及消费提供科学指导。

目前研究人员采用多种前处理方法和检测手段对嘌呤化合物进行定量研究,嘌呤检测中样品前处理方法主要有酸解提取法、溶剂提取法、柱萃取、膜萃取、离子交换柱纯化法和超声提取法等<sup>[4]</sup>。常用的检测方法为反相离子对色谱法<sup>[5]</sup>、高效液相

色谱法<sup>[6-9]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[10]</sup>等。在对大豆嘌呤化合物的检测中,大多数只针对某一品种,尚未对多种大豆资源的嘌呤化合物进行比较研究。本研究探讨大豆中嘌呤化合物的色谱分离条件及提取条件,建立大豆中嘌呤化合物含量检测的超高效液相色谱法,以完善我国不同大豆主栽品种的嘌呤化合物数据,为大豆加工的品种选用及合理膳食提供参考。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与试剂

大豆样品:58 种大豆样品均由大豆产业技术体系试验站提供,样品经过粉碎机粉碎后,4℃保存备用。

标准品:腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤(色谱纯,纯度 $\geq 99.0\%$ ),上海安普实验科技股份有限公司;甲醇、甲酸、磷酸二氢钾、磷酸、高氯酸、三氟乙酸(均为色谱纯),国药集团化学试剂有限公司;甲酸铵(色谱纯),Sigma-Aldrich 公司。

#### 1.2 仪器及设备

超高效液相色谱仪(Acquity UPLC)、色谱柱(Acquity UPLC<sup>®</sup> HSS T3)(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8  $\mu$ m),美国沃特世公司;电子天平(MS105DU)、pH 计(Mettler Toledo),瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;超纯水系统(Milli-QAdvan-

收稿日期:2022-06-09

基金项目:国家大豆产业技术体系岗位科学家项目(CARS-04-PS29);山东省重点研发计划项目(2022 CXGC010602)

第一作者:孙玉凤,女,博士,副研究员

通信作者:王凤忠 E-mail:wangfengzhong@sina.com

tageA10),香港力康生物医疗技术控股集团;超声波清洗器(KQ-600DE),昆山超声仪器有限公司;恒温水浴锅(DK-8D型),上海一恒科技有限公司;SHB-III型循环水式真空抽滤装置,巩义市予华仪器有限责任公司;氮吹仪(TTL-DC II型),北京同泰联科技发展有限公司;0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,天津市科亿隆实验设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件的优化

1.3.1.1 流动相的选择 色谱柱为Acquity U-PLCHSS T3(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8  $\mu\text{m}$ ),流动相分别为0.02 mol/L的磷酸二氢钾(pH=3.40)和0.01 mol/L的甲酸铵(pH=3.40),进样量1  $\mu\text{L}$ ,柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速为0.1 mL/min,检测波长为254 nm,探究磷酸二氢钾流动相和甲酸铵流动相对4种嘌呤化合物的分离效果。

1.3.1.2 pH值的选择 确定流动相为0.01 mol/L甲酸铵后,分别设置pH=3.30,3.40,3.50,3.60 4个组,进样量1  $\mu\text{L}$ ,柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速为0.1 mL/min,检测波长为254 nm,探究不同pH值对4种嘌呤化合物的分离效果。

#### 1.3.2 嘌呤化合物提取条件的优化

1.3.2.1 提取溶剂的选择 选取以下两种提取溶液,探究不同提取溶剂对4种嘌呤化合物的提取效果。

A:三氟乙酸:甲酸( $V:V=1:1$ )混合溶液。

按以下步骤操作:准确称取冀豆16号、冀黑豆1号大豆粉末0.100 g,分别置于10 mL玻璃试管中,向其中加入1 mL水混匀,再加入1 mL酸液,混匀后置于沸水浴水解30 min,立即冷却,氮吹至体积约为0.5 mL,加水4 mL后,用15 mol/L KOH溶液调节pH值至3.4,以5 000 r/min转速离心20 min,取上清定容至5 mL,过0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,备用。

B:6%高氯酸溶液。

按以下步骤操作:准确称取冀豆16、冀黑豆1号大豆粉末0.100 g,分别置于10 mL玻璃试管中,向其中加入2 mL 6%高氯酸,混匀,沸水浴水解30 min,立即冷却,用15 mol/L氢氧化钾溶液调节pH值至3.4,以5 000 r/min转速离心20 min,

取上清定容至5 mL,过0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,备用。

1.3.2.2 水解时间的选择 以冀豆16号和冀黑豆1号为对象,操作步骤同1.3.2.1节A,沸水浴中水解时间分别调整为15,30,60 min,探究不同水解时间对4种嘌呤化合物的提取效果。

1.3.3 标准曲线的制备 配制250 mg/L鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤单一标准储备液,吸取各嘌呤单一标准储备液1 mL于5 mL容量瓶中,用纯水定容至刻度,配制成50 mg/L的混合中间液。准确移取0.04,0.08,0.2,0.4,0.8,2 mL混合中间液至6个10 mL棕色容量瓶,用超纯水定容至刻度,配制为0.2,0.4,1.0,2.0,4.0,10 mg/L的系列梯度溶液,过0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,用已确定的最佳色谱方法进行超高效液相色谱分析。以峰面积( $Y$ )及样品质量浓度( $X$ )作标准曲线,以3倍信噪比( $S/N$ )所对应的浓度为检出限(LOD)。

#### 1.3.4 方法性能研究

1.3.4.1 精密性检验 按照1.3.3节所述方法,选取一个浓度标准样品(4.0 mg/L)用已确定的最佳色谱方法连续进样5次,分别对鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤的峰面积进行测定,然后计算其相对标准偏差值(RSD)。

1.3.4.2 重复性检验 选取冀豆16大豆粉末样品6份,分别称取0.100 g,按照确定的最佳嘌呤提取方法处理,将6份处理的样品进行超高效液相色谱分析,色谱条件同1.3.1节所述,根据测定量计算其相对标准偏差(RSD)。

1.3.4.3 加标回收率检验 分别称取冀豆16大豆粉末样品12份,每份0.100 g,按照确定的最佳嘌呤提取方法处理,将12份处理的样品进行超高效液相色谱分析,色谱条件同1.3.1节所述。之后,按每种嘌呤含量的0.5,1,2倍加入嘌呤标品,配制成低、中、高3个浓度,上机检测。每个样品测定3次,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。

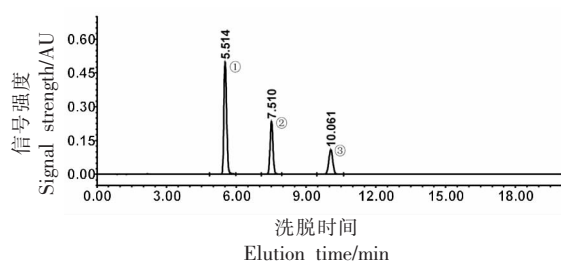
1.3.4.4 58种大豆中4种嘌呤化合物含量的测定 准确称58种大豆粉末0.100 g,按照确定的最佳嘌呤提取方法处理,将处理的样品进行超高效液相色谱分析,色谱条件同1.3.1节所述,每个样品测定3次,分析58种大豆样品中嘌呤化合物的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 优化的色谱条件

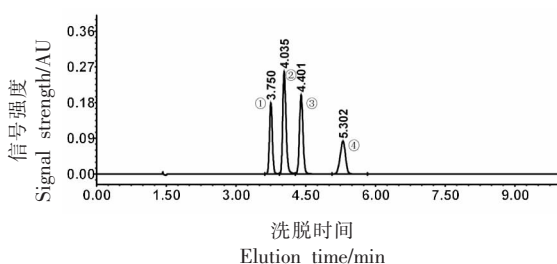
采用 0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH=3.40) 和 0.01 mol/L 甲酸铵 (pH=3.40) 分别作为流动相, 探究流动相种类对 4 种嘌呤化合物的分离效果。当以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH=3.40) 为流动相时,

结果如图 1a 所示, 无法分离 4 种嘌呤化合物, 鸟嘌呤与腺嘌呤出峰时间重叠。当以 0.01 mol/L 甲酸铵 (pH=3.40) 为流动相时, 结果如图 1b 所示, 4 种嘌呤化合物都能得到较好的分离, 峰形也比较好的, 没有拖尾现象, 因此, 判定此流动相适合多组分嘌呤化合物的分离。



注: ①鸟嘌呤和腺嘌呤重合; ②次黄嘌呤; ③黄嘌呤。

(a) 流动相为磷酸二氢钾



注: ①鸟嘌呤; ②腺嘌呤; ③次黄嘌呤; ④黄嘌呤。

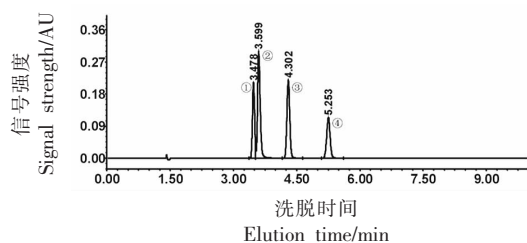
(b) 流动相为甲酸铵

图 1 流动相的种类对 4 种嘌呤分离效果的影响

Fig.1 Influence of mobile phase types on purine separation effect of four kinds

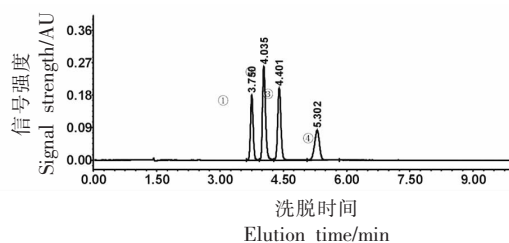
采用 pH 值分别为 3.30, 3.40, 3.50, 3.60 的 0.01 mol/L 甲酸铵为流动相, 探究不同 pH 值对 4 种嘌呤化合物的分离效果, 结果如图 2 所示。试验表明, 流动相的 pH 值对 4 种嘌呤化合物的分离度和峰形均存在较大影响, 流动相的 pH 值过高

或过低均不利于 4 种嘌呤化合物的分离。当 pH 值为 3.30 时, 鸟嘌呤和腺嘌呤分离度小于 0 (图 2a)。当 pH 值为 3.40 时, 鸟嘌呤和腺嘌呤分离度达到 1.78 (图 2b), 分离度较好, 4 种嘌呤分离度均符合要求。当 pH 值继续升高达到 3.50 时, 黄嘌呤



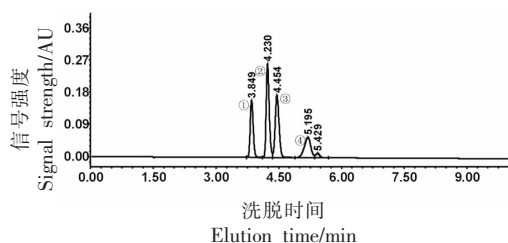
注: ①鸟嘌呤; ②腺嘌呤; ③次黄嘌呤; ④黄嘌呤。

(a) pH 3.30



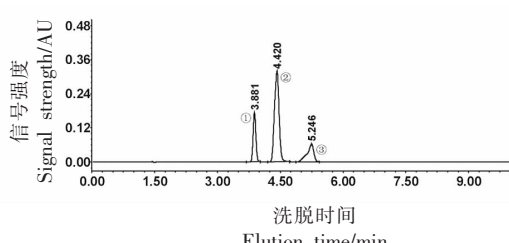
注: ①鸟嘌呤; ②腺嘌呤; ③次黄嘌呤; ④黄嘌呤。

(b) pH 3.40



注: ①鸟嘌呤; ②腺嘌呤; ③次黄嘌呤; ④黄嘌呤。

(c) pH 3.50



注: ①鸟嘌呤; ②腺嘌呤和次黄嘌呤重合; ③黄嘌呤。

(d) pH 3.60

图 2 流动相 pH 值对 4 种嘌呤分离效果的影响

Fig.2 Influence of pH value of mobile phase on the separation effect of four purines

出现异峰(图 2c)。继续调节 pH 值至 3.60 时,只分离出 3 个峰,腺嘌呤和次黄嘌呤未被分开,合并成一个峰,且黄嘌呤峰形呈现前沿峰(图 2d)。综上所述,本研究选用 pH 值为 3.40 的 0.01 mol/L 甲酸铵溶液作为最佳流动相。

## 2.2 优化的嘌呤化合物提取条件

2.2.1 选择的提取溶剂 嘌呤化合物在食物中主要以结合态形式存在,在测定嘌呤化合物含量时要将其水解成 4 种游离嘌呤碱基再测定<sup>[11]</sup>。提取

嘌呤的方法主要有酸解提取法、柱萃取、膜萃取法等,其中最常用的是酸解提取法,而酸解提取法中最常用的酸主要是高氯酸<sup>[12]</sup>和三氟乙酸甲酸混合溶液<sup>[13]</sup>两种。不同酸解提取法对嘌呤含量测定的影响如何,至少少有报道。本研究选用三氟乙酸:甲酸( $V:V=1:1$ )混合溶液及 6%高氯酸溶液作为提取溶剂,分别对冀豆 16 号和冀黑豆 1 号进行嘌呤化合物提取,并通过超高效液相色谱进行测定,结果如表 1 所示。

表 1 不同提取溶剂测定结果( $n=3$ )

Table 1 Determination results of different extraction solvents ( $n=3$ )

样品名称	组分	测定值/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		A 组/B 组
		A 组 [三氟乙酸:甲酸( $V:V=1:1$ )混合溶液]	B 组 (6%高氯酸溶液)	
冀豆 16 号	鸟嘌呤	1 167.15	919.10	1.27
	腺嘌呤	626.03	499.35	1.25
	黄嘌呤	22.32	17.45	1.28
	次黄嘌呤	12.03	2.95	4.08
	总嘌呤	1 827.53	1 438.85	1.27
冀黑豆 1 号	鸟嘌呤	1 456.28	1 200.9	1.21
	腺嘌呤	761.03	627.85	1.21
	黄嘌呤	32.25	23.87	1.35
	次黄嘌呤	17.85	4.25	4.20
	总嘌呤	2 267.41	1 856.87	1.22

由表 1 可知,用三氟乙酸:甲酸( $V:V=1:1$ )混合溶液作为提取溶剂时,冀豆 16 号和冀黑豆 1 号中 4 种嘌呤化合物含量测定值显著高于 6%高氯酸溶液提取组,其中,次黄嘌呤使用前者条件提取后的测定值是后者的 4 倍以上,鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤使用前者条件提取后的测定值是后者的 1.21~1.35 倍,总嘌呤使用前者条件提取后的测定值是后者的 1.22~1.27 倍。虽然高氯酸水解法操作简单、成本低,但是高浓度的高氯酸会降解嘌呤化合物,造成测定结果偏低<sup>[14]</sup>。三氟乙酸和甲酸易挥发,经过氮吹后可除去大部分酸,降低样液中盐浓度,水解效果好,嘌呤损失小<sup>[12]</sup>。因此,本研究选择三氟乙酸:甲酸( $V:V=1:1$ )混合溶液作为最佳提取溶剂。

2.2.2 选择的水解时间 在样品前处理方法中,前人对嘌呤化合物的水解温度做了大量研究,结

果表明嘌呤化合物的最佳水解温度为 100 °C<sup>[15-17]</sup>,在水解时间上,刘镇等<sup>[15]</sup>选用 30 min 水解酿造黄酒用粮食原料中的嘌呤,毛玉涛等<sup>[18]</sup>选用 60 min 水解豆浆中嘌呤。为确定嘌呤化合物最佳水解时间,本研究以冀豆 16 号和冀黑豆 1 号为对象,分别设置了 15,30 和 60 min 进行水解处理,其它操作步骤按照 1.3.1 节所述进行,并通过超高效液相色谱进行测定,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,水解时间为 30 min 时,冀豆 16 号和冀黑豆 1 号中 4 种嘌呤化合物含量测定值显著高于 15 min 组和 60 min 组,表明水解时间在 15~60 min 之内,随着时间的延长,样品中鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤的含量均随水解时间的延长呈现低-高-低的趋势,说明水解时间过短或过长都会对大豆中嘌呤化合物含量测定值产生影响。水解时间过短会导致嘌呤化合物从结合态向

游离态转化不彻底或未转化,水解时间过长会引起游离态的嘌呤化合物发生降解,导致测定结果

偏低。因此,本研究选择 30 min 作为嘌呤化合物最佳水解时间。

表 2 不同水解时间测定结果( $n=3$ )

Table 2 Determination results of different water bath times ( $n=3$ )

样品名称	组分	测定值/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
		15 min	30 min	60 min
冀豆 16 号	鸟嘌呤	1 114.40	1 167.15	1 103.07
	腺嘌呤	594.60	626.03	618.85
	黄嘌呤	ND	22.32	ND
	次黄嘌呤	ND	12.03	ND
	总嘌呤	1 709.00	1 827.53	1 721.92
冀黑豆 1 号	鸟嘌呤	1 379.18	1 456.28	1 342.83
	腺嘌呤	709.20	761.03	710.32
	黄嘌呤	3.90	32.25	ND
	次黄嘌呤	ND	17.85	ND
	总嘌呤	2 092.28	2 267.41	2 053.15

注:ND 代表未检测出嘌呤含量。

### 2.3 标准曲线

按照确定的最佳超高效液相色谱条件,将配置好的嘌呤混合标准梯度溶液检测,以峰面积( $Y$ )及样品质量浓度( $X$ )作标准曲线,线性关系及检出

限结果见表 3。4 种嘌呤化合物在 0.2~10 mg/L 质量浓度范围线性关系良好,相关系数( $R^2$ )均在 0.9995 以上。检出限在 0.0412~0.1001 mg/L 之间,灵敏度较高,可以满足试验的要求。

表 3 嘌呤化合物标准曲线结果

Table 3 Result of purine standard curve

组分	回归方程	相关系数( $R^2$ )	检出限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
鸟嘌呤	$y=4.18\times 10^4 X-2.69\times 10^4$	$R^2=0.9996$	0.0501	0.2~10
腺嘌呤	$y=5.46\times 10^4 X-5.64\times 10^3$	$R^2=0.9999$	0.0412	0.2~10
黄嘌呤	$y=3.10\times 10^4 X-2.32\times 10^4$	$R^2=0.9996$	0.1001	0.2~10
次黄嘌呤	$y=4.01\times 10^4 X+3.19\times 10^2$	$R^2=0.9999$	0.0507	0.2~10

### 2.4 方法性能研究

2.4.1 方法精密性 相对标准偏差结果见表 4,相对标准偏差均小于 0.6000%,表明本研究建立

的超高效液相色谱检测方法精密度良好,重现性高,可应用于样品检测。

表 4 精密性结果

Table 4 Result of precision

组分	测定值/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$						相对标准偏差 RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
鸟嘌呤	3.6657	3.6572	3.6893	3.6404	3.6953	3.6665	0.5556
腺嘌呤	4.0813	4.1005	4.1251	4.0633	4.0716	4.1101	0.5834
黄嘌呤	3.8089	3.8144	3.8356	3.8273	3.8059	3.8206	0.2966
次黄嘌呤	3.9096	3.9231	3.9177	3.9304	3.9143	3.9293	0.2125

2.4.2 方法重复性 按照确定的最佳提取条件及色谱条件对冀豆 16 大豆粉末样品中的嘌呤化合

物进行提取和测定,结果显示:鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤含量的相对标准偏差分别为 1.1103%,

1.0728%, 1.3762%, 0.9457%, 表明重复性较好。

2.4.3 加标回收率 加标回收试验结果见表 5, 鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤平均回收率分

别为 96.6225%, 100.1373%, 93.4343%, 92.5926%, 说明采用本研究确定的最佳提取条件可有效保留嘌呤化合物, 减少样品中嘌呤化合物的损失。

表 5 加标回收试验结果 (n=3)

Table 5 Recovery rates of samples with added specimen (n=3)

组分	本底值/mg	加标量/mg	测定值/mg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
鸟嘌呤	0.1165	0.0583	0.1741	98.7993	0.9112	96.6225
	0.1164	0.1164	0.2311	98.5395	0.9738	
	0.1160	0.1740	0.277	92.5287	0.9561	
腺嘌呤	0.0621	0.0310	0.0925	98.0645	0.9688	100.1373
	0.0624	0.0624	0.1254	100.9615	1.0012	
	0.0625	0.0938	0.1576	101.3859	1.0357	
黄嘌呤	0.0021	0.0011	0.0031	90.9091	0.8795	93.4343
	0.0022	0.0022	0.0043	95.4545	0.8993	
	0.0022	0.0033	0.0053	93.9394	1.3257	
次黄嘌呤	0.0011	0.006	0.0066	91.6667	1.1310	92.5926
	0.0012	0.0012	0.0023	91.6667	1.1105	
	0.0012	0.0018	0.0029	94.4444	1.0988	

## 2.5 大豆样品检测结果与分析

按照确定的最佳提取条件及色谱条件, 对我国不同主栽品种共计 58 种大豆中嘌呤化合物进

行提取和测定, 每种样品平行测定 3 次, 结果见表 6。

表 6 大豆样品中 4 种嘌呤化合物的含量 (mg/kg)

Table 6 The contents of four kinds of purine in soybean samples (mg/kg)

序号	样品名称	类型	鸟嘌呤	腺嘌呤	黄嘌呤	次黄嘌呤	总嘌呤
1	绥农 14	常规	1 257.35 ± 1.52	740.65 ± 1.33	ND	3.33 ± 0.19	2 001.33
2	绥农 42	常规	1 192.80 ± 1.33	696.00 ± 1.31	288.80 ± 2.22	13.70 ± 0.21	2 191.30
3	绥农 44	常规	1 154.25 ± 1.26	624.70 ± 1.25	271.00 ± 2.10	ND	2 049.95
4	绥农 52	常规	1 107.40 ± 1.31	712.40 ± 1.62	320.35 ± 2.03	12.35 ± 0.09	2 152.50
5	绥农 26	高油	1 034.70 ± 1.08	607.95 ± 1.66	295.75 ± 1.97	11.80 ± 0.26	1 950.20
6	绥农 71	高蛋白	1 315.15 ± 1.12	756.45 ± 1.25	262.30 ± 1.85	ND	2 333.90
7	绥农 76	高蛋白	1 273.00 ± 1.16	710.85 ± 1.85	306.00 ± 2.11	12.40 ± 0.18	2 302.25
8	绥农 94	高蛋白	1 283.65 ± 1.02	721.75 ± 1.62	297.60 ± 2.01	11.75 ± 0.12	2 314.75
9	绥无腥豆	无腥	1 320.18 ± 2.31	692.88 ± 1.94	ND	ND	2 013.06
10	东农 56	常规	1 158.70 ± 1.51	728.35 ± 1.75	329.60 ± 1.26	ND	2 216.65
11	东农 55	高蛋白	1 367.45 ± 1.22	791.75 ± 1.62	203.75 ± 1.12	ND	2 362.95
12	吉育 41	高油	1 170.70 ± 1.23	691.13 ± 1.25	ND	0.95 ± 0.04	1 862.78
13	吉育 95	高油	1 185.33 ± 1.35	757.10 ± 1.33	ND	2.68 ± 0.02	1 945.11
14	吉育 203	高油	1 132.08 ± 1.36	692.50 ± 1.62	ND	4.23 ± 0.01	1 828.80
15	吉育 86	高油	1 253.73 ± 1.06	676.30 ± 1.54	ND	6.58 ± 0.02	1 936.61
16	吉育 508	高油	1 226.03 ± 2.21	709.58 ± 1.32	ND	6.50 ± 0.04	1 942.11
17	吉育 202	高油	1 123.03 ± 2.26	621.03 ± 1.66	ND	7.60 ± 0.10	1 751.66
18	吉育 402	高油	1 127.05 ± 2.05	613.70 ± 1.57	ND	5.88 ± 0.04	1 746.63

(续表 6)

序号	样品名称	类型	鸟嘌呤	腺嘌呤	黄嘌呤	次黄嘌呤	总嘌呤
19	辽豆 15	常规	1 461.03 ± 2.31	782.33 ± 1.58	ND	ND	2 243.36
20	辽豆 32	高油	1 258.48 ± 2.16	673.03 ± 1.62	ND	ND	1 931.51
21	辽豆 59	高油	1 257.23 ± 2.24	682.88 ± 1.73	ND	ND	1 940.11
22	蒙豆 13	常规	1 445.58 ± 2.52	756.48 ± 1.25	ND	ND	2 202.06
23	蒙豆 1137	常规	1 468.58 ± 2.67	800.90 ± 1.33	ND	15.15 ± 0.20	2 284.63
24	蒙豆 359	高油	1 228.18 ± 2.82	771.28 ± 1.52	ND	ND	1 999.46
25	赤豆 3 号	常规	1 433.65 ± 2.35	830.68 ± 1.62	19.88 ± 0.63	ND	2 284.21
26	赤豆 4 号	高油	1 207.35 ± 2.11	697.88 ± 1.46	18.05 ± 0.25	ND	1 923.28
27	赤豆 5 号	高油	1 250.45 ± 2.01	749.50 ± 1.85	ND	ND	1 999.95
28	冀豆 24	常规	1 150.45 ± 1.06	661.45 ± 1.02	293.95 ± 2.11	ND	2 105.85
29	冀黑豆 1 号	常规	1 349.21 ± 1.27	758.01 ± 1.09	31.52 ± 1.20	17.79 ± 0.32	2 156.53
30	冀豆 16	蛋脂双高	1 175.15 ± 1.26	633.03 ± 1.12	22.56 ± 1.23	12.39 ± 0.21	1 843.13
31	冀 nf58	高油	1 220.28 ± 1.31	756.58 ± 1.19	14.68 ± 1.16	ND	1 991.54
32	冀豆 17	高油	1 279.13 ± 1.25	702.38 ± 1.21	16.38 ± 1.13	ND	1 997.89
33	冀豆 19	高油	1 274.13 ± 1.64	725.73 ± 1.31	ND	ND	1 999.86
34	冀豆 12	高蛋白	1 550.90 ± 1.58	783.70 ± 1.52	ND	ND	2 334.60
35	冀豆 15	高蛋白	1 547.85 ± 1.27	764.75 ± 1.36	ND	ND	2 312.60
36	冀豆 20	高蛋白	1 529.95 ± 1.29	833.83 ± 1.25	ND	7.98 ± 0.13	2 371.76
37	冀豆 23	高蛋白	1 643.73 ± 1.35	902.38 ± 0.95	ND	2.23 ± 0.10	2 548.34
38	五星 1 号	无腥	1 370.38 ± 2.67	782.38 ± 0.65	9.55	ND	2 162.31
39	五星 2 号	无腥	1 465.18 ± 2.61	809.18 ± 0.71	ND	ND	2 274.36
40	五星 3 号	无腥	1 511.18 ± 2.25	914.90 ± 0.92	230.43 ± 2.11	168.03 ± 0.32	2 824.54
41	石豆 11	高蛋白	1 470.63 ± 2.61	844.28 ± 0.84	ND	ND	2 314.91
42	汾豆 92	常规	1 350.25 ± 2.34	706.40 ± 1.20	ND	ND	2 056.65
43	汾豆 93	高油	1 263.28 ± 2.52	683.90 ± 1.22	4.15 ± 0.22	ND	1 951.33
44	皖豆 33	常规	1 347.90 ± 2.62	735.75 ± 0.87	ND	ND	2 083.65
45	皖豆 39	常规	1 338.68 ± 2.36	706.50 ± 0.92	10.90 ± 0.13	ND	2 056.08
46	皖豆 38	高蛋白	1 486.00 ± 2.61	819.80 ± 1.12	0.45 ± 0.01	ND	2 306.25
47	徐豆 18	常规	1 423.48 ± 2.84	763.85 ± 1.35	22.10 ±	ND	2 209.43
48	徐豆 20	常规	1 322.50 ± 2.85	801.08 ± 1.69	ND	6.93 ± 0.22	2 131.50
49	桂春 8 号	常规	1 293.73 ± 2.93	717.30 ± 1.32	23.98 ± 0.21	ND	2 035.01
50	桂春 15 号	蛋脂双高	1 102.18 ± 2.77	625.03 ± 1.54	17.58 ± 0.16	ND	1 744.79
51	南夏豆 25	高蛋白	1 564.95 ± 2.56	782.18 ± 1.28	ND	ND	2 347.13
52	中黄 301	常规	1 385.53 ± 2.66	744.88 ± 1.06	ND	6.75 ± 0.12	2 137.16
53	中黄 302	常规	1 418.85 ± 2.51	845.30 ± 0.98	ND	6.50 ± 0.21	2 270.65
54	中黄 902	常规	1 464.20 ± 2.21	816.10 ± 0.97	ND	6.55 ± 0.11	2 286.85
55	中黄 911	常规	1 478.13 ± 2.11	805.60 ± 1.21	ND	6.20 ± 0.15	2 289.93
56	中黄 901	高油	1 191.45 ± 2.26	787.03 ± 1.06	ND	6.80 ± 0.17	1 985.28
57	中黄 909	高油	1 203.58 ± 2.45	724.45 ± 1.52	ND	5.95 ± 0.05	1 933.98
58	中黄 76	高油	1 071.23 ± 2.16	667.05 ± 0.93	ND	7.60 ± 0.36	1 745.88

注:ND 代表未检测出嘌呤含量。

由表 6 可知,所有大豆样品嘌呤含量中,鸟嘌呤含量最高,其次为腺嘌呤,黄嘌呤及次黄嘌呤在有的大豆品种未检出,这与刘少林等<sup>[19]</sup>的研究结

果一致。不同品种大豆中嘌呤含量差异较大,嘌呤含量在 1 745.88~2 824.54 mg/kg 之间,高蛋白大豆品种中嘌呤含量高于 2 300 mg/kg,其中冀豆 23 嘌

呤含量高达 2 548.34 mg/kg; 常规大豆品种中嘌呤含量在 2 000~2 300 mg/kg 之间; 高油、蛋脂双高大豆品种中嘌呤含量低于 2 000 mg/kg, 其中中黄 76 嘌呤含量最低, 为 1 745.88 mg/kg; 无腥大豆品种中嘌呤含量差异较大, 绥无腥豆、五星 1 号、五星 2 号、五星 3 号嘌呤含量分别为 2 013.06, 2 162.31, 2 274.36, 2 824.54 mg/kg。

Kaneko 等<sup>[8]</sup>测定了包括豆类及豆制品在内的 270 种食品中嘌呤含量, 根据嘌呤含量将食品划分为 5 组, 即极低组 (<500 mg/kg)、低组 (500~1 000 mg/kg)、中组 (1 000~2 000 mg/kg)、高组 (2 000~3 000 mg/kg)、超高组 (>3 000 mg/kg), 由此判断, 大豆介于嘌呤含量中组和高组。在明确大豆品种嘌呤含量的基础上, 选择适当类型的大豆品种, 结合加工工艺<sup>[20-23]</sup>, 可以更好地生产出适宜不同人群的大豆制品。

### 3 结论

超高效液相色谱法具有灵敏度高、分析速度快等优点, 本文建立了检测大豆中 4 种嘌呤化合物的超高效液相色谱法, 选用 Acquity UPLC®HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm) 为色谱柱, 以 0.01 mol/L pH 值为 3.40 的甲酸铵溶液为流动相, 流速为 0.1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 1 μL, 检测波长为 254 nm, 检测大豆中腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤。经方法学验证, 此方法在线性范围 (0.2~10 mg/L) 线性关系良好 ( $R^2 > 0.9995$ ), 方法检出限为 0.0412~0.1001 mg/L, 方法精密度 RSD 小于 0.6000%, 重复性试验结果表明腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤 RSD 值依次为 1.1103%, 1.0728%, 1.376%, 0.9457%。4 种嘌呤化合物加标回收率在 92.5926%~100.1373% 之间, 适用于大豆中 4 种嘌呤化合物的测定。本文还研究比较确定了理想的提取溶剂为三氟乙酸: 甲酸 (V:V=1:1) 混合溶液, 理想的水解时间为 30 min。应用此方法测定的我国部分大豆主栽品种中嘌呤化合物含量数据显示, 不同大豆品种中嘌呤含量: 高蛋白品种 > 常规品种 > 高油、蛋脂双高品种, 无腥大豆品种中嘌呤含量差异较大, 该研究结论可为大豆加工及消费提供科学指导。

### 参 考 文 献

- [1] LUK A J, SIMKIN P A. Epidemiology of hyperuricemia and gout [J]. American Journal of Managed Care, 2005, 11(15): 465-468.
- [2] 刘美超. 食用菌嘌呤含量的测定及平菇脱嘌呤方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.  
LIU M C. Determination of purine content in edible mushrooms and study of purine removal method in flat mushrooms[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [3] FALASCA G F. Metabolic diseases: Gout [J]. Clin Dermatol, 2006, 24(6): 498-508.
- [4] 蔡路昀, 冷丽萍, 曹爱玲, 等. 食品中嘌呤含量分布研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(5): 74-81.  
CAI L Y, LENG L P, CAO A L, et al. Research progress of purine content distribution in food [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(5): 74-81.
- [5] 何焯, 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.  
HE X, CHEN J B, LIU H J, et al. Study on purification of purines in beer and determination of purines compounds by reversed-phase ion pair chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(9): 420-422.
- [6] 崔素萍, 车康, 谢微, 等. 高效液相色谱测定脱脂豆粕中嘌呤含量[J]. 中国食品学报, 2014, 14(7): 224-229.  
CUI S P, CHE K, XIE W, et al. Determination of purines in defatted soybean by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(7): 224-229.
- [7] 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.  
YANG H B, ZHANG J L, LIU G Y, et al. Study on the contents and distribution of purines and uric acid in different tissues of chickens and ducks [J]. ACTA Nutrimenta SINICA, 2013, 35(5): 505-507.
- [8] 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.
- [9] 李婷婷, 任丽琨, 王当丰, 等. 高效液相色谱法测定海水鱼中嘌呤含量[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 10.
- LI T T, REN L K, WANG D F, et al. Determination of purines content of sea fish by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 10.
- [10] 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.
- XIA X L, XIA M F, YANG H L, et al. LC-MS/MS analysis of purine content in light Chinese rice wine [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(12): 1399-1402.
- [11] JANKOWSKA D A, TRAUTWEIN -SCHULT A, CORDES A, et al. A novel enzymatic approach in the production of food with low purine content using *Arxula adeninivorans* endogenous and recombinant purine degradative enzymes[J]. *Bioengineered*, 2015, 6(1): 20-25.
- [12] 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.
- LIU G Y, YANG H B, ZHANG J L. High performance liquid chromatography determination of purines in mushroom foods [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2012, 28(4): 554-555.
- [13] 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(3): 76-79.
- YOU Y R, ZHANG Y P, LIU S W. Determination of purine content in beer by HPLC[J]. *China Brewing*, 2008(3): 76-79.
- [14] 刘亮婷, 任国峰. 食物中嘌呤检测方法研究进展[J]. *实用预防医学*, 2018, 25(9): 4.
- LIU L T, REN G F. Development of purine extraction and determination in foods[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2018, 25(9): 4.
- [15] 刘镇, 周婷婷, 王灵芝, 等. 酿造黄酒用粮食原料中嘌呤的检测研究[J]. *酿酒科技*, 2020, 2020(4): 4.
- LIU Z, ZHOU T T, WANG L Z, et al. Determination of purines in huangjiu-making grains[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020, 2020(4): 4.
- [16] 吕铎, 邢光南, 盖钧镒. 大豆种子中嘌呤含量的 HPLC 测定方法[J]. *大豆科学*, 2016, 35(4): 655-659.
- LV D, XING G N, GAI J Y. HPLC method for determining purine content in soybean seeds[J]. *Soybean Science*, 2016, 35(4): 655-659.
- [17] 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, 2007(3): 23-24, 26.
- ZHANG X Y, LU Y L. Study of a method for the determination of purine content in beer using HPLC [J]. *Beer Science and Technology*, 2007, 2007(3): 23-24, 26.
- [18] 毛玉涛, 张洪, 王明. HPLC 法测定豆浆中的嘌呤含量[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(2): 207-211.
- MAO Y T, ZHANG H, WANG M. Determination of purine in soybean milk by HPLC[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(2): 207-211.
- [19] 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.
- LIU S L, LI M Q, DING Z E. Determination of purine content in soybean by HPLC[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2009, 36(4): 674-676.
- [20] ZHANG X, SHU X O, GAO Y T, et al. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women[J]. *J Nutr*, 2003, 133(9): 2874-2878.
- [21] LIU Z M, HO C S, CHEN Y M, et al. Can soy intake affect serum uric acid level? Pooled analysis from two 6-month randomized controlled trials among Chinese postmenopausal women with prediabetes or prehypertension[J]. *Eur J Nutr*, 2015, 54(1): 51-58.
- [22] 李慧慧. 低嘌呤豆浆及其速溶粉的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- LI H H. Study on low purine soy milk and its instant powder[D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [23] 毛玉涛, 樊平, 黄洋, 等. UPLC 法测定豆浆中嘌呤含量及 GCB 对嘌呤吸附的研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(5): 159-164.
- MAO Y T, FAN P, HUANG Y, et al. Determina-

tion of purine in soybean milk by UPLC and adsorption research of purine by GCB[J]. Journal of

the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36 (5): 159–164.

### Determination of Four Purine Compounds in 58 Kinds of Soybean by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography

Sun Yufeng, Huang Yatao, Liu Jiameng, Guan Dongyan, Fan Bei, Wang Fengzhong\*

(*Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety in Harvest, Storage, Transportation, Management and Control, MOA, Beijing 100193*)

**Abstract** Purine compounds are important natural toxins in soybean, and excessive intake can induce hyperuricemia and gout. In order to reveal the levels of purine compounds in different soybeans, an ultrahigh-performance liquid chromatography (UPLC) method was developed for the determination of four purine compounds in soybeans, and the levels of guanine, adenine, xanthine, and hypoxanthine in 58 main planted soybeans in China were determined. The results showed that the method had good linearity ( $R^2 > 0.9995$ ) in the linear range (0.2–10 mg/L) and the detection limits were 0.0412–0.1001 mg/L. The precision RSD was less than 0.6000% and the RSD values for adenine, guanine, xanthine and hypoxanthine were 1.1103%, 1.0728%, 1.3762, and 0.9457% in that order. The recoveries of the four purine compounds spiked ranged from 92.5902% to 100.1373%. This paper also examines the comparative determination of the ideal extraction solvent (equal volume solution of trifluoroacetic acid and formic acid) and hydrolysis time (30 min). The data on the content of purine compounds in some of the main soybean varieties in China determined by applying this method showed that the purine content in different soybean varieties: high protein varieties > conventional varieties > high oil, protein, and lipid double-high varieties and the purine content in non-fishy soybean varieties differed significantly (2 013.06~2 824.54 mg/kg), and the findings of this study can provide scientific guidance for soybean processing and consumption.

**Keywords** soybean; purine compounds; ultrahigh-performance liquid chromatography; detection