

文章编号:1673-1689(2008)05-0120-04

固相萃取-反相高效液相色谱法测定 小麦中的嘌呤类物质

刘春风^{1,2}, 李崎^{*1,2}, 李永仙^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 顾国贤^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用 Sep-Pak C₁₈ 萃取柱, 建立了固相萃取-反相高效液相色谱法测定啤酒酿造辅料小麦中的嘌呤类物质含量的方法。该方法准确可靠, 重现性好, 4 种嘌呤的回收率为 90.6%~96.4%, 相对标准偏差(RSD)小于 3%。腺嘌呤(Ade)、鸟嘌呤(Gua)、黄嘌呤(Xan)和次黄嘌呤(Hyp)的最低检测限依次为 0.1, 0.2, 0.1, 0.5 mg/L。

关键词: 啤酒; 高效液相色谱; 嘌呤; 固相萃取

中图分类号: TS 264.21

文献标识码: A

Determination of Purines in Wheat by Solid Phase Extraction-Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

LIU Chun-feng^{1,2}, LI Qi^{*1,2}, LI Yong-xian^{1,2}, ZHENG Fei-yun^{1,2}, GU Guo-xian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An analytical method of purines in beer was established by RP-HPLC. The recoveries of purines were between 90.6-96.4%, and the relative standard deviation was below 3%. The limit of detection for ademinine, guanine, xanthine and hypoxanthine were 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.1mg/L and 0.5 mg/L, respectively. It was proved to be a convenient and accurate method for analyzing purines content in wheat and wheat malts, and it provided a reliable method for the research of beer with low purines.

Key words: beer; HPLC; purines; solid phase extraction

小麦具有作为啤酒酿造原料的基本因素, 且某些特性优于大麦。在啤酒酿造中, 小麦最早是作为辅料用来降低成本, 以小麦作为主要原料的小麦啤酒的研制也有 40 多年的历史。国内对小麦啤酒的

研究正在逐渐兴起。然而, 许多研究认为, 啤酒和痛风的形成存在较高的依存关系^[1-2]。2004 年, 美国人证明了啤酒是痛风的相关独立因素^[3]。最近, 日本人对啤酒与嘌呤基的代谢影响也作了研究^[4],

收稿日期: 2008-07-05.

作者简介: 刘春风(1981-), 女, 河北廊坊人, 工学硕士, 助教.

* 通讯作者: 李崎(1971-), 女, 上海人, 工学博士, 教授, 主要从事啤酒酿造科学与微生物研究. Email: liqi@jiangnan.edu.cn

得出了相似的结论。

图1显示了核酸合嘌呤类物质的组成示意图。构成核酸的碱基除了腺嘌呤和鸟嘌呤,还包括嘌呤合成和分解代谢过程的中间体黄嘌呤(Xan)和次黄嘌呤(Hyp)等。此外,自然界存在许多重要的嘌呤衍生物,如嘌呤的代谢物尿酸和一些生物碱如茶叶碱、可可碱和咖啡碱等^[5](图2)。

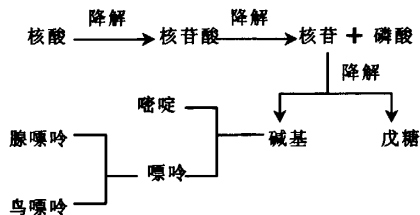


图1 核酸和嘌呤类物质的组成

Fig. 1 Composition of nucleic acid and purine compound

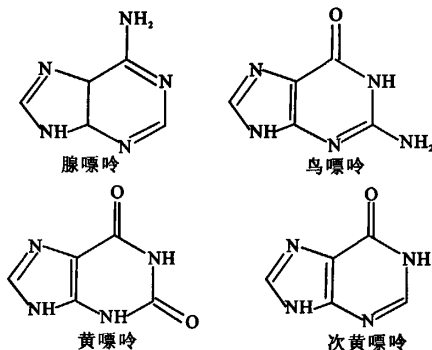


图2 常见的嘌呤碱基

Fig. 2 Some common purine bases

Dale等^[6-8]使用凝胶柱、电泳等对啤酒中的核苷酸、核苷和嘌呤进行了分步收集、分别测定。更早些时候,Somers等^[9]对麦汁和啤酒中的核苷酸类物质利用紫外吸收原理进行了测定。Qureshi A等^[10]也使用HPLC检测了啤酒和麦汁中包括多酚、嘌呤类物质等多种风味物质。最近有人^[11-12]利用毛细管电泳方法测定啤酒中的嘌呤类物质。目前,已经建立了检测啤酒酿造原料大麦及大米中的嘌呤类物质的方法^[13],而针对日益兴起的小麦啤酒的酿造原料小麦中嘌呤类物质的相关检测分析方法还未见报道。

作者在前人研究的基础上,采用Sep-Pak C₁₈萃取柱对样品进行预处理,最终建立了一种检测小麦中嘌呤类物质的准确可靠的反相高效液相色谱法,在某种程度上可以为啤酒厂及时跟踪控制整个啤酒酿造过程中的嘌呤类物质提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小麦1、小麦2、小麦芽1、小麦芽2;国内某啤酒厂提供。

1.2 主要试剂

嘌呤标准样品:Sigma公司产品;H₃PO₄(优级纯)、高氯酸(分析纯)、KH₂PO₄(分析纯)、氨水(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 主要仪器

Waters 高效液相色谱系统(1525 泵,2487 双波长检测器,717 自动进样器和Breeze3.3 工作站);美国 Waters 公司产品;KQ3200DB 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;KNF 型真空除气装置:德国 Laboport 公司产品;PHS-3 精密 pH 计:UNICO(上海)公司产品;EBC 磨:德国 Buhler Miag 公司产品;BTG-8A 型糖化仪:杭州博日科技有限公司产品。

1.4 主要分析方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Atlantis® C₁₈ 内径 5 μm, 4.6 mm × 150 mm; 流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄缓冲液,用氨水将 pH 调至 8.00,使用前用 0.45 μm 有机相膜进行抽滤,并超声波除气 15 min; 流量 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,进样体积 10 μL,柱温 25 °C。数据由 Breeze 色谱工作站进行处理。

1.4.2 标样配制 准确称取腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤各 25 mg,用超纯水溶解于 25 mL 的容量瓶中,制成 1 g/L 的储备液,储存于 2~4 °C 的冰箱,用前稀释到一定浓度。嘌呤不易溶于水,可以加入 40 μL 4 mol/L NaOH 溶液助溶。

1.4.3 样品的前处理 协定糖化法^[14]:用 EBC 磨将小麦(小麦芽)13 目粉碎,协定糖化法浸提。糖化结束后,用滤纸过滤。取滤液 10 mL 除气于 50 mL 容量瓶中,加入 10 mL 高氯酸溶液(体积分数 70%),置于沸水浴中水解 45 min^[13]。迅速进行冰浴冷却,用 10 mol/L KOH 溶液调整 pH 至 7,再以稀氨水溶液调整 pH 至 8.0。以滤纸滤去大部分沉淀物,滤液加二次水至 50 mL,并以氨水调 pH 至 8.0,用注射器和 0.45 μm 滤膜再滤一遍,取 0.5 mL 滤液上 Sep-Pak C₁₈ 小柱过滤,用 0.5~1 mL 的超纯水洗脱小柱,收集洗脱液至 2 mL 的容量瓶中。吸取一定量的样品进样。标样、小麦及小麦芽中 4 种嘌呤的液相分析图谱见图 3~5。

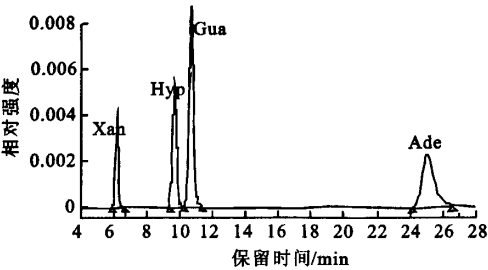


图 3 4 种嘌呤混合标样的图谱
Fig. 3 Chromatogram of four purine standard samples

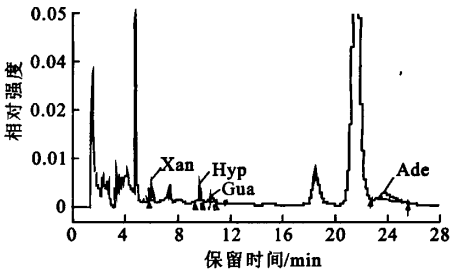


图 4 小麦样品中的嘌呤检测图谱
Fig. 4 Chromatogram of four purine in wheat

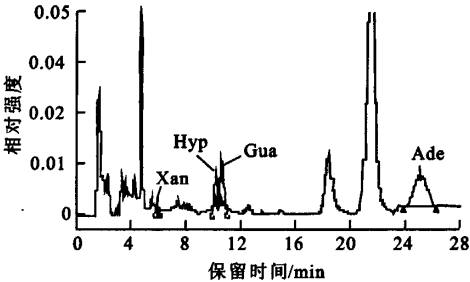


图 5 小麦芽样品中的嘌呤检测图谱
Fig. 5 Chromatogram of four purine in wheat malt

1.4.4 定性定量分析 试验采取保留时间定性，外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 方法的有效性评价

2.1.1 线性关系和线性范围以及精密度的测定 将 4 种嘌呤样品储备液进行梯度稀释(分别配制 100,50,10,5,1,0.5,0.1 mg/L)成 7 个不同质量浓度的样品标准溶液,按照 1.4.1 的色谱条件进行分析,以峰面积与样品质量浓度作线性回归;同时取质量浓度为 50 mg/L 的嘌呤混合标准样品,在同一天连续进样 10 次测定精密度,结果用相对标准偏差(RSD)来表示,结果见表 1。

表 1 方法线性范围和精密度(n=10)
Tab. 1 Linear range and accuracy of the method(n=10)

嘌呤质量 浓度/(mg/L)	回归方程	相关系数 R ²	RSD/ %
Ade	Y=5 250.4 x+316.44	0.999 8	1.82
Gua	Y=10 292 x-394.28	0.999 0	1.61
Xan	Y=50 381 x+10 697	0.998 9	1.45
Hyp	Y=86 505 x+166 711	0.998 0	2.20

由表 1 可以看出,在 0.1~100 mg/L 范围内,质量浓度和峰面积呈良好的线性关系。4 种嘌呤测定时的重复性高,精密度高(RSD<3%)。

2.1.2 加标回收率 取已知含量的小麦芽样品 1 份,加入不同质量浓度的 4 种嘌呤标准品溶液,按上述方法和条件各测定 3 次,求回收率的平均值。结果如表 2 所示。

表 2 加标回收率(n=3)
Tab. 2 Results of recovery (n=3)

嘌呤	质量浓度/(mg/L)			回收 率/%	平均回 收率/%
	本底	加标量	测定值		
黄嘌呤	1.91	2	3.85	98.5	99.90
		4	5.89	99.7	
		6	8.03	101.5	
次黄嘌呤	4.45	8	11.87	95.3	97.17
		10	14.38	99.5	
		12	15.91	96.7	
鸟嘌呤	4.30	6	9.85	95.6	96.47
		8	11.87	96.5	
		10	13.92	97.3	
腺嘌呤	7.69	12	20.11	102.1	99.03
		16	22.76	96.1	
		20	27.38	98.9	

由表 2 可知,4 种嘌呤的回收率均较高(>96%),其中黄嘌呤和腺嘌呤的回收率在 99%以上。

2.1.3 最低检出限(LOD)的测定 最低检出量系指色谱条件下,被测物质给出可测定响应信号的最小量,LOD 往往取决于其信噪比(S/N),一般认为 S/N=3 为 HPLC 方法的检出限^[13]。在本研究中,腺嘌呤(Ade)、鸟嘌呤(Gua)、黄嘌呤(Xan)和次黄嘌呤(Hyp)的最低检测限依次为 0.1,0.2,0.1,0.5 mg/L。

2.2 小麦中嘌呤含量的测定

针对两个不同品种的小麦样品中的嘌呤类物质进行了检测分析,结果见表 3。

由表 3 可以看出,两种小麦的总嘌呤物质质量分数比较接近,差别并不显著,这也可能与样本总数偏少有关;但是,不同小麦中的嘌呤碱质量分数差别较大,小麦中的嘌呤类物质和游离嘌呤碱主要

是次黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤,其含量占总量的90%以上,黄嘌呤质量分数很低。

表3 小麦中的嘌呤类物质质量分数

Tab.3 Contents of four purine in wheat samples

小麦	质量分数/(mg/hg)				
	黄嘌呤	次黄嘌呤	鸟嘌呤	腺嘌呤	总嘌呤
1	0.39	3.61	1.48	1.11	6.59
2	0.46	2.17	1.36	2.53	6.52

2.3 小麦芽中嘌呤质量分数的测定

试验针对两个不同品种的小麦芽样品中的嘌呤类物质进行了检测分析,结果见表4。

表4 小麦芽中的嘌呤类物质质量分数

Tab.4 Contents of four purine in wheat malt

小麦	质量分数/(mg/hg)				
	黄嘌呤	次黄嘌呤	鸟嘌呤	腺嘌呤	总嘌呤
1	1.42	4.03	2.39	5.70	13.54
2	1.53	3.56	3.44	6.15	14.68

由表4可以看出,4种嘌呤物质在小麦芽中都可以检测出来,其中含量较多的两种嘌呤物质为次黄嘌呤和腺嘌呤。两种小麦芽的总嘌呤物质含量存在一定差异,不同小麦芽中的嘌呤碱含量差别也较大,这可能是由于麦芽溶解度不同,其中的核酸分解程度也不相同的原因。小麦芽与小麦相比,无

论单一某种嘌呤物质还是在嘌呤物质总量上,前者都较后者高,其中小麦芽中的总嘌呤较小麦的高53.5%左右,这可能由于小麦在发芽过程中,酶原被激活并生成许多水解酶,其中的磷酸酯酶等可以促进小麦中的核酸类物质降解为各种嘌呤碱基的缘故。

3 结 语

1) 通过用 Sep-Pak C₁₈ 小柱对样品进行预处理,可以准确测定小麦样品中的4种嘌呤类物质含量,该方法重现性好,4种嘌呤的回收率为96.47%~99.90%,相对标准偏差RSD小于3%。腺嘌呤(Ade)、鸟嘌呤(Gua)、黄嘌呤(Xan)和次黄嘌呤(Hyp)的最低检测限依次为0.1,0.2,0.1,0.5 mg/L。

2) 小麦中的嘌呤类物质和游离嘌呤碱主要是次黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤,其质量分数在90%以上,黄嘌呤含量很低。

3) 不同小麦芽中的嘌呤碱含量差别较大,这可能由于麦芽溶解度不同,进而导致核酸分解程度也不相同。

4) 小麦芽与小麦相比,无论单一某种嘌呤物质还是在嘌呤物质总量上,前者都较后者高,其中小麦芽中的总嘌呤质量分数较小麦的高53.5%左右。

参考文献(References):

- [1] Lyu Li-Ching, Hsu Chi-Yin, Yeh Ching-Ying, et al. A case-control study of the association of diet and obesity with gout in Taiwan[J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 78: 690-701.
- [2] Yamamoto T, Moriawaki Y, Takahashi S, et al. Effect of beer on the plasma concentration of uridine and purine bases[J]. *Metabolism*, 2002, 51: 1317-1323.
- [3] Snaith M. Gout and alcohol[J]. *Rheumatology*, 2004, 43: 1208-1209.
- [4] Yamamoto T, Moriawaki Y, Takahashi S, et al. Effect of ethanol on metabolism of purine bases (Hyp, Xan and uric acid) [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 356: 35-37.
- [5] 王镜岩. 生物化学[M]. (第三版) 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [6] Dale C J, Hough J S, Young T W. Fractionation of high and low molecular weight components from wort and beer by adsorption chromatography using the gel Sephadex LH20[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 1988, 48(2): 62-65.
- [7] Dale C J, Lyddiatt A. Quantitative analysis of purine nucleosides and free bases in wort and beer[J]. *J Inst Brew*, 1994, 100(3): 173-178.
- [8] Dale C J, Young T W. A simple method for the isolation of purine nucleosides from wort and beer using column chromatography[J]. *J Inst Brew*, 1988, 94(1): 33-37.
- [9] Somers T C, Ziemelis G. Interpretation of ultraviolet absorption in wort and beer. The major role of nucleic acid derivatives[J]. *J Inst Brew*, 1972, 78(4): 233-236.
- [10] Qureshi A A, Burger W C, Prentice N. Quantitation of potential flavoring compounds in worts and beers by HPLC[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 1979, 37(4): 152-160.
- [11] Safranow K, Machoy Z. Simultaneous determination of 16 purine derivatives in urinary calculi by gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. *J Chromatogr B*, 2005, 819: 229-235.
- [12] Cortacero-Ramirez S, Segura-Carretero A, Cruces-Blanco C, et al. Simultaneous determination of multiple constituents in real beer samples of different origins by capillary zone electrophoresis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 380: 831-837.
- [13] 林先军. 低嘌呤类物质啤酒的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [14] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. (第二版) 北京: 中国轻工出版社, 1996.

(责任编辑: 朱明)