

不同食品基質對嘌呤分析中酸水解條件之 影響

駱錫能* 邱一鳴 翁瑞光 徐可芳 曾嘉豪 施欣玫

國立宜蘭大學食品科學系

摘 要

本研究之目的在於探討不同食品基質對嘌呤含量分析中酸水解條件之影響，實驗利用三氟醋酸與甲酸的混合酸，對草蝦、白鯧、鱈魚、乾香菇和黃豆等不同基質之食品進行水解，以獲取嘌呤物質最高回收率之水解條件為指標。結果顯示，草蝦、白鯧和鱈魚的嘌呤物質中皆有相當量之次黃嘌呤，香菇之嘌呤物質中次黃嘌呤含量最低，黃豆則僅含有腺嘌呤與鳥糞嘌呤，並無次黃嘌呤。在三種水產品基質中，草蝦的嘌呤含量分析最適水解條件為 100°C 酸水解 30 至 40 分鐘間，白鯧之總嘌呤含量於 100°C 下水解 30 分鐘時達最高，然而，鱈魚在 120°C 下酸水解所得之個別和總嘌呤含量皆明顯高於 100°C 酸水解，水解最適時間為 35 分鐘，植物性產品中香菇的最適水解條件為 120°C，15 分鐘或是 100°C 下水解 35 分鐘，黃豆則以 100°C 下水解 30-35 分鐘間較佳。綜合以上，顯示不同食品基質對水解條件確有不同之影響，推測可能與嘌呤相關物質與食品成分之結合型態不同有關。考量分析方法之簡便性需求，實驗結果建議一般食品中嘌呤含量分析之混合酸水解條件可為 100°C 下水解 35 分鐘，部份食品因基質效應的不同而有差異，需另行各別評估。

關鍵詞: 嘌呤含量、酸水解條件、食品基質、離子對高效層析

The Effect of Matrix on Acid Hydrolysis Conditions Related to Purine Content Determination

Shyi-Neng Lou* E-Mean Chiu Rei-G Wong Ke-Fang Hsu

Chia-Hao Zeng and Hsin-Mei Shih

Department of Food Science, National Ilan University

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the optimal acid hydrolysis condition related to the different food matrixes. Grass shrimp, pomfret, horse mackerel, shiitake and soybean, as various food matrixes, were hydrolyzed by a mixture of trifluoroacetic acid and formic acid during different conditions. The aliquot was then analyzed by ion-pair HPLC to quantify the purine content. The results indicated that the grass shrimp, pomfret and horse mackerel contained adenine, guanine and hypoxanthine, while the shiitake had the same profile as fishery products except a lower level of hypoxanthine. No hypoxanthine was observed in the soybean. The optimal hydrolyzed conditions of fishery product matrixes were evaluated. The highest total purine content in grass shrimp was obtained by acid hydrolysis for 30-40 min at 100°C, which the similar results was also found in the pomfret for 30 min at 100°C. However, the level of purine content was higher at 120°C hydrolyzed than at 100°C in the horse mackerel, the optimal duration for hydrolysis was 35 min for both of the temperature. The purine content of shiitake and soybean, as matrix of plant, were also investigated. The optimal hydrolysis condition for shiitake was at 120°C for 15 min, while the same level of purine content could be also obtained under 100°C for 35 min. The soybean could be hydrolyzed at 100°C for 30-35 min to get the highest purine content. Collectively, the condition of acid hydrolysis for purine content analysis was indeed affected by the different matrix. This phenomenon was probably related to the combined types between purine substance and food components. In consider the convenience of routine work, a suggestion was proposed that the proper acid hydrolysis condition of food system could be carried at 100°C for 35 min. However, some food matrixes might result in significant error, therefore, those should be evaluated individually.

Key Words: purine content, acid hydrolysis conditions, food matrix, ion-pair HPLC.

Corresponding Author: E-mail: snlou@niu.edu.tw

前 言

近年來國人罹患高尿酸血症和痛風症狀者日漸增加，高尿酸血症和痛風症均為代謝異常疾病，然而其與飲食中之嘌呤含量亦有相當之關連性，因此一般消費者對食品中之嘌呤含量極為關注(Clifford et al.,1976; Griebisch,A., 1978; Lou et al.,2005; 殷和李,1998)，然而有關食品中嘌呤含量之分析方法甚少完整之研究。長期以來，國內外進行食品中的嘌呤含量分析皆以酸水解法為主，再利用 HPLC 加以定量分析。早期均採用過氧酸在 100°C 下加熱 60 分鐘，以完全分解食品中之嘌呤相關物質形成嘌呤鹼基，再加以定量分析(Brulle,D.,1988,1989,1992; Fujii et al., 1971; Shinoda et al., 1982 ; Young,L.L 1982.,1983; Wolfram and Colling, 1987;何,1986)，此方法耗時較久且會造成鳥糞嘌呤、腺嘌呤以及黃嘌呤

等受熱破壞，分析結果回收率不佳(Herbel and Montag, 1987; lassek and Montag, 1987; Montag et al.,1989)。Lassek and Montag (1987)改採用三氟醋酸與甲酸混合液進行水解，並配合以高壓分解瓶裝置，於烘箱中 240°C，加熱 15 分鐘即可完全水解食品基質獲取嘌呤鹼基加以定量分析，回收率均在 83%以上。Lou and Montag(1994)以直接加熱器取代烘箱加熱，其水解條件縮短為 230°C，10 分鐘，可達相同的水解效果。本實驗室建立水產品嘌呤含量檢易測定法，改以一般試管於水浴鍋進行 90°C，14 分鐘之酸水解，並與傳統之過氧酸水解法比較，發現兩種方法的總嘌呤含量並無顯著差異，然而實際數值均有偏低之現象(駱和陳,1997)。有關食品中嘌呤物質的分析日益殷切(曾和林,1991;黃,1996)，而食品種類繁多各主要基質不同，以蛋白質為主的肉類和以澱粉或纖維素為主的植物類在酸水解的條件是否有所不同，皆不得而知。

本研究之目的在於探討不同食品基質下，嘌呤含量分析之水解條件是否有所差異。實驗以既有嘌呤含量分析條件為基礎，嘗試提升酸水解之溫度條件，於不同作用時間下觀察各類食品獲取最大總嘌呤含量之最適條件，並配合以 HPLC-PDA(Photodiarray Detector)偵測器更確切評估及定量嘌呤物質，以提供嘌呤含量分析方法之參考。

材料與方法

一、材料

(一) 樣品

不同食品基質以水產品和植物性高嘌呤產品等為樣品，分別有鱈魚(Horse mackerel)、白鯧(Pomfret)、草蝦(Grass shrimp)、乾香菇(Shiitake)和黃豆(Soybean)等試樣，均採購自宜蘭市傳統市場及超級市場，採樣後立即置於冰藏採樣箱中，運回實驗室後立即進行樣品處理。

(二) 試藥

三氟醋酸、甲酸等均購自RDH Chemical Co., (Seelze, Germany)，磷酸二氫胺((NH₄)H₂PO₄)、N' N' -Dimethyloctylamine等均為Merck GR級(Darmstadt, Germany)，嘌呤鹼基標準試劑Hyp(hypoxanthine, 次黃嘌呤)、Ade(adenine, 腺嘌呤)、Gua(guanine, 鳥糞嘌呤)、Xan(xanthine, 黃嘌呤)等均購自Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA)。

二、方法

(一) 樣品製備

水產品取可食肉部份，魚體則不連皮予以細碎混合均勻，經凍結乾燥機(Labconco, Germany)於-50℃下凍結乾燥 48 hrs 後，以研磨機(Iteicator 400 W, Sweden)研磨成細末，置入褐色樣品瓶中，貯存於-20℃冷凍櫃中備用。而乾香菇及黃豆樣品則直接研磨成粉末後，經相同條件凍結乾燥後，貯存於-20℃冷凍櫃中備用。

(二) 總嘌呤含量測定

參考 Benkmann (1995)和 Lou et. al. (2005a,b)的方

法加以修飾後，對不同食品基質樣品進行不同時間酸水解處理，再以高效液相層析儀分析嘌呤物質含量。

1. 酸水解處理

稱取約 100 mg 樣品於加蓋螺旋玻璃試管中，加入 0.5 mL 蒸餾水及 5 mL 三氟醋酸及甲酸 (1:1) 之混合分解液，振盪均勻後，分別置入水浴鍋中在 100 °C 或是油浴鍋中 120 °C 下，加熱 15 至 45 分鐘後，迅速流水冷卻，再以蒸餾水洗入圓底燒瓶中，於 50°C 下減壓濃縮，加水濃縮三次至完全乾燥且無酸味後，加入 5 mL 緩衝溶液 (0.02 M (NH₄)H₂PO₄ + 2.5 mM Dimethyloctylamine, pH = 3.2) 溶解之，經 0.22 μm 濾膜過濾，以 HPLC 分離定量嘌呤含量。

2. 離子對高效液相層析儀 (Ionic pair-HPLC) 之分析條件

HPLC 採用 Shimazu Chromatograph System, Japan.

層析管：Lichrospher 5C18, 4.6×250 mm (Merck, Germany)

移動相：0.02 M KH₂PO₄+ 2.5 mM Dimethyloctylamine, pH = 3.2

檢出器：UV 254 nm, SPD-M6A 陣列式偵測器 (Shimazu, Japan)

流速：1 mL/min

注入量：20 μL

3. 嘌呤含量之計算

嘌呤含量之定性以檢液所得波峰之滯留時間與外在標準試劑比較鑑別，並以陣列式 UV 偵測器掃描圖譜確定之。定量方式則以檢液所得波峰面積與標準試劑之標準曲線比較換算後得知。總嘌呤含量為個別嘌呤含量之總和，即總嘌呤含量(Total purine)= Ade + Gua + Hyp + Xan。

結果與討論

一、以水產品為基質探討 含量分析之水解條件

水產品一般被歸類為中高嘌呤含量食品，嘌呤含量大多超過 100 mg/100g 以上。(Montag et. al.,1989; Herbel and Montag,1987; Brule et. al.,1988; Wolfram and Colling,1987; Shinoda et. al., 1981; 何威德,1986; 駱等,1996)。一般消費者皆極關注其嘌呤含量高低與痛風症狀間之關係。因此，本實驗選取水產品作為食品基質，探討水解條件對測定嘌呤含量之影響，藉以代表動物性產品之性狀。實驗選取三種樣品，分別為養殖草蝦、海水魚之白鯧與鰻魚等，其總嘌呤含量分別為 178.1、109.8 和 93.0 mg/100g (駱等,1996)。

圖一為草蝦經由 100°C 和 120°C 酸水解 15 至 45 分鐘之嘌呤含量分析結果，發現其嘌呤含量以 Ade 為最高，其次為 Hyp，含量最低的為 Gua。比較不同溫度與時間之影響效應，可知水解 20 至 45 分鐘內，均以 100°C 水解所得之嘌呤含量明顯高於在 120°C 下水解。且在 100°C 下水解 20 至 45 分鐘內，其 Ade、Gua 和 Hyp 等嘌呤物質之變化並無明顯之差異，在 30 至 40 分鐘間達最高，其含量在 5.23-5.25 mg/g dry matter 之間。然而，120°C 下酸水解 20 至 45 分鐘時，發現總嘌呤含量水解 35 分鐘時最高，約為 5.03 mg/g dry matter，其後則有緩慢減少的現象。這些結果顯示，120°C 酸水解可能導致嘌呤物質的降解情形較 100°C 下水解嚴重，也因而造成其分析結果的偏低。同時，如為長時間水解更會明顯的破壞草蝦的嘌呤物質，有關高溫水解造成嘌呤物質損失的研究已有報告可為佐證(Herbel and Montag,1987; Lassek and Montag, 1987)。草蝦嘌呤含量分析的水解條件應可以在 100°C 酸水解 30 至 40 分鐘間進行。

水解溫度與時間對白鯧魚嘌呤含量分析之影響如圖二，其嘌呤含量多寡依序為 Hyp、Gua 和 Ade，在 100°C 下進行酸水解 20 至 45 分鐘時，所得各類嘌呤含量均較以 120°C 下酸水解為高，其總嘌呤含量於水解 30 分鐘時達最高，約為 3.90 mg/g dry matter。之後隨水解時間的延長而緩緩下降，水解 20 分鐘時，其嘌呤含量明顯較為偏低，顯示水解時間較低可能會有水解程度不足之現象。以 120°C 進行水解的結果，發現在水解 30 至 35 分鐘時可得最

高含量，約在 3.50 mg/g dry matter，其隨水解時間變化趨勢亦與 100°C 下水解之情形相似，但是其分析所得含量均較 100°C 低，推測可能與草蝦類似，其因高溫破壞嘌呤物質之程度大於分解所產生之程度，導致於高溫反而獲得較低之分析結果。

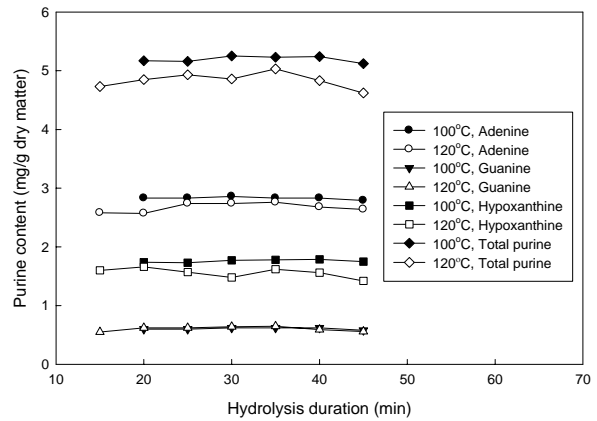


圖1 不同水解條件對草蝦嘌呤含量之影響

Fig. 1 Effect on purine content of grass shrimp hydrolyzed for various duration at 100 and 120°C

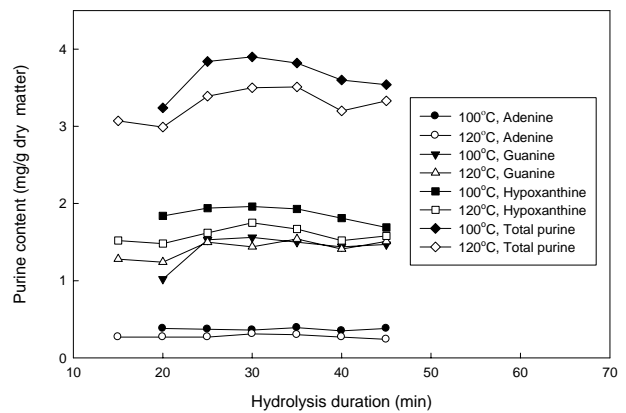


圖2 不同水解條件對白鯧嘌呤含量之影響

Fig. 2 Effect on purine content of pomfret hydrolyzed for various duration at 100 and 120°C

在相同的酸水解處理條件下，鰻魚嘌呤含量的分析結果與草蝦和白鯧有所不同(圖三)。其總嘌呤含量較高，約在 8 至 10 mg/g dry matter 之間，Hyp 和 Gua 等嘌呤含量相近，Ade 含量則最低。比較不同溫度之影響，發現在 120°C 下酸水解所得之個別和總嘌呤含量皆明顯高於 100°C 酸水解，且總嘌呤含量隨水解時間的延長而增加，至水解 35 分鐘時

達最高，之後又隨水解時間延長而緩慢下降，在 100℃ 下酸水解時，最佳條件亦在水解 35 分鐘。上述現象與草蝦和白鯧在 100℃ 下水解較 120℃ 為佳之結果不同，顯示不同基質確實會造成最佳水解條件之差異。本實驗採用加熱酸水解進行嘌呤物質分析，將生物體內所含嘌呤相關物質完全水解生成嘌呤鹼基，再以 HPLC 分析定量之，加熱酸水解效應一方面經由分解嘌呤物質產生嘌呤鹼基，另外一方面也同時破壞已經產生之嘌呤鹼基，因此實驗方法均取其最佳之平衡點。鱈魚嘌呤含量的分析結果以較高溫度之 120℃ 水解較佳，推測原因可能為其破壞嘌呤鹼基之程度遠小於分解產生嘌呤鹼基之程度。另外，是否因為鱈魚基質含較多結合態之嘌呤物質，因此需要較高之水解溫度予以分解，其確切原因仍有待進一步研究解明。

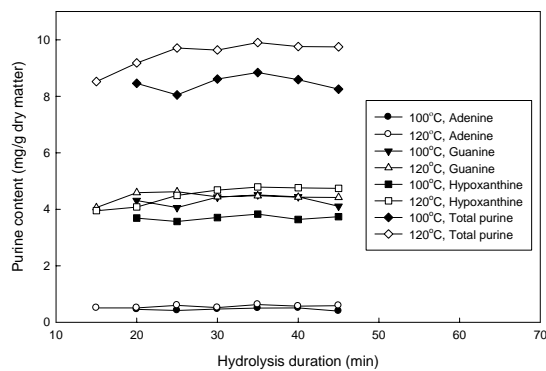


圖3 不同水解條件對鱈魚嘌呤含量之影響
Fig. 3 Effect on purine content of horse mackerel hydrolyzed for various duration at 100 and 120°C

綜合以上，水產品嘌呤含量分析之水解條件依照產品不同會有不同之影響，草蝦水解條件以 100℃ 下水解 35-40 分鐘為佳，白鯧則在 100℃ 下水解 30 分鐘較佳，而鱈魚之最佳條件則在 120℃ 下水解 35 分鐘，可得 9.90 mg/g dry matter，而在 100℃ 下水解 35 分鐘也可獲得較佳之嘌呤含量，其值達 8.84 mg/g dry matter。顯然，一般水產品之嘌呤含量分析可以 100℃ 水解 30-40 分鐘為酸水解之條件，但是部份產品則以 120℃ 水解為佳，水解時間亦為 35 分鐘。

二、以香菇和黃豆為基質探討 含量分析 之水解條件

為探討植物性產品基質對嘌呤水解條件之影響，研究採用屬中高嘌呤之香菇與黃豆為實驗基質

進行不同時間與溫度之水解，香菇在不同水解條件下所得之嘌呤含量結果如圖四，香菇之嘌呤物質含量以 Ade 含量為最高，其次為 Gua 含量，Hyp 含量則屬最低，此點與動物性產品之高 Hyp 含量有所不同。觀察不同水解時間之影響可知 120℃ 酸水解條件下，總嘌呤含量明顯隨加熱時間之延長而下降，以水解十五分鐘時含量最高，約為 4.47 mg/ g dry matter。Ade 和 Gua 含量也有相同的下降趨勢。在 100℃ 下水解，總嘌呤含量以水解 35 分鐘時為最佳，總嘌呤含量達 4.32 mg/g dry matter，隨後亦呈現下降之現象。溫度之效應發現在 120℃ 下水解短時間(<30 分鐘)較 100℃ 下水解為佳，長時間(≥ 35 分鐘)進行酸水解則以 100℃ 較 120℃ 所獲得之嘌呤含量為高。顯示香菇之基質特性與水產品之高蛋白質基質不同，其對嘌呤含量分析條件亦造成不同之影響。

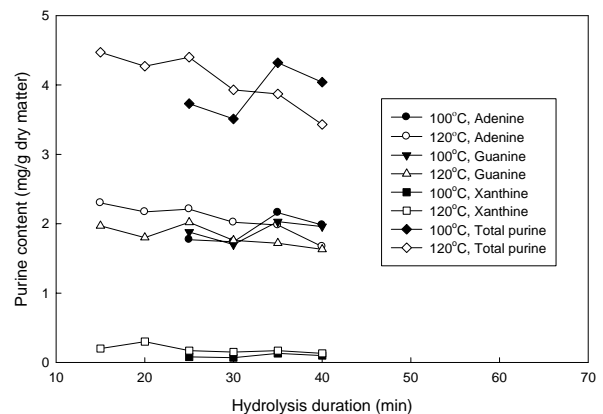


圖4 不同水解條件對香菇嘌呤含量之影響
Fig. 4 Effect on purine content of shiitake hydrolyzed for various duration at 100 and 120°C

以黃豆為基質探討嘌呤分析之水解條件，發現黃豆之主要嘌呤鹼基為 Ade 和 Gua，其並未具有 Hyp 等代謝產生之嘌呤鹼基（圖五），顯示植物性產品與動物性產品之嘌呤物質基本差異。比較水解時間對嘌呤含量的影響，發現在 100℃ 下水解 30 至 45 分鐘間，總嘌呤含量隨時間延長而些微下降，水解 30 分鐘時為 1.51 mg/g dry matter，水解 35 分鐘亦達 1.50mg/g dry matter。兩者之間並無顯著差異。在 120℃ 下水解 35 分鐘較 30 分鐘效果為佳，但是其含量

僅達 1.48 mg/g dry matter。比較水解溫度結果均以 100°C 水解之效果大於 120°C 下水解。顯示，黃豆之嘌呤分析水解條件應以 100°C 水解 30 或 35 分鐘為佳。

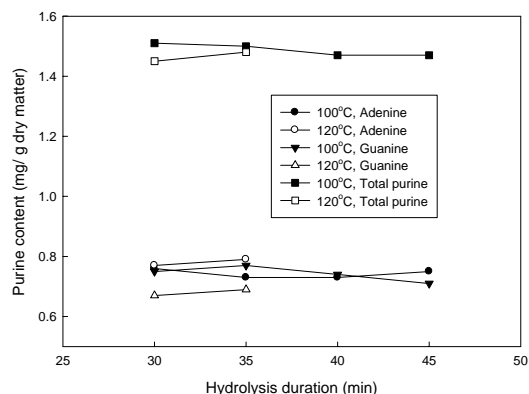


圖5 不同水解條件對黃豆嘌呤含量之影響

Fig.5 Effect on purine content of soybean hydrolyzed for various duration at 100 and 120°C

綜合以上，植物性產品香菇與黃豆之基質特性造成嘌呤含量分析水解條件之差異，整合兩產品之最佳水解條件可歸納為 100°C 下水解 35 分鐘。整體而言，嘌呤含量分析之酸水解條件應可採用 100°C 下水解 35 分鐘，以獲得普遍較佳之嘌呤含量回收率，其可適用於部分高嘌呤之水產品與植物性產品如香菇、黃豆等，但是個別產品之基質效應各有不同，因此其最佳分析條件亦會有差異。

結 論

草蝦、白鯧和香菇之最佳水解條件在 100°C 下水解 35 分鐘，但是屬紅肉魚之鮭魚的最佳條件則在 120°C 水解 35 分鐘，植物性之黃豆在 100°C 下水解 30 分鐘，可得最高之含量。顯然不同食品基質其最佳水解條件有所不同，考量分析方法之簡便性，本研究建議食品中嘌呤含量分析之水解條件應可採用三氟醋酸與甲酸之混合酸，在 100°C 下水解 35 分鐘。但是部份食品基質可能造成相當之誤差，必要時應另行個別評估。

參考文獻

- 何威德。1986。台灣常用食品的嘌呤和嘧啶含量之分析。中華營誌。12: 41-62。
- 殷光達、李光倫。1998。痛風。當代醫學。25: 68 - 69
- 黃貽鈺。1996。痛風之預防與藥物治療。藥學雜誌。12: 143 - 148
- 曾碧萊、林明芳。1991。高尿酸血症與痛風。醫院藥學。8: 162 - 166
- 駱錫能、陳翠瑤。1997。水產品嘌呤含量定量方法的建立。食品科學。24: 1-11。
- 駱錫能、陳翠瑤、陳輝煌。1996。水產品嘌呤含量的分析。中華營誌。21: 433-444。
- Benkmann, R. 1995. Nucleostoff-Verteilung in definiertem Schlachtfleisch, Dissertation, Inst. Biochem. and Lebensm.-chem., Uni. Hamburg, Germany.
- Brule, D., G. Sarwar, and L. Savoie. 1988. Purine content of selected canadian food products. J. Fd. Comp. Anal. 1: 130-138.
- Brule, D., G. Sarwar and L. Savoie. 1989. Effect of methods of cooking on free and total purine bases in meat and fish. Can. Inst. Food Sci. Technol. 22: 248-251.
- Brule, D., G. Sarwar and Savoie, L. 1992. Changes in serum and urinary uric acid levels in normal human subjects fed purine-rich foods containing different amount of adenine and hypoxanthine. J. Am. Coll. Nutr. 11: 353-358.
- Clifford, A.J., J.A. Riumallo., V.R. Uoung. and N.S. Scrimshaw. 1976. Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans. J. Nutr. 106: 428-434.
- Fujii, Y., J. Yamada and T. Onishi. 1971. Studies on silvering of fish skin-I. Purines in the skin of cultured salmon and trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 37: 55-62.
- Gribsch, A. 1978. Purine, aus: Allgemeine und spezielle klinische Ernährungslehre. Bd. II. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Herbel, W. and A. Montag. 1987. Nucleostoffe in

- proteinreichen Lebensmitteln ,Z. Lebensm. Unters. Forsch. 185: 119-122.
- Lassek, E. and A. Montag. 1987. Bestimmung der einzelnen purin und pyrimidinbasen in kohlenhydratreichen Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 184: 361-367.
- Lou, S.N. 1998. Change in purine content of grass shrimp during storage as related to freshness. J. Food Sci. 63: 442-444.
- Lou, S.N., H.H. Chen, P.Y. Hsu, and D.H. Chang. 2005a. Changes in purine content of tilapia surimi products during processing. Fisher. Sci. 71: 889-895.
- Lou, S.N., K.H. Fan, H.H. Chen, T.Y. Chen, C.L. Wang and Y.P. Tu. 2005b. Changes in purine related compounds of milkfish surimi based products during processing. Taiwanese J. Agri. Chem. Fd. Sci.. 43: 8-15.
- Lou, S.N. and A. Montag. 1994. Change in the nucleostatus of mushrooms during storage and thermal processing. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 90: 278-284.
- Montag, A., I. Koelling, S. Jaenicke, R. Benkmann and S.N. Lou. 1989. Purine bases contents in foods. Akt. Ernaehr, 14: 243-247.
- Shinoda, T., Y. Aoyagi and T. Sugahara. 1981. Contents of purine bases in fishes and fish products. J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci. 34: 153-162 .
- Shinoda T, Y. Aoyagi and T. Sugahara. 1982. Purine base contents in foods and effects of cooking methods. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 35: 103-109.
- Wolfram, G. and M. Colling. 1987. Gesamt puringehalt in ausgewaehlten Lebensmitteln. Z. Ernaehrungswiss. 26: 205-213.
- Young, L.L. 1982. Purine content of raw and roasted chicken broiler meat. J. Food Sci. 47: 1374-1375.
- Young, L.L. 1983. Effect of stewing on purine content of broiler tissues. J. Food Sci. 48: 315-316.

96年01月05日投稿

96年04月09日接受