

纳豆芽孢杆菌发酵液中嘌呤碱基的检测

鲁 洋, 钱 和*, 张伟国, 严为留

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘 要:采用反相离子对色谱法对纳豆芽孢杆菌发酵液中的嘌呤碱基进行检测, 优化后的检测条件为: 色谱柱, Hitachi La Chrom C₁₈ (4.6mm×250mm, 5μm); 紫外检测波长254nm; 流动相: 甲醇: 四丁基氢氧化氨: 乙酸: 水=10:1.485:1.485:987.03 (v/v/v/v); 流速: 0.7mL/min; 柱温: 25℃。检测结果表明该方法标准曲线良好: A、G、H、X四种嘌呤碱基的线性范围分别为0.5~20.0、1.0~50.0、1.0~50.0、0.5~20.0mg/L, 相关系数均大于0.9991, 方法回收率为96.9%~102.4%。基于优化后的检测方法, 检测得出纳豆发酵前后发酵液中总嘌呤含量分别为41.33、84.99mg/L, 说明嘌呤碱基含量在发酵过程中有所增加。

关键词:反相离子对色谱法, 嘌呤碱基, 纳豆芽孢杆菌, 液态发酵

Determination of purine base in bacillus natto fermentation broth

LU Yang, QIAN He*, ZHANG Wei-guo, YAN Wei-liu

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Purine bases were detected by reverse phase ion pair chromatograph. The determination condition could be concluded as follows: Column was Hitachi La Chrom C₁₈ (4.6mm×250mm, 5μm). UV detector wave was 254nm, mobile phase was 0.7mL/min, column temperature was 25℃. Detection results demonstrated that the standard curve was well, the linearity range of A, G, H, X were 0.5~20.0, 1.0~50.0, 1.0~50.0, 0.5~20.0mg/L respectively, the correlation coefficient was above 0.9991 and recovery scope was 96.9%~102.4%. Based on optimized detection method, purine bases in both before and after fermentation was 41.33mg/L and 84.99mg/L, which demonstrated that purine bases were increasing during fermentation.

Key words: reverse phase ion pair chromatograph; purine base; bacillus natto; liquid fermentation

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0059-05

纳豆激酶(nattokinase, 简称NK)是一种具有纤溶活性的蛋白酶^[1], 是在纳豆发酵过程中由纳豆枯草杆菌(*Bacillus subtilis* natto)产生的一种丝氨酸蛋白酶^[2]。纳豆激酶作为纳豆菌发酵的主要产物, 具有很好的溶解血栓的功能^[3], 自1980年由日本研究学者须见洋行博士发现其有效功能后便开始备受关注。日本的Sumi等^[4]于1987年首次从日本传统食品纳豆中提取并命名为纳豆激酶。纳豆激酶作为新一代治疗血栓的有效药物, 具有较广阔的应用前景, 但有关报道称, 多种关于纳豆激酶冻干粉等相关产品均具有较高含量的嘌呤类物质, 不利于痛风患者的食用。然而目前为止, 对此并没有相应的文献研究支持。因此, 对发酵产物中嘌呤碱基含量的研究具有较大的意义。常见的嘌呤提取方法包括酸水解、超声波萃取^[5]以及超临界萃取^[6]等分离方法。其中, 酸萃取方法应用较为广泛, 常用的酸包括高氯酸、三氟乙酸等。传统高氯酸水解方法可应用于不同类物质中嘌呤的

提取; 尤玉如^[7]经比较发现, 啤酒中嘌呤水解的最佳提取条件为三氟乙酸: 甲酸=1:1的条件下水解1h, 结果较好。Zhou^[8]、Luo等^[9]通过研究比较, 采用三氟乙酸: 甲酸: 去离子水=5:5:1条件下90℃水解14min, 可得到较为满意的结果。Shyi—Neng等^[10]用三氟乙酸/甲酸/水(5:5:1, 体积比)100℃来水解鱼糜样品; Pifieim—Sotelo等^[11]用三氟乙酸/甲酸(1:1, 体积比)95~100℃水解海胆生殖腺, 均得到较好的结果。而超声波萃取以及超临界萃取法由于其操作较复杂, 且提取效果较酸萃取差, 因此应用不广。同时, 常用的嘌呤物质的检测方法主要有液相色谱法^[12]、电泳法、离子色谱法、气相色谱法、纸层析法以及薄层色谱法^[13], 其中液相色谱法由于其自身所具有的简单、快捷、方便等优势, 被广泛应用。

本文主要对纳豆芽孢杆菌液态发酵产物中四种主要嘌呤碱基的提取条件以及检测方法均进行了优化, 同时分析确定发酵前后嘌呤碱基含量的变化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤均为色谱纯(≥99.95%) 购自上海生工; 甲醇 为色谱纯(≥99.95%); 四丁基氢氧化氨 分析纯; 冰乙酸 分

收稿日期: 2013-05-07 * 通讯联系人

作者简介: 鲁洋(1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制。

基金项目: 贵阳市科技支撑项目(2010筑科农合同字第3-08号)。

析纯($\geq 99.5\%$);水 超纯水;其他所有应用到的化学试剂 均为分析纯;流动相 均经 $0.22\mu\text{m}$ 的水系滤膜过滤。

DIONEX 高效液相色谱仪(DIONEX P-680泵、ASI-100自动进样器、TCC-100柱温箱、色谱柱Hitachi La Chrom C₁₈(4.6mm×250mm, $5\mu\text{m}$)) 美国DIONEX公司。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件的优化与确定

1.2.1.1 检测波长的选择 依据嘌呤物质的紫外吸收性质,在200~400nm的波长范围内对四种嘌呤进行紫外波长扫描以及预实验结果以确定最终检测波长。

1.2.1.2 柱温的选择 根据嘌呤物质在常温下的稳定性,分别选取20、25、30℃三个因素分别进行研究。

1.2.1.3 流动相的确定 根据先前文献报道,分别选择了0.02mol/L磷酸二氢钾(pH4.6)^[17]、添加四丁基氢氧化铵离子对^[18]的甲醇和水溶液以及10%、30%、50%、70%不同浓度的纯甲醇作为流动相,比较四种嘌呤标准品混合液的分离效果,根据分离结果确定流动相。

1.2.1.4 流速的确定 在上述确定的色谱条件下,考虑到柱子的耐压性以及流速对样品的分离度影响,分别选择了0.5、0.7、0.9、1mL/min四个不同流速条件下进行检测,用于确定最佳流速。

1.2.2 提取方法的优化与确定

1.2.2.1 提取方法 取发酵后的发酵液在4℃、8000r/min下离心10min,取上清按照相应比例与高氯酸混合,置于一定温度的水浴中加热一段时间后,冷却至室温,加入10mol/L的NaOH进行滴定至pH为7,抽滤取上清液定容至50mL,再过 $0.22\mu\text{m}$ 的水系滤膜过滤用于检测。

1.2.2.2 提取条件的优化 基于1.2.2.1的提取方法,在确定的色谱条件下,通过对样品中嘌呤含量的检测以及峰形分离程度的观察,同时参考Zinn、Makkar^[14-15]对嘌呤的提取方法,分别选择嘌呤提取过程中发酵液与高氯酸的比例、水解时间以及水解温度三个条件进行优化,设计正交实验方案,见表1。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test table

水平	因素			
	A 发酵液:高氯酸	B 水解时间 (min)	C 水解温度 (℃)	D 误差项
1	1:1	10	40	1
2	1:2	25	70	2
3	1:5	40	100	3

1.2.3 标准溶液配制 分别称取腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤标准品5mg,加入1mL 1mol/L NaOH溶解,用超纯水定容至50mL,4℃保存备用。

1.2.4 标准曲线的绘制 取不同体积的腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤标准储备液,稀释至0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20mg/L(腺嘌呤、黄嘌呤),

1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、50.0mg/L(鸟嘌呤、次黄嘌呤)4个标准浓度,按照确定的色谱条件检测,绘制4种目标组分的标准曲线。

1.2.5 数据处理 采用Excel、分析软件SPSS 18.0以及Origin等软件对数据进行分析与处理。嘌呤总含量(mg/L)=TA+TG+TH+TX。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

在200~400nm的波长范围内对四种嘌呤进行紫外波长扫描,结果发现在210~260nm之间四种嘌呤物质均有较高吸收,同时根据先前文献综述报道,并结合实验结果,确定本实验检测波长为254nm,在该波长检测下所得结果均较稳定且清晰。

2.2 柱温的确定

由于嘌呤类物质在常温下较稳定^[16],另外综合考虑温度对分离度结果的影响,经过实验摸索最后确定本实验主要分离柱温为25℃。

2.3 流动相的确定

根据1.2.1.3,发现添加四丁基氢氧化铵离子对的甲醇和水溶液分离效果较好,同时考虑到离子对的添加对色谱柱的影响,应尽可能降低其添加量。最终确定流动相比例为:甲醇:四丁基氢氧化铵:乙酸:水=10:1.485:1.485:987.03(v/v/v)。

2.4 流速的确定

通过检测结果最终确定流速为0.7mL/min时,标品以及样品的分离度较好。

2.5 色谱条件的验证

取按照1.2.3配制的四种混合标准品,采用上述确定的色谱条件进行分析,分析结果见图1,由图1可知,四种嘌呤均得到了很好的分离,满足后续检测要求。

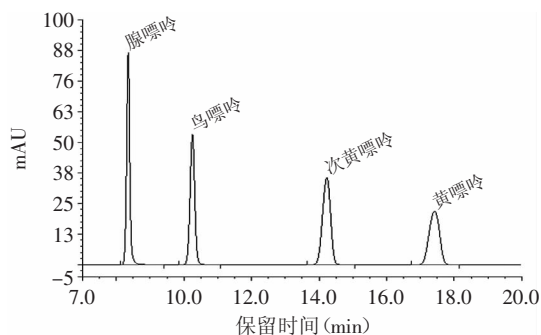


图1 四种嘌呤混合标准品色谱图

Fig.1 Chromatograph of four standard compounds

2.6 线性关系及线性范围

按照1.2.4的方法,在上述确定的液相色谱条件下进行分析,以峰面积与样品浓度作线性回归,结果见表2,由表2可知,在相应的线性范围内,浓度和峰面积呈现良好的线性关系。

2.7 提取条件的优化及确定

按照1.2.2所述,通过正交实验的设计,对发酵液中的嘌呤提取条件进行优化,检测结果见表3。

通过正交实验结果R值可以看出,三个因素对发

表2 线性回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Calibration curves, linearity range and coefficient of association

嘌呤	线性回归方程	线性范围(mg/L)	LOD(mg/L)	相关系数(R^2)
腺嘌呤(A)	$Y=1.8123X+0.1688$	0.5~20.0	0.03	0.9991
鸟嘌呤(G)	$Y=1.2238X+0.1186$	1.0~50.0	0.07	0.9997
次黄嘌呤(H)	$Y=1.1573X+0.1793$	1.0~50.0	0.02	0.9999
黄嘌呤(X)	$Y=0.8463X-0.0906$	0.5~20.0	0.01	0.9994

注: LOD(定量检测限): $S/N=3$, S-峰高, N-基线噪音。

酵液中嘌呤含量影响顺序从大到小依次为 $A>C>B$, 另外由于误差项的极值远小于三个影响因素, 可以初步判定, 三个因素间不存在交互作用或其他影响因素。最佳提取条件为 $A_3B_2C_3$ 即发酵液:高氯酸为1:5, 100℃煮沸25min。

表3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	嘌呤含量(mg/L)
1	1	1	1	1	33.49
2	1	2	2	2	35.19
3	1	3	3	3	38.06
4	2	1	2	3	40.11
5	2	2	3	1	46.98
6	2	3	1	2	40.02
7	3	1	3	2	49.03
8	3	2	1	3	45.92
9	3	3	2	1	46.89
K_1	106.74	122.63	119.43	127.36	
K_2	127.11	128.09	122.19	124.24	
K_3	141.84	124.97	134.07	124.09	
k_1	35.58	40.88	39.81	42.45	
k_2	42.37	42.70	40.73	41.41	
k_3	47.28	41.66	44.69	41.36	
R	11.70	1.82	4.88	0.05	

由于上述极差分析不能表示实验中随机误差对实验结果的影响, 故进行方差分析, 结果见表4。结果显示, A、C两个影响因素均有显著影响($p<0.05$), 而B因素对实验结果影响不大, 因此考虑到实际情况, 选

表4 方差分析

Table 4 Variance analysis

方差来源	III型平方和	自由度(df)	均方	F值	显著值(p)
校正模型	748.193 ^a	8	93.524	30.963	0.000
截距	47157.926	1	47157.926	15612.412	0.000
A	602.702	2	301.351	99.767	0.000
B	14.287	2	7.143	2.365	0.122
C	125.120	2	62.560	20.712	0.000
D	6.084	2	3.042	1.007	0.385
误差	54.370	18	3.021		
总计	47960.489	27			
校正的总计	1098.804	26			

注: a: $R^2=0.932$ ($R^2_{adj}=0.902$)。

择时间较短为宜, 这与极差分析结果相同。因此, 最终确定发酵液中嘌呤的最佳提取条件为: 发酵液:高氯酸=1:5, 100℃沸水浴10min。采用该方法提取, 发酵液中总嘌呤含量最高, 且分离较好, 为49.03。

2.8 精密度实验

取四种嘌呤混标准品, 连续进样7次用以检测精密度, 结果见表5。由表5中数据可知, 四种嘌呤标准品的RSD检测值在0.12%~0.17%之间, 充分说明该检测方法的精确性。

表5 精密度实验结果

Table 5 Results of degree of precision

次数	含量(mg/L)			
	腺嘌呤	鸟嘌呤	次黄嘌呤	黄嘌呤
1	12.89	8.76	8.99	14.93
2	12.86	8.75	8.97	14.94
3	12.86	8.76	8.95	14.94
4	12.89	8.77	8.98	14.95
5	12.90	8.77	9.00	14.96
6	12.92	8.79	9.00	14.97
7	12.91	8.78	8.99	14.98
平均值	12.89	8.77	8.98	14.95
标准偏差	2.18×10^{-2}	1.16×10^{-2}	1.57×10^{-2}	1.74×10^{-2}
RSD(%)	0.17	0.13	0.17	0.12

注: RSD(相对标准偏差): $RSD=\text{标准偏差}/\text{平均值} \times 100$ 。

2.9 加样回收率

取一已知嘌呤浓度的样品, 向内加入不同浓度的标品, 在上述确定的色谱条件以及提取条件下进行分析, 计算平均回收率, 结果见表6。结果表明, 腺

嘌呤的平均回收率为96.9%,鸟嘌呤的平均回收率为101.8%,次黄嘌呤的平均回收率为102.4%,黄嘌呤的平均回收率为97.7%。四种嘌呤的平均回收率为96.9%~102.4%,充分说明了该色谱条件检测的有效性与适宜性。

表6 样品回收率的测定

Fig.6 Determination of sample recovery

嘌呤碱基	样品浓度 (mg/L)	加标浓度 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
A	5.230	1.0	6.21	98.2	96.90
		5.0	9.90	93.4	
		10.0	15.15	99.2	
G	23.73	1.0	24.76	102.5	101.8
		20.0	44.77	105.2	
		40.0	62.85	97.8	
H	19.01	1.0	20.02	101.3	102.4
		20.0	39.49	102.4	
		40.0	60.45	103.6	
X	1.230	1.0	2.22	99.1	97.70
		5.0	6.01	95.5	
		10.0	11.07	98.4	

2.10 发酵液中嘌呤含量的检测

采用最终确定的最佳提取方法,在既定的色谱条件下进行分析,分别检测出发酵前后发酵液中四种嘌呤碱基的含量,样品检测结果分别见图2、图3以及表7。由表7中的数据可知,发酵后的总嘌呤含量高于发酵前的嘌呤含量,说明在发酵过程中合成了部分嘌呤碱基物质。另外,由发酵前的检测结果可知,其主体嘌呤碱基为腺嘌呤(占总嘌呤77.98%),而发酵

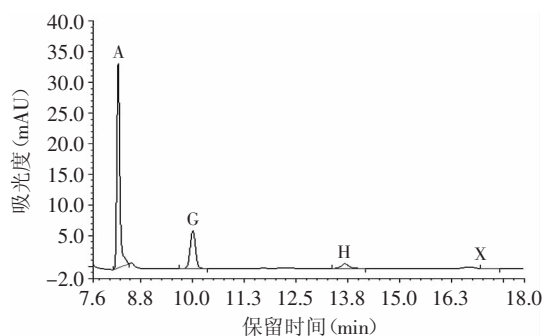


图2 发酵前嘌呤碱基的检测

Fig.2 Determination of purine bases before fermentation

表7 发酵前后发酵液中嘌呤碱基的检测结果

Table 7 Purine bases in broth before and after fermentation

嘌呤种类	发酵后嘌呤含量(mg/L)	占总嘌呤比例(%)	RSD(%)	发酵前嘌呤含量(mg/L)	占总嘌呤比例(%)	RSD(%)
腺嘌呤(A)	5.231	6.150	0.11	32.22	77.98	0.20
鸟嘌呤(G)	23.72	27.92	0.13	4.616	11.17	0.14
次黄嘌呤(H)	37.02	43.56	0.12	4.486	10.85	0.10
黄嘌呤(X)	19.01	22.37	0.18	0	0	0.17
总嘌呤	84.99			41.33		

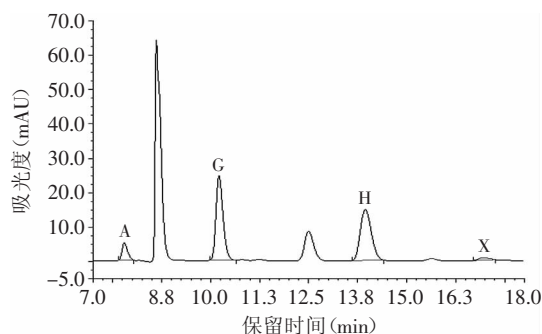


图3 发酵后嘌呤碱基的检测

Fig.3 Determination of purine bases after fermentation

后的主体嘌呤碱基为次黄嘌呤(占总嘌呤43.56%)。

3 结论

本文优化纳豆芽孢杆菌发酵液中四种嘌呤碱基—腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤的测定方法即反相离子对色谱法。利用优化后的方法对发酵前后的发酵液中的四种主体嘌呤物质含量的检测,可知纳豆芽孢杆菌发酵前后的总嘌呤含量分别为41.33、84.99mg/L。发酵前后,其主体嘌呤物质分别为腺嘌呤、次黄嘌呤。主要原因可能在于,发酵过程中纳豆芽孢杆菌优先利用黄嘌呤,而次黄嘌呤是腺嘌呤转化为黄嘌呤的中间代谢产物,因此后期发酵液中的次黄嘌呤含量较高,而腺嘌呤含量逐渐降低。同时,比较发酵前后嘌呤碱基含量的高低可知,部分嘌呤碱基又在发酵过程中再次合成,说明嘌呤物质并不是全部来自于发酵原料。

而正常痛风急性发作期病人要求饮食嘌呤控制小于150mg/d^[18],因此经纳豆芽孢杆菌直接发酵产的纳豆激酶产品由于其较高含量的嘌呤物质的存在,不宜于痛风患者的食用。

参考文献

- [1] Fujita M, Nomura K, Hong K, *et al.* Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [2] 陆捷, 付正纲, 陈正望. 纳豆激酶纯化及性质研究[J]. *华中科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(11): 115-117.
- [3] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. *Experientia*, 1987,

(下转第66页)

- and lactate in natural samples[J]. *Anal Chem Acta*, 1999, 381: 1-10.
- [6] Moreau N M, Goupny S M, Antignac J P, *et al.* Simultaneous measurement of plasma concentrations and C-enrichment of short-chain fatty acids, lactic acid and ketone bodies by gas chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2003, 784: 395-403.
- [7] Atsushi Y, Akinobu M, Kazuichi H, *et al.* Novel approach to the measurement of enantiomeric purity by high-performance liquid chromatography using a polarized photometric detector equipped with a split cell[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 727: 54-59.
- [8] 周朗, 李乔婧, 李永生, 等. 裂解加热-荧光毛细管法快速测定血液红细胞内丙酮酸[J]. *分析化学*, 2012, 40(11): 1725-1729.
- [9] Ng L K, Lafontaine P, Harnois J. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 873: 29-38.
- [10] Klaus D H, Harold B S, Tore T, *et al.* Quantitative analysis of hydralazine pyruvic acid hydrazone, the major plasma metabolite of hydralazine[J]. *J Chromatogr A*, 1980, 187: 171-179.
- [11] Sigrid P, Peter M H, Susan A A. Determination of short-chain aliphatic, oxo- and hydroxy-acids in drinking water at low microgram per liter concentrations[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 723: 27-34.
- [12] Yang D Y, Tsai T H, Cheng C H, *et al.* Simultaneous monitoring of extracellular glucose, pyruvate, lactate and glutamate in gerbil cortex during focal cerebral ischemia by dual probe microdialysis[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 913: 349-354.
- [13] Olsen C. An enzymatic fluorimetric micromethod for the determination of acetoacetate, β -Hydroxy butyrate, pyruvate and lactate[J]. *Clin Chim Acta*, 1971, 33(2): 293-300.
- [14] Hallstrom A, Carlsson A, Hillered L, *et al.* Simultaneous determination of lactate, pyruvate, and ascorbate in microdialysis samples from rat brain, blood, fat, and muscle using high-performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Meth*, 1989, 22(2): 113-124.
- [15] Chen P, Nie L H, Yao S Z. Determination of lactic acid and pyruvic acid in serum and cerebrospinal fluid by ion-exclusion chromatography with a bulk acoustic wave detector[J]. *J Chromatogr B*, 1995, 673(2): 153-158.
- [16] Xue Q F, Yeung E S. Indirect fluorescence determination of lactate and pyruvate in single erythrocytes by capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 1994, 661(1-2): 287-295.
- [17] Baena B, Garcia-Martinez D, Barbas C. Evaluation of diabetes-related short-chain organic acids in rat plasma by capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1051(1-2): 199-205.
- [18] 王海燕, 崔云龙, 郝钦芳, 等. 脑外伤后脑脊液中乳酸、丙酮酸检测的临床应用[J]. *中国医学检验杂志*, 2002, 3(2): 119-120.
- [19] 李永生, 杨微, 李乔婧, 等. 基于丙酮酸/还原型辅酶 I/乳酸脱氢酶/氧化型辅酶 I/乳酸正逆反应同时测定丙酮酸/乳酸的酶荧光毛细管分析[J]. *分析化学*, 2011, 39(11): 1058-1064.

(上接第62页)

- 43(10): 1110-1111.
- [4] 宁树成, 赵丽娜, 张岸平, 等. 纳豆激酶研究进展[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2006, 8(5): 632-633.
- [5] 肖维强, 黄炳雄, 王晓荣. HPLC法测定龙眼肉中的几种核苷类物质[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 234-237.
- [6] 张镜澄. 超临界萃取[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [7] 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.
- [8] Zhou Z H, Ke Y C. The investigation of analytical method of purine content in high purine foods[J]. *Nutritional Sciences Journal*, 1999, 24(4): 366-378.
- [9] 骆锡能, 陈翠瑶. 水产品嘌呤含量定量方法的建立[J]. *食品科学(台湾)*, 1997, 24(1): 1-11.
- [10] Lou S N, Chen H H, Hsu P Y, *et al.* Changes in purine content of tilapia surimi products during processing[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71: 889-895.
- [11] Sotelo M P, Quirós A R B, Hernández J L, *et al.* Determination of purine bases in sea urchin (Paracentrotus) gonads by high-performance liquid chromatography[J]. *Food Chemistry*, 2002, 79: 113-117.
- [12] Li P, Xiao H S, Xiang G S. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in Camellia species[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21: 559-563.
- [13] C Sârbu, C Măruțoiu. A new detection method for purines in thin-layer chromatography[J]. *Chromatographia*, 1985, 20(11): 683-684.
- [14] Zinn R A, Owens F N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 1986, 66: 157-166.
- [15] Makkar H P S, Becker K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods[J]. *The British Journal of Nutrition*, 1999, 81: 107-112.
- [16] 刘少林, 李梅青. 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.
- [17] 林先军, 李永仙, 李崎. 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.
- [18] 林江. 低嘌呤糖尿病饮食对痛风合并2型糖尿病的疗效观察[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(18): 3083-3084.