

5种虾类嘌呤含量的测定及其不同组织嘌呤的分布研究

冯绍彪^{1,2}, 周寅涛^{1,2}, 王家星³, 张 宾^{1,2}, 庞 杰⁴, 孙继鹏^{3*}

(1. 浙江海洋大学比萨海洋研究生学院, 舟山 316022; 2. 浙江海洋大学食品与药学院浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 舟山 316022; 3. 浙江省海洋开发研究院, 舟山 316021; 4. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002)

摘 要: **目的** 建立一种同时测定腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、次黄嘌呤(hypoxanthine, H)和黄嘌呤(xanthine, X)的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC), 并研究5种虾类肌肉、虾黄及内脏组织中的嘌呤分布。**方法** 虾类中嘌呤化合物由CF₃COOH/HCOOH/H₂O混合酸处理, 于90℃水浴振荡12 min后65℃水浴旋转蒸发至干, 残余物用KH₂PO₄-H₃PO₄流动相复溶并过0.22 μm滤膜, 最后采用Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 0.01 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄溶液(pH 3.70)作为流动相, 流速1.0 mL/min等色谱条件在254 nm波长下检测分析。**结果** 4种嘌呤组分均在0.5~250.0 mg/L范围内有良好的线性关系, 相关系数(r^2)均接近于1.0000, 检出限和定量限分别在0.042~0.096 mg/L和0.139~0.320 mg/L之间, 方法精密度相对标准偏差在0.04%~0.30%之间, A、G、H和X样品水解重复性相对标准偏差依次为1.87%、2.27%、1.42%和2.59%, 加标回收率在97.83%~102.21%之间。哈氏仿对虾、中华管鞭虾、日本对虾、口虾蛄、凡纳滨对虾5种虾类肌肉中总嘌呤含量在696.56~1862.16 mg/kg之间; 中华管鞭虾和口虾蛄的虾黄中总嘌呤含量分别为4720.34 mg/kg和3650.60 mg/kg; 虾类内脏中总嘌呤含量在936.67~3531.75 mg/kg之间。**结论** 该方法精密度高、回收率好且检出限低, 适用于虾类不同组织中4种嘌呤的测定。5种虾类中总嘌呤含量及不同部位的嘌呤含量差异较大, 且虾黄和虾内脏均高于同种虾类肌肉中的嘌呤含量。因此, 在食用虾类时, 建议彻底清除内脏和严格控制虾黄和虾仁的摄入量, 以减缓高尿酸血症和痛风等健康风险。

关键词: 嘌呤化合物; 高效液相色谱法; 虾; 不同组织

Study on the determination of purine content in 5 kinds of shrimp and the distribution of purine in different tissues

FENG Shao-Biao^{1,2}, ZHOU Yin-Tao^{1,2}, WANG Jia-Xing³,
ZHANG Bin^{1,2}, PANG Jie⁴, SUN Ji-Peng^{3*}

(1. Pisa Marine Graduate School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, College of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 3. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316021, China; 4. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072146)、浙江省特支人才培养计划项目(2020R52027)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072146), and the Special Support Talent Training Plan Project of Zhejiang Province (2020R52027)

***通信作者:** 孙继鹏, 博士, 副研究员, 主要研究方向为海洋生物资源高值开发利用。E-mail: jipengsun@yeah.net

***Corresponding author:** SUN Ji-Peng, Ph.D, Associate Professor, Zhejiang Marine Development Research Institute, No.10, Tiyu Road, Lincheng Street, Dinghai District, Zhoushan 316021, China. E-mail: jipengsun@yeah.net

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of adenine (A), guanine (G), hypoxanthine (H) and xanthine (X) and study the purine distribution in the muscles, yellow, and viscera tissues of 5 kinds of shrimps. **Method** Purine compounds in shrimp were extracted using a mixed acid of $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$, oscillated in a water bath at 90°C for 12 minutes, and then evaporated and dried in a water bath at 65°C . The residue was redissolved in the $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ mobile phase and passed through $0.22\ \mu\text{m}$ filter membrane. Finally, the samples were detected and analyzed by Waters Atlantic T3 ($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) chromatographic column with $0.01\ \text{mol/L}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ buffer solution ($\text{pH}\ 3.70$) as the mobile phase at a flow rate of $1.0\ \text{mL/min}$ and a wavelength of $254\ \text{nm}$. **Results** The 4 kinds of purine components had a good linear relationship in the range of $0.5\text{--}250.0\ \text{mg/L}$, and the correlation coefficients (r^2) were all close to 1.0000. The limits of detection and limits of quantitation were $0.042\text{--}0.096\ \text{mg/L}$ and $0.139\text{--}0.320\ \text{mg/L}$, respectively. The relative standard deviations of the method precision were between 0.04% and 0.30% . The relative standard deviations of water hydrolysis repeatability for A, G, H, and X in sample were 1.87% , 2.27% , 1.42% , and 2.59% , respectively. The spiked recoveries were between 97.83% and 102.21% . The total purine content in the muscles of 5 kinds of shrimp samples, including *Parapenaeopsis hardwickii*, *Solenocera crassicornis*, *Penaeus japonicus*, *Oratosquilla oratoria*, *Litopenaeus vannamei* and other shrimps, ranged from $696.56\ \text{mg/kg}$ to $1862.16\ \text{mg/kg}$; the content of total purine in shrimp yolk of *Solenocera crassicornis* and *Oratosquilla oratoria* was $4720.34\ \text{mg/kg}$ and $3650.60\ \text{mg/kg}$, respectively; the total purine content in shrimp viscera ranged from $936.67\ \text{mg/kg}$ to $3531.75\ \text{mg/kg}$. **Conclusion** This method has high precision, good recovery and low detection limit, and is suitable for the determination of 4 kinds of purines in different tissues of shrimp. The total purine content and purine content in different parts of 5 kinds of shrimps are significant differences. The purine content in the yolk and viscera of shrimp was higher than that in the muscle of the same kind of shrimp. Therefore, it is recommended to completely remove the internal organs and strictly control the intake of shrimp yolk and muscle of shrimp to reduce health risks such as hyperuricemia and gout when eating shrimp.

KEY WORDS: purine compounds; high performance liquid chromatography; shrimp; different tissues

0 引言

嘌呤是一种由嘧啶环和咪唑环结合而成的碱性化合物,主要有腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤及其衍生物等^[1-3]。在长期的高嘌呤饮食下,嘌呤在体内经代谢最终生成尿酸,而肾脏不能将过多的尿酸经尿液排出,造成人体内血液尿酸浓度超过正常值,若不节制高嘌呤饮食则会使尿酸浓度达过饱和而形成尿酸盐针状结晶,积存于关节和肾脏等处导致痛风,最终可能引起高尿酸血症^[4-7]。此外,痛风还可能引发高血压^[8]、脂肪肝^[9]和慢性肾病^[10]等多种并发症。近年来,我国高尿酸血症的发病率呈现出显著的上升趋势和青年化。根据《2021 年中国高尿酸及痛风趋势白皮书》可知,中国高尿酸血症的整体患病率约为二十分之三,痛风患病率也有百分之一以上,令人堪忧的是,年轻群体中 18 至 35 岁的高尿酸血症和痛风患者约占总患病人数的 60% 左右。总之,引发这一现象的原因多种多样,包括遗传因素和日常饮食等多个外部因素。

根据《2017 年中国痛风现状报告白皮书》调查结果可知,我国南方沿海地区和经济发达地区为痛风高发区,这可能与当地的饮食习惯密切相关。随着大众消费水平的不断提升,人们对于食品营养的要求也在不断提高,虾类逐渐代替

白肉和红肉等。据中国渔业年鉴(2022 版)可知,虾类主要有海洋捕捞虾类和海水淡水养殖,包括毛虾、鹰爪虾、虾蛄、斑节对虾、南美白对虾、青虾、克氏原螯虾等,2021 年虾类国内总产量大约为 499 万 t。虾类水产品需求量大的原因主要是因为虾类水产品肉质鲜美、口感独特、蛋白质丰富且脂肪含量低,因而广受消费者的喜爱^[11-14]。另外,它还含有多人体所必需的氨基酸和矿物质,对心脑血管的保护与调节具有显著的功效,适合不同年龄阶段人群食用^[15]。

然而,目前相关研究表明虾类肌肉部位中的总嘌呤含量达到中高等水平,约为 $100\text{--}400\ \text{mg}/100\ \text{g}$ 。同时,目前仅见国内外学者检测虾类肌肉组织中的嘌呤,而很少有研究报道虾黄和内脏等组织中嘌呤的测定^[16-19]。因此本研究通过建立一种高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)用于测定 5 种虾类不同组织中的嘌呤含量,并分析不同虾类嘌呤含量的分布情况,以期为人们科学合理地食用虾类提供科学指导。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

新鲜中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)、日本对虾

(*Penaeus japonicus*)、哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*) [虾体肌肉中挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVBN)]含量均小于 1.2 mg/100 g)和活体凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)等 5 种虾类样品, 购于中国浙江省舟山市国际水产城。

腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、次黄嘌呤(hypoxanthine, H)、黄嘌呤(xanthine, X)(纯度 $\geq 99.0\%$)、磷酸、冰乙酸、甲醇、甲酸(色谱纯)(美国 Aladdin 公司); 三氟乙酸(色谱纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 磷酸二氢钾、氢氧化钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

1260 Infinity II型 Agilent 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); H1850 型高速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); Milli-Q IQ 7000 型超纯水系统(美国 Millipore 公司); BSA2245 型分析天平(精度 0.1 mg, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); YRE-201D 型真空旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司); Waters Atlantis T3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 美国沃特世公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 虾样品前处理及嘌呤含量检测

新鲜的中华管鞭虾、日本对虾、哈氏仿对虾和鲜活的凡纳滨对虾、口虾蛄 5 种虾类样品, 经去头、去壳、去虾线等操作步骤, 分成了肌肉、虾黄或内脏团 3 个部分, 然后将这 3 个部分用组织捣碎机捣碎并匀浆后装入聚乙烯(poly ethylen, PE)保鲜袋中, 均于 -18°C 冷冻保存备用。

游离嘌呤检测: 参考吕兵兵^[20]的样品水解方法, 并稍作修改。称取 200 mg 不同虾组织样品置于 20 mL 具塞试管中, 加入 10 mL 超纯水混合均匀, 在恒温振荡器中 90°C 水浴 12 min 后冰水冷却, 9000 r/min 离心 10 min 得到上清液并过 0.22 μ m 滤膜后储存于 4°C 冰箱, 以备 HPLC 分析。

总嘌呤检测: 参考曲欣^[21]的样品水解方法, 并略作修改。移取 11 mL $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:5:1, V:V:V)于 20 mL 具塞试管中并充分混合, 90°C 水浴振荡 12 min 后迅速冷却, 65°C 水浴旋转蒸发至干, 残余物用 10 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相复溶(超声助溶), 其他操作同上。

1.3.2 检测条件优化

(1)流动相的选择

参考张滋慧^[18]的色谱条件, 并稍作修改。选择相同 pH 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相, 探究不同浓度(2.0×10^{-4} 、 3.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} 和 2.0×10^{-2} mol/L)的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相对 4 种嘌呤化合物峰形和分离效果的影响。选择 10^{-2} mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相, 探究不同 pH (3.40、3.60、3.70、3.80、3.90、4.00 和 4.20)的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相对 4 种嘌呤化合物峰形和分离效果的影响。

(2)检测波长的确定

配制质量浓度为 5.0 mg/L 的 4 种嘌呤标准品(A、G、H 和 X), 在 200~350 nm 范围内分别对其进行全光谱扫描, 得到最适检测波长。

(3)流速的确定

采用 Waters Atlantis T3 色谱柱, 并保持其他色谱条件不变, 分别以 0.7、0.8、0.9、1.0 和 1.1 mL/min 流速对 4 种嘌呤化合物进行分离, 确定其分离的最适流速。

(4)柱温的确定

保持其他色谱条件不变, 分别以 26、28、29、30 和 32°C 柱温对 4 种嘌呤化合物进行分离, 确定其分离的最适流速。

1.3.3 方法学验证

(1)标准曲线的制作

分别称取 20 mg A、G、H 和 X 标准品, 置于棕色瓶中, 先加 1 mol/L KOH 溶液助溶, 用超纯水定容至 10 mL, 均配制成 2000.0 mg/L 标准储备液, 置于 4°C 冰箱中避光备用。进样前, 将 4 种标准储备液等体积混合, 得到 500.0 mg/L 的混合标准液, 随后梯度稀释得到 250.0、150.0、100.0、50.0、10.0、5.0、3.0 和 0.5 mg/L 的系列标准液, 再过 0.22 μ m 滤膜, 在最优色谱条件下进行嘌呤含量测定。以样品质量浓度作为横坐标(X, mg/L), 峰面积为纵坐标(Y, mAu)绘制标准曲线。

(2)精密度实验

通过连续进样质量浓度为 5.0 mg/L 的嘌呤混合标准液 6 次, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)获得该方法的精密度。

(3)重复性实验

称取 200 mg 前处理好的中华管鞭虾肌肉样品 6 份, 按照 1.3.1 样品水解方法处理样品。然后采用选定的色谱条件进行 HPLC 检测, 根据测定计算其 RSD, 检验此水解方法的重现性。

(4)加标回收率

同 1.3.3(3)称取样品 12 份。将嘌呤标准品按照 0.5 倍、1.0 倍和 2.0 倍样品的含量加入, 配制成低、中、高 3 种浓度, 用于上机检测。每个样品进行 3 次测定, 然后计算回收率和 RSD。

1.3.4 色谱分析条件

色谱柱: Waters Atlantis T3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.01 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 缓冲盐溶液(pH 3.70); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30°C ; 检测器: 二极管阵列检测器; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μ L。

1.4 数据处理

数据采用 Excel 2016 软件进行分析, 图表绘制采用 Origin 8.5.1 和 Adobe Illustrator 2021 软件。

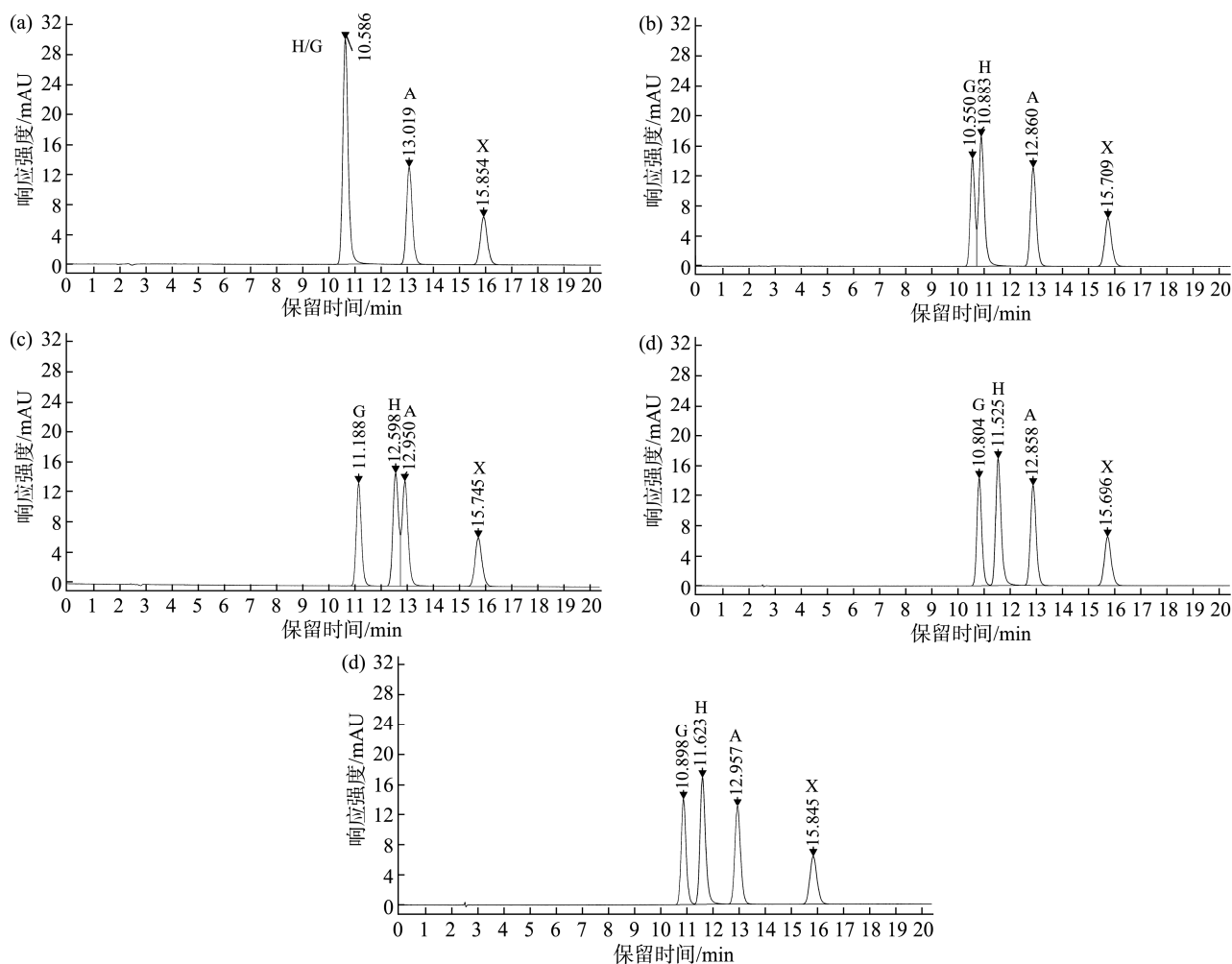
2 结果与分析

2.1 检测条件的建立

2.1.1 流动相

根据先前的报道可知,荣胜忠等^[22]采用 Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱并以 10.0 mmol/L 甲酸铵 (pH3.60)-甲醇(99:1, V/V)为流动相测定中国常见植物性食品中嘌呤的含量,结果表明准确度较好;QU 等^[17]采用 Waters Atlantis dC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱且以磷酸二氢钾缓冲液(0.02 mol/L, pH 3.60)为流动相测定海产品贮藏中嘌呤含量的变化,发现 4 种嘌呤组分能够在 15 min 内实现完全分离。此外,由 4 种嘌呤化合物的弱碱性可知^[23],流动相的 pH 对嘌呤组分间的分离有着明显的影响。因此,本研究选择 Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱探究了不同浓度和不同 pH 的 KH₂PO₄-H₃PO₄ 流动相,以优化 4 种嘌呤组分分离的最佳色谱条件。如图 1 所示,当

KH₂PO₄-H₃PO₄ 流动相的浓度为 2.0×10^{-4} mol/L 时, G 和 H 组分的峰出现重叠。随着流动相浓度的增加, H 的保留时间不断延长,其他组分基本没有变化,直至浓度为 0.01 mol/L 时各组分完全分离,浓度继续增加时,峰型和分离能力基本上没有变化,鉴于流动相的浓度增加会使柱压相应的升高,因此确定流动相浓度为 0.01 mol/L。由图 2 可知,在 pH 为 3.60 时, A 和 H 的分离能力极差,两组分出现重合;在 pH 为 4.20 时, A 的保留时间大于 20 min;在 pH 为 3.90 和 4.00 时,虽然各组分的分离能力较好,但保留时间较长;在 pH 为 3.80 时, A 和 X 的分离能力较差;在 pH 为 3.40 和 3.70 时,4 种组分在 20 min 内可以完全分离,但可以看出峰顺序有着很大的变化。因此确定 KH₂PO₄-H₃PO₄ 溶液 (pH 3.70)作为流动相且 4 种嘌呤组分的出峰顺序依次为 G、H、A 和 X,与张滋慧^[18]所得出的结果相似。综上所述,本研究采用的流动相为 0.01 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 溶液(pH 3.70)。

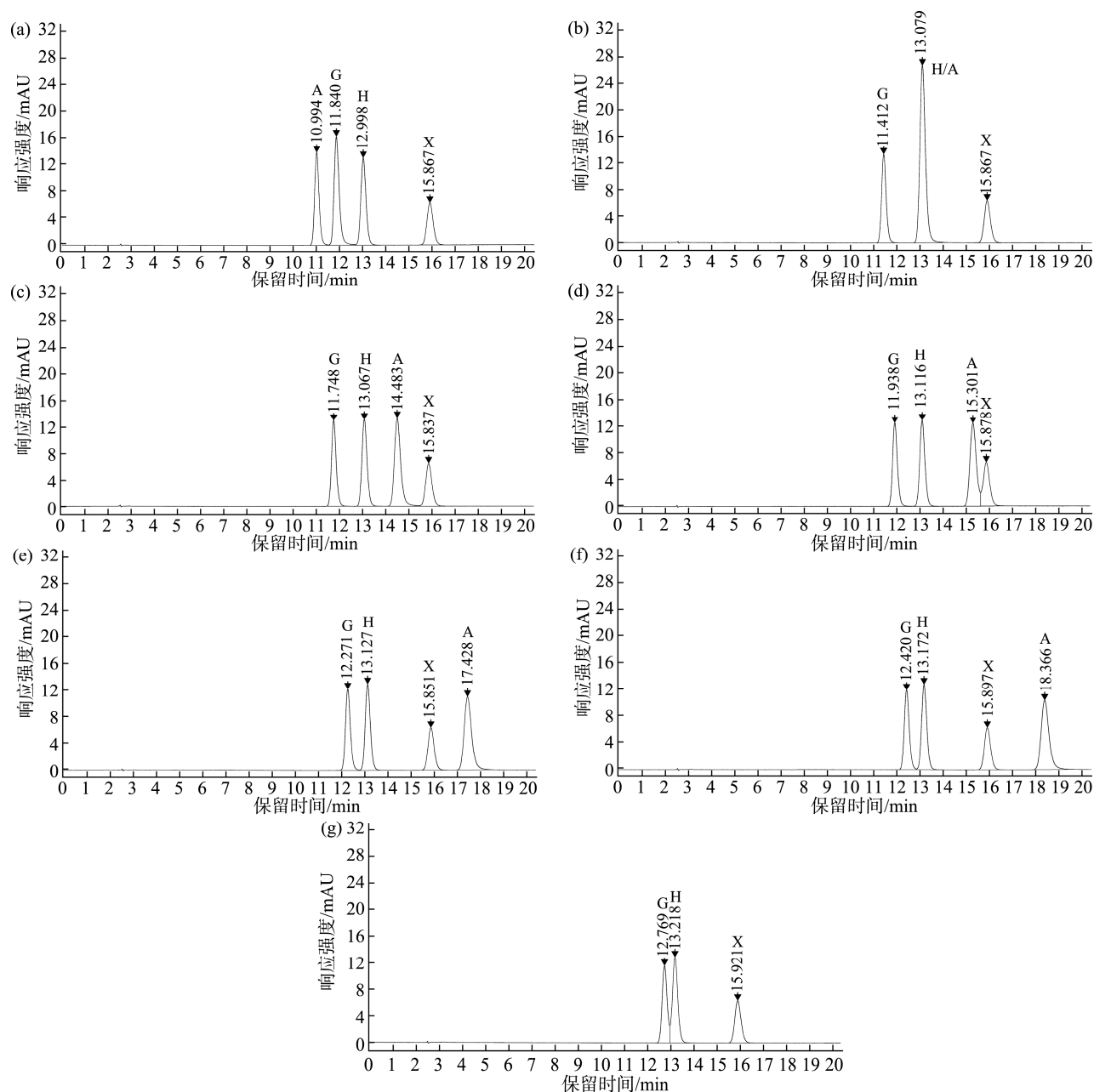


注: KH₂PO₄-H₃PO₄ 流动相浓度: (a) 2.0×10^{-4} mol/L; (b) 3.0×10^{-3} mol/L; (c) 5.0×10^{-3} mol/L; (d) 1.0×10^{-2} mol/L;

(e) 2.0×10^{-2} mol/L; 嘌呤组分峰用大写字母表示(下同)。

图 1 不同浓度的 KH₂PO₄-H₃PO₄ 流动相对 4 种嘌呤组分分离效果的影响

Fig.1 Effects of mobile phase of KH₂PO₄-H₃PO₄ at different concentrations on the separation effects of 4 kinds of purine components



注: $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相 pH: (a) 3.40; (b) 3.60; (c) 3.70; (d) 3.80; (e) 3.90; (f) 4.00; (g) 4.20。

图 2 不同 pH 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 流动相对 4 种组分分离效果的影响

Fig.2 Effects of mobile phase of $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ at different pH on the separation effects of 4 kinds of purine components

2.1.2 检测波长

采用二极管阵列检测器对 5.0 mg/L 嘌呤混合标准溶液进行最大吸收光谱扫描。由图 3 可以看出, 4 种嘌呤化合物在 200~300 nm 之间均有吸收峰并且 A、G、H 和 X 的最大吸收峰分别在 260、274、250、266 nm 左右, 这与李婷婷等^[24]所得出的结果相一致。因此在本研究中, 同时测试了 254、260 和 270 nm 检测波长下的 4 种嘌呤化合物分离效果。结果表明, 4 种化合物在 254 nm 波长下具有高峰面积响应和更好的分离效果。据先前的报道可知, 目前嘌呤

检测所使用的紫外波长有所差异, 例如 RONG 等^[25]、刘镇等^[26]和 WU 等^[27]、KANEKO 等^[16]分别在紫外波长 254 nm 和 260 nm 处检测食品中的嘌呤。因此, 选择 254 nm 作为最终实验的检测波长。

2.1.3 流速

在上述条件下, 分别考察了不同流速(0.7、0.8、0.9、1.0 和 1.1 mL/min)对嘌呤组分分离的影响。如图 4 所示, 流动相在低流速情况下, 嘌呤组分间的分离能力较好, 但色谱峰扩张比高流速的要大且分离时间较长。随着流速由低到高,

4种嘌呤组分的峰宽变窄同时保留时间均有所缩短。当流速增加到1.0 mL/min和1.1 mL/min时,相比于较低流速的峰宽,此时色谱图中各峰的峰宽变化不大且保留时间大大缩短。与此同时,随着流速的继续增加,色谱柱内压力也会相应地升高,另外,目标组分过早的出峰可能会受杂质峰的影响。在先前的研究中,WU等^[27]同时测定中国鸡汤中的嘌呤和尿酸,建立方法时发现流速为1.0 mL/min可以有效地减少检测分析时间并促进了化合物的分离;RONG等^[25]采用HPLC测定了猪肉和牛肉不同部位A、H、G和X的含量,采用的流动相流速同样为1.0 mL/min。因此,本研究流动相的流速选择1.0 mL/min进行后续研究。

2.1.4 柱温

在上述的优化实验后,探究不同柱温(26、28、29、30和32℃)对嘌呤检测的影响。柱温会对检测结果产生一定影响,因为腺嘌呤和黄嘌呤受温度影响较大,温度过高会分解^[19]。如图5所示,柱温对4种组分的总保留时间稍有影响,最重要的是,随着柱温的升高A和X的分离能力也

随之变弱。鉴于保留时间和分离能力,本研究选用30℃作为最优柱温。

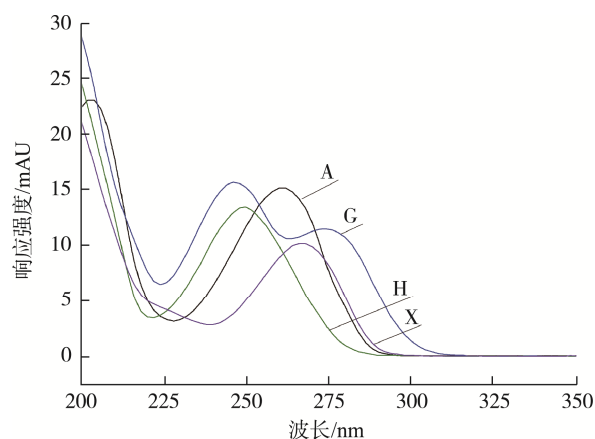
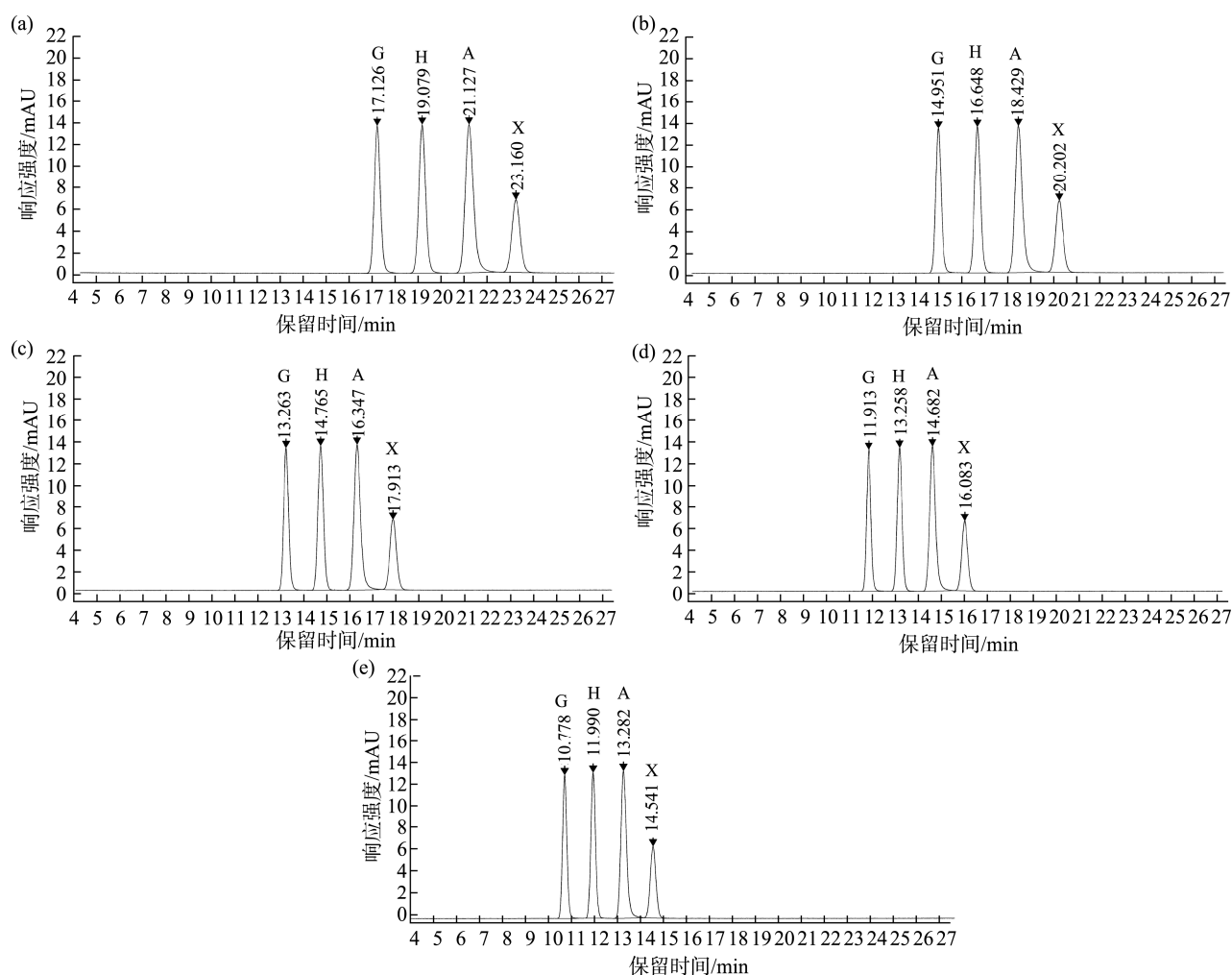


图3 4种嘌呤组分的紫外吸收光谱图

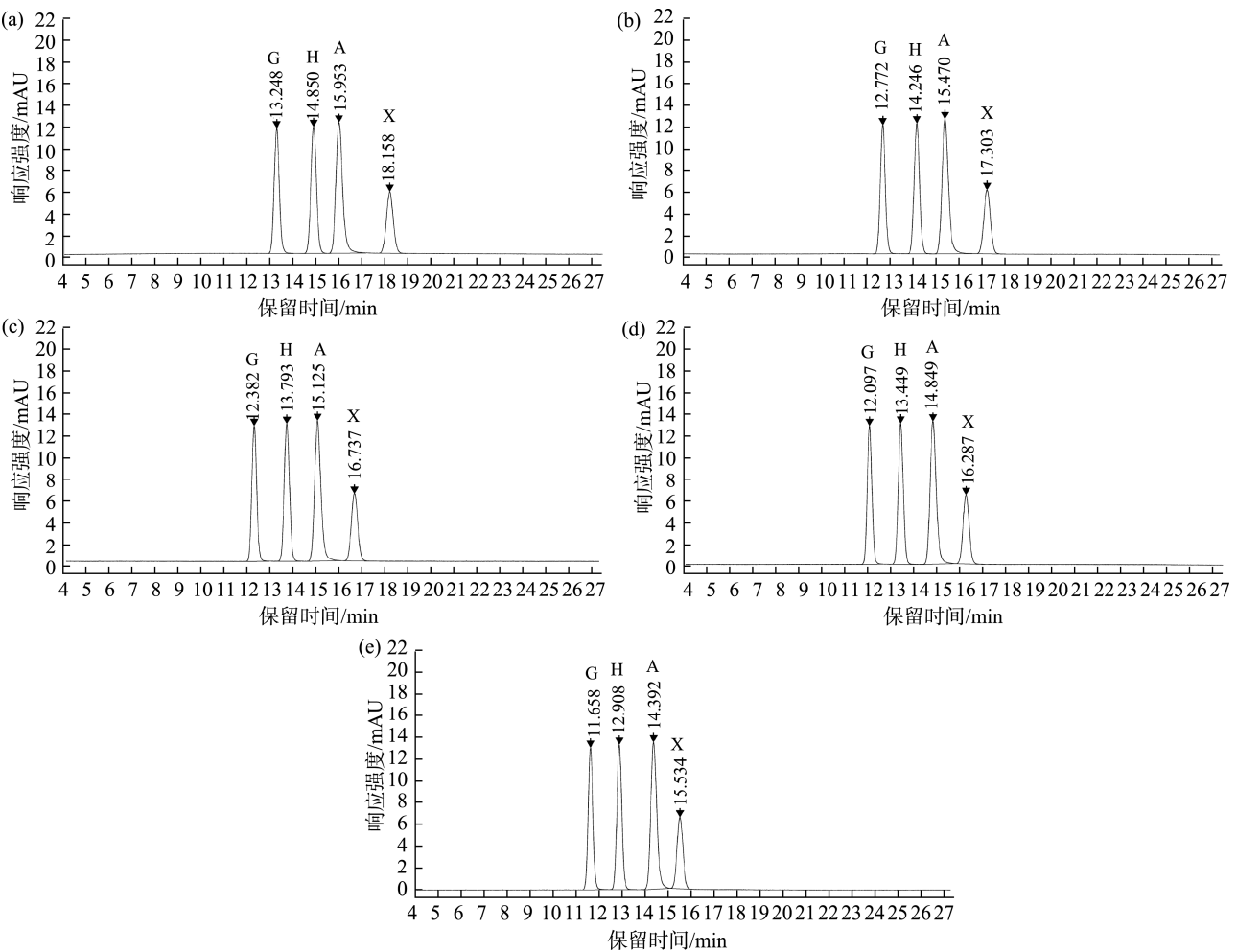
Fig.3 Ultraviolet absorption spectrogram of 4 kinds of purine components



注: 流速: (a) 0.7 mL/min; (b) 0.8 mL/min; (c) 0.9 mL/min; (d) 1.0 mL/min; (e) 1.1 mL/min。

图4 不同流速对4种嘌呤组分分离效果的影响

Fig.4 Effects of different flow rates on the separation effects of 4 kinds of purine components



注: 柱温: (a) 26℃; (b) 28℃; (c) 29℃; (d) 30℃; (e) 32℃。

图 5 不同柱温对 4 种组分分离效果的影响

Fig.5 Effects of different column temperatures on the separation effects of 4 kinds of purine components

2.2 标准曲线

采用上述最优液相色谱条件检测混合标准品中的 4 种嘌呤化合物含量, 以峰面积(Y)及质量浓度(X, mg/L)绘制标准曲线。按照各组分的信噪比 $S/N=3$ 对应的质量浓度计算检出限(limit of detection, LOD), 以 $S/N=10$ 对应的质量浓度计算定量限(limit of quantification, LOQ), 结果见表 1。在 0.5~250.0 mg/L 质量浓度范围内 4 种嘌呤化合物线性关系良好, 相关系数(r^2)均接近于 1.0000。该方法的 LODs 和 LOQs 分别在 0.042~0.096 mg/L 和 0.139~0.320 mg/L 之间。结果表明, 在定量分析的阈值范围内, 能够满足定量分析

的需求。

2.3 方法精密度

如表 2 所示, RSDs 在 0.04%~0.30%之间, 表明该方法的精密度良好, 适用于虾类样品检测。

2.4 重复性

按照 1.3.2(3)节样品水解方法及色谱检测方法对中华管鞭虾肌肉样品中的嘌呤进行提取和测定, 如表 3 结果显示: A、G、H 和 X 嘌呤含量的 RSDs 分别为 1.87%、2.27%、1.42%、2.59%, 表明样品水解方法重复性较好。

表 1 4 种嘌呤化合物的回归方程、相关系数、线性范围、LODs 和 LOQs

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges, LODs and LOQs for 4 kinds of purine compounds					
嘌呤	线性方程	相关系数(r^2)	线性范围/(mg/L)	LODs/(mg/L)	LOQs/(mg/L)
G	$Y=35.9568X+2.5194$	0.9999	0.5~250.0	0.043	0.142
H	$Y=39.5720X+1.8011$	0.9999	0.5~250.0	0.042	0.141
A	$Y=48.5490X+1.0696$	0.9999	0.5~250.0	0.042	0.139
X	$Y=21.7290X-0.8761$	0.9999	0.5~250.0	0.096	0.320

表 2 HPLC 检测精密度实验结果
Table 2 Experimental results of HPLC detection precision

嘌呤	平行测定值/(mg/kg)						平均值/(mg/kg)	RSDs/%
	1	2	3	4	5	6		
G	253.47	252.65	253.01	253.67	253.46	252.85	253.19	0.16
H	254.00	254.22	253.98	254.02	254.19	254.05	254.08	0.04
A	258.58	256.22	257.47	257.26	257.84	257.29	257.44	0.30
X	280.68	280.51	280.38	280.24	280.40	280.35	280.43	0.05

表 3 嘌呤提取方法的重复性实验结果
Table 3 Reproducible test results of purine extraction methods

嘌呤	重复测定值/(mg/kg)						平均值/(mg/kg)	RSDs/%
	1	2	3	4	5	6		
G	138.33	147.07	144.38	140.07	144.84	142.28	142.83	2.27
H	1035.98	1077.48	1052.30	1053.57	1065.56	1071.05	1059.32	1.42
A	464.19	441.94	453.96	445.38	447.32	458.21	451.83	1.87
X	69.90	67.00	65.20	68.26	67.80	65.64	67.30	2.59

2.5 加标回收率

从表 4 可知, A、G、H 和 X 平均回收率分别为 100.98%、102.21%、99.57%、97.83%, 说明采用上述样品处理方法可以有效保留嘌呤, 能较好地提取及检测样品中的嘌呤。

表 4 加标回收实验结果(n=3)
Table 4 Results of the spiked recovery experiment (n=3)

嘌呤	加标量/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%
G	75	101.34	102.21
	150	100.25	
	300	99.03	
H	75	99.26	99.57
	150	100.08	
	300	99.36	
A	75	101.45	100.98
	150	100.60	
	300	100.90	
X	75	97.40	97.83
	150	96.82	
	300	99.28	

2.6 实际样品嘌呤含量测定结果

由表 5 可知, 虾类样品不同部位的嘌呤含量差异较大。由结果显示, 虾类肌肉部位中的总嘌呤含量在 696.56~1862.16 mg/kg 之间; 中华管鞭虾和口虾蛄的虾黄部位中总嘌呤含量分别为 4720.34 mg/kg 和 3650.60 mg/kg; 虾类内脏部位中总嘌呤含量为 936.67~3531.75 mg/kg, 虾黄和虾内脏部位中的嘌呤含量均高于同种虾类肌肉部位。在先前的研究中, QU 等^[17]测定了凡纳滨对虾和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)等水产品的肌肉部位, 结果显示两种虾类总嘌呤含量分别为 1798.60 mg/kg 和 1749.50 mg/kg; 张滋慧^[18]也测定了凡纳滨对虾等水产品的肌肉部位, 显示其总嘌呤含量为 1963.7 mg/kg。在本研究中, 虾类肌肉部位中只检出了游离嘌呤 H 且所有虾类不同部位的样品中均未检出游离嘌呤 A, 这可能与 H 的易溶水性和 A 的难溶水性有关^[28-29]。此外, 虾类样品中总嘌呤 H 含量几乎均高于其他 3 种嘌呤含量, 为最主要的嘌呤。虾黄虽富含不饱和脂肪酸、氨基酸和蛋白质等营养成分^[30], 深得消费者的喜爱, 而虾黄部位中的总嘌呤含量远远高于虾肌肉部位。虾内脏部位中总嘌呤过高, 可能是因为基体中的嘌呤大多以核苷酸的形式存在, 而内脏代谢率又较高, 从而使总嘌呤含量过高^[31]。因此为了预防和治疗高尿酸血症及痛风, 在食用虾类时, 建议彻底清除内脏和适量食用虾黄和虾仁, 虽然其有很高的营养价值, 但要严格控制其摄入量。

表 5 部分虾类水产品中嘌呤含量分布(mg/kg, n=3)
Table 5 Distribution of purine content in some shrimp aquatic products (mg/kg, n=3)

品种	组织部位	嘌呤类别	G	H	A	X	总量
中华管鞭虾	肌肉	游离嘌呤	-	97.92±0.63	-	-	97.92
		总嘌呤	110.00±1.45	903.89±3.26	585.29±2.74	154.99±0.12	1754.17
	虾黄	游离嘌呤	324.53±1.98	126.88±0.54	-	-	451.41
		总嘌呤	1424.60±13.88	1792.08±11.32	867.38±4.43	636.27±2.32	4720.34
	内脏	游离嘌呤	134.11±1.37	160.63±0.96	-	182.59±1.44	477.34
		总嘌呤	1259.90±6.44	1185.80±2.56	559.99±2.27	526.06±2.98	3531.75
凡纳滨对虾	肌肉	游离嘌呤	-	49.61±0.12	-	-	49.61
		总嘌呤	191.04±1.42	660.82±0.76	822.27±3.33	53.84±0.07	1727.97
	内脏	游离嘌呤	59.68±0.22	327.55±0.67	-	179.55±0.09	566.79
		总嘌呤	443.62±1.36	769.17±1.45	165.02±1.27	258.76±0.15	1636.57
	肌肉	游离嘌呤	-	123.58±0.35	-	-	123.58
		总嘌呤	157.33±0.44	997.12±3.21	570.29±2.62	58.89±0.00	1783.64
日本对虾	内脏	游离嘌呤	-	146.62±1.76	-	-	146.62
		总嘌呤	350.98±1.27	933.18±4.02	60.43±0.05	151.14±0.03	1495.73
	肌肉	游离嘌呤	-	252.74±2.41	-	-	252.74
		总嘌呤	202.57±0.19	1256.23±1.16	324.79±0.30	78.56±0.11	1862.16
	内脏	游离嘌呤	37.25±0.08	199.54±0.49	-	-	236.79
		总嘌呤	541.86±3.64	939.54±5.18	83.36±0.15	168.04±0.39	1732.80
哈氏仿对虾	肌肉	游离嘌呤	-	235.39±1.78	-	-	235.39
		总嘌呤	72.86±0.11	474.26±1.35	99.34±0.23	50.10±0.00	696.56
	虾黄	游离嘌呤	-	187.64±0.13	-	-	187.64
		总嘌呤	721.64±1.82	2177.12±22.14	581.45±2.02	170.40±0.86	3650.60
	内脏	游离嘌呤	-	263.68±1.36	-	118.95±0.43	382.63
		总嘌呤	258.69±1.34	362.70 ±3.14	124.30±0.42	190.97±1.19	936.67

注: -代表未检测出嘌呤含量。

3 结 论

本研究建立的 HPLC 可同时测定虾类中 4 种嘌呤化合物。采用 Waters Atlantis T3 色谱柱,以 0.01 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄溶液(pH 3.70)为流动相。经方法学验证,此方法有较广的线性范围且 LOD 低、精密度高,A、G、H 和 X 的样品水解重复性好,加标回收率在 97.83%~102.21%之间,适用于虾类 4 种嘌呤的测定。哈氏仿对虾、中华管鞭虾、日本对虾、口虾蛄、凡纳滨对虾 5 种虾类样品中总嘌呤含量及不同部位的嘌呤含量差异较大。此外,5 种虾的虾黄和虾内脏均高于同种虾类肌肉中的嘌呤含量。因此,在食用虾类时,建议彻底清除内脏和严格控制虾黄和虾仁的摄入量,以减缓高尿酸血症和痛风等健康风险。

参考文献

[1] 陈志炎. 食物中的嘌呤及其在食品加工过程中的降解方法[J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 202–207.
CHEN ZY. Research progress on distribution of putine in food and

cooking process [J]. Food Mach, 2021, 37(10): 202–207.
[2] HUANG C, ZHENG M, HUANG YZ, *et al.* The effect of purine content on sensory quality of pork [J]. Meat Sci, 2021, 172: 108346.
[3] HOU CL, XIAO GL, AMAKYE WK, *et al.* Guidelines for purine extraction and determination in foods [J]. Food Front, 2021, 2(4): 557–573.
[4] HE Z, ZHAO M, WANG CY, *et al.* Purine and uric acid contents of common edible insects in Southwest China [J]. J Insect Food Feed, 2019, 5(4): 293–299.
[5] 彭松林, 曾治国, 张涛, 等. 肉类嘌呤含量及降嘌呤方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 314–321.
PENG SL, ZENG ZG, ZHANG T, *et al.* Research progress on purine content and methods of purine reduction in meat [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(18): 314–321.
[6] 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): 1146–1149.
LIU LT, REN GF. Development of purine extraction and determination in foods [J]. Pract Prev Med, 2018, 25(9): 1146–1149.
[7] GUO XY, WANG XY, HUANG DW, *et al.* Method study on determination of total purine content in fish meat by diazotization reaction combined with SERS [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 123: 109027.
[8] WANG J, QIN TQ, CHEN JR, *et al.* Hyperuricemia and risk of incident

- hypertension: A systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114259.
- [9] AIHEMAITIJIAN S, ZHANG YQ, ZHANG L, *et al.* The association between purine-rich food intake and hyperuricemia: A cross-sectional study in chinese adult residents [J]. Nutrients, 2020, 12(12): 3835.
- [10] BORGHI C, ROSEI EA, BARDIN T, *et al.* Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease [J]. J Hypert, 2015, 33(9): 1729–1741.
- [11] 胡晓梦, 陈静, 邓尚贵, 等. 低温等离子体对中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)菌相变化及品质特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 141–147.
- HU XM, CHEN J, DENG SG, *et al.* Effect of atmospheric cold plasma on microflora and quality characteristics of *Solenocera crassicornis* [J]. Food Sci, 2021, 42(19): 141–147.
- [12] 黄国威, 余敏, 周际松, 等. 不同规格及性别的克氏原螯虾各部位营养分析及评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(11): 33–42.
- HUAGN GW, SHE M, ZHOU JS, *et al.* Nutritional analysis and evaluation of different parts of *Procambarus clarkia* with different size and gender [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(11): 33–42.
- [13] 崔茜, 王伟, 谢益韬, 等. 不同养殖模式金刚虾(斑节对虾)肌肉营养成分比较分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 276–281.
- CUI X, WANG W, XIE YT, *et al.* Comparative analysis of nutrient composition in the muscle of *Penaeus monodon* in different culture models [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(23): 276–281.
- [14] 王潇, 张继光, 徐坤华, 等. 3种海捕虾肌肉营养成分分析与品质评价[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 209–214.
- WANG X, ZHANG JG, XU KH, *et al.* Analysis and quality evaluation of nutrition in the muscle of three kinds of marine shrimps [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(8): 209–214.
- [15] 董凯璇, 张思宇, 李敏杰, 等. 羟自由基氧化对中华管鞭虾肌肉功能特性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(23): 7605–7612.
- DONG KX, ZHANG SY, LI MJ, *et al.* Effects of hydroxyl radical oxidation on muscle functional characteristics of *Solenocera crassicornis* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(23): 7605–7612.
- [16] 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.
- [17] QU X, SUI JX, MI NS, *et al.* Determination of four different purines and their content change in seafood by high-performance liquid chromatography [J]. J Sci Food Agric, 2017, 97(2): 520–525.
- [18] 张滋慧. 水产品中嘌呤含量的测定及脱嘌呤方法研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
- ZHANG ZH. Study on the purine content of aquatic products and purine removing method [D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [19] 张静. 常见食品中嘌呤类组分及其在加工贮藏中的变化规律研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2020.
- ZHANG J. Study on purine components in common foods and the change rule during storage and processing [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [20] 吕兵兵. 不同储藏条件及烹制方法对带鱼嘌呤含量的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- LV BB. Effects of preserving and cooking on the content of purine in *Trichiurus haumela* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [21] 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.
- QU X. Study on the contents and change rules during storage and processing of purines in aquatic foods [D]. Qingdao: Ocean University of China.
- [22] 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: 92–95, 101.
- RONG SZ, ZOU LN, WANG CX, *et al.* Purine in common plant food in China [J]. J Hyg Res, 2012, 41: 92–95, 101.
- [23] 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 XY, YONG W, *et al.* Determination of four purines in meat by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2008, (6): 724–728.
- [24] 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): 266–275.
- LI TT, REN LK, WANG DF, *et al.* Determination of purines content of sea fish by high performance liquid chromatography [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(5): 266–275.
- [25] RONG SZ, ZOU LN, ZHANG YN, *et al.* Determination of purine contents in different parts of pork and beef by high performance liquid chromatography [J]. Food Chem, 2015, 170: 303–307.
- [26] 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, (4): 107–110.
- LIU Z, ZHOU TT, WANG LZ, *et al.* Determination of purines in Huangjiu-making grains [J]. Liquor-Making Sci Technol, 2020, (4): 107–110.
- [27] WU ML, ZHANG WG, SHEN XX, *et al.* Simultaneous determination of purines and uric acid in Chinese chicken broth using TFA/FA hydrolysis coupled with HPLC-VWD [J]. Foods, 2021, 10(11): 2814.
- [28] 孙宏, 李婷婷, 宋敏杰, 等. 预制调理低嘌呤大菱鲆鱼片的制备及品质研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 58–62, 69.
- SUN H, LI TT, SONG MJ, *et al.* Preparation and quality of pre-conditioned low purine turbot fillet [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(2): 58–62, 69.
- [29] 周智雯. 不同烹饪方式对羊肉品质及嘌呤含量的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- ZHOU ZW. Effect of different cooking methods on quality and purine content of lamb [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [30] 徐文思, 杨祺福, 周丽兴, 等. 小龙虾黄营养与风味成分分析[J]. 食品科技, 2023, 48(2): 136–142.
- XU WS, YANG QF, ZHOU LX, *et al.* Analysis of nutrient composition and flavor compounds in crayfish roe [J]. Food Sci Technol, 2023, 48(2): 136–142.
- [31] LI TT, REN LK, WANG DF, *et al.* Optimization of extraction conditions and determination of purine content in marine fish during boiling [J]. Peer J, 2019, 7: e6690.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



冯绍彪, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工及贮藏。
E-mail: f19818002820@126.com



孙继鹏, 博士, 副研究员, 主要研究方向为海洋生物资源高值开发利用。
E-mail: jipengsun@yeah.net