

微波辅助萃取冬枣环磷酸腺苷工艺研究

崔志强, 孟宪军

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 研究利用微波辅助萃取MAE(microwave-assisted extraction)提取冬枣中环磷酸腺苷的新方法。以高效液相色谱法HPLC(high performance liquid chromatography)定量测定所萃取的环磷酸腺苷。采用正交试验考察浸泡时间、处理时间、微波功率和料液比对环磷酸腺苷提取率的影响, 确定最佳工艺条件为: 微波功率200W、浸泡时间6h、处理时间3min、料液比1:20。

关键词: 微波辅助萃取; 冬枣; 环磷酸腺苷; HPLC

Study on Microwave-assisted Extraction of cAMP from Winter-Dates

CUI Zhi-qiang, MENG Xian-jun

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110160, China)

Abstract: The extraction technology of the cAMP from winter-dates with microwave-assisted extraction was studied, and cAMP was analyzed by HPLC (high performance liquid chromatography) method. Several factors, such as marinated time, extraction time, microwave power and ratio of material and liquor were investigated and the appropriate MAE (microwave-assisted extraction) conditions were obtained from the orthogonal test. The optimal MAE conditions are as follows: microwave power 200W, marinated

收稿日期: 2006-04-24

作者简介: 崔志强(1973-), 男, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为果蔬活性物质提取。

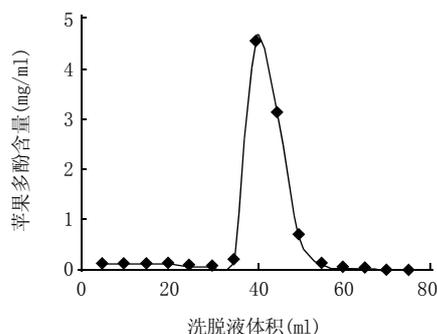


图9 超声波提取法提取苹果多酚的动态洗脱曲线

Fig.9 Dynamic desorption curve of AP with ultrasonic extraction

糖及杂质, 再用60%乙醇洗脱, 洗脱速度为0.5ml/min, 其洗脱曲线如图9所示。由图9可以看出, 当洗脱体积为38~45ml时, 洗脱液中的苹果多酚含量达到最大值。

3 结论

在AB-8大孔树脂对苹果多酚的分离纯化中, 当供试液苹果多酚含量为1.648mg/ml, 以60%乙醇作洗脱剂, 进样速度为1ml/min, 洗脱流速为0.5ml/min, 则苹果多酚的纯度可由原来的0.759%提高到39.98%, 纯度提高了

52倍。AB-8大孔树脂法纯化苹果多酚虽然能使其纯度得到较大程度的提高, 但还不够理想, 若想得到纯度更高的苹果多酚还需结合其他的分离纯化方法。

参考文献:

- [1] W09739632[P]. 1997-10.
- [2] BAGEHI D, GARQ A, KROHN R L, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and vitamins E, and a grape seed proanthocyanidins extract *in vitro*[J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1986, 25: 223.
- [3] LUYing-rong, FOYY. Identification and quantification of major polyphenol in apple pomace[J]. Food Chemistry, 1997, 59: 187-194.
- [4] DELAGE E, BOHUON G, DRILLEAU J F. High-performance of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties[J]. Journal of Chromatography, 1991, 555: 125-136.
- [5] BURDA S, OLESZEK W, LEE C Y. Phenolic compound and their changes in apples during maturation and cold storage[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 945-948.
- [6] SPAN, RONALD E, WROLSTAD, DAVID A, H. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 1478-1487.
- [7] 吕远平, 姚开, 何强, 等. 树脂法纯化茶多酚的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(10): 64-66.

time 6 hours, extraction time 3 minutes and ratio of material and liquor 1:20.

Key words: MAE; winter-date; cAMP; HPLC

中图分类号: TS255

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0163-04

环磷酸腺苷 cAMP^[1-2](cyclic adenosine 3',5' monophosphate) 为当今分子生物学研究的重要内容之一, cAMP 是核苷酸的衍生物, 为蛋白激酶致活剂。它是生物界普遍存在的一种生物活性物质, 一般含量极微, 具第二信使作用(激素为第一信使), 参与广泛的生理生化过程的调节。基础医学研究证明至少 40 多种疾病(包括癌症、高血压、冠心病、心肌梗塞和心源性休克等重大疾病)与 cAMP 的代谢有关, 临床医学研究证明 cAMP 能舒张平滑肌、扩张血管、改善肝功能、激活蛋白, 并对心肌梗塞、冠心病、心源性休克、牛皮癣等疾病有显著疗效。冬枣是山东、河北等地的一种特有枣果品种, 品质优良, 它是枣果中的晚熟品种, 又名冻枣、雁来红。冬枣口感极佳, 而且营养丰富, 不但含有较多量的 VC, 还含有钾、钙、镁、钠以及铁、锌、铜、锰、硒等多种微量元素; 另外还含有多种氨基酸和环磷酸腺苷。

微波萃取即微波辅助萃取技术, Ganzler 于 1986 年首次提出^[3], 是颇具发展潜力的一种新的萃取技术, 被广泛应用于天然产物化学成分的提取。本文以微波萃取方法, 结合高效液相色谱分析技术, 研究 cAMP 的分离萃取效果, 为冬枣深加工和工业化应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

冬枣市售, 充分成熟, 无霉变、软化和酒化。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

Waters 600E 液相色谱仪包括 Waters 2487 紫外检测器、Waters 600E 在线脱气机、Waters 600E 高压泵、Rheodyne 7725 手动进样器、Waters Millennium^{3.2} V3.2 色谱工作站。MAS-1 微波快速制样系统 上海新仪微波化学科技有限公司; LG10-2.4A 高速离心机 北京医用离心机厂。HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; JD 200-2 电子天平 沈阳龙腾电子秤量仪器有限公司; HZQ-F 全温振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.2.2 试剂

cAMP 标准品(纯度 99%) Sigma 公司; 甲醇、磷酸二氢钾(色谱纯) 迪马公司; 乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、丙酮、氯仿均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 预处理

将冬枣清洗, 切片, 真空干燥(70℃, 95kPa), 粉碎过 60 目筛。

1.3.2 溶剂筛选

取水、乙醇、甲醇、丙酮、氯仿、浓度 30%~70% 的乙醇溶液、pH3.0~8.0 的缓冲溶液进行常规浸提, 料液比为 1:15, 常温下浸泡 12h, 以 3000r/min 转进行离心分离 5min, 取其上清液置入 50ml 容量瓶中, 残渣加相应溶剂提取两次, 每次 5ml, 振摇 10min, 用与上述相同的条件进行离心分离, 所得上清液并入上述容量瓶中, 最后定容至刻度。过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 测定^[4]。

1.3.3 水浴法

取冬枣粉末, 精密称定 1.00g, 加 40ml 水, 在沸腾的水浴中加热 30min, 冷却, 提取液按前述方法进行处理。过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 测定^[4]。

1.3.4 微波辅助萃取

准确称取冬枣粉 1.00g, 放入圆底烧瓶中, 并加入适量蒸馏水混匀, 按各种条件(浸泡时间、处理时间、功率、液固比)在冷凝回流状态下进行微波萃取, 提取液按前述方法进行处理, 过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 检测。采用正交优化法对工艺各参数进行优化比较^[5-9]。

1.3.5 色谱条件

色谱柱为 Hypersil-ODS2(25cm × 4.6mm, 5 μm) 柱, 流动相为 V(甲醇):V(0.05mol/L 磷酸二氢钾)=10:90, 流速 1.0ml/min, 紫外检测器 UV254.0nm × 0.2AUFS, 柱温 30℃, 进样量 15 μl^[4,10-14]。

1.3.6 标准曲线

取 cAMP 标准品适宜, 精密称定, 加水溶解后, 配制成浓度为 1、2、5、10、50 μg/ml 的溶液。分别取上述溶液各 15 μl 注入液相色谱仪, 在前述色谱条件下进行分析, 记录色谱峰面积。标样图谱如图 1 所示。在 1.0~50.0 μg/ml 浓度范围内, 色谱峰面积与样品量呈线性关系, 如图 2 所示。

2 结果与分析

2.1 溶剂筛选结果

查阅相关资料^[15-16], cAMP 微溶于水, 因此选择上述溶剂进行对比试验, 结果如表 1 所示。根据上述结果, 尽管 pH5.0 的缓冲溶液的提取率大于水, 但考虑到成本问题, 仍然选择水作为提取溶剂。

表1 提取结果
Table 1 Extraction results

溶剂	水	30% 乙醇	40% 乙醇	50% 乙醇	60% 乙醇	70% 乙醇	pH3.0 缓冲溶液	pH4.0 缓冲溶液
结果(μg/g枣粉)	129.08	90.15	未检出	未检出	未检出	未检出	76.94	52.68
溶剂	pH5.0 缓冲溶液	pH6.0 缓冲溶液	pH7.0 缓冲溶液	pH8.0 缓冲溶液	乙醇	丙酮	氯仿	甲醇
结果(μg/g枣粉)	155.76	108.83	95.11	72.86	未检出	未检出	未检出	未检出

注: 上述缓冲溶液采用磷酸氢二钠-柠檬酸按比例配制。

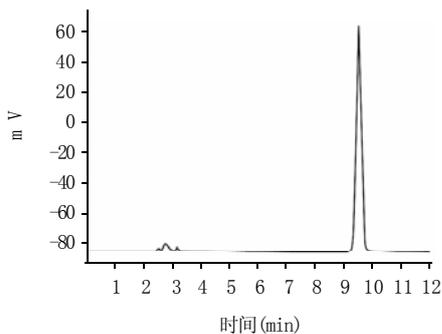


图1 cAMP 标准样品高效液相色谱图(50 μg/ml)

Fig.1 HPLC spectrum of cAMP standard sample(50 μg/ml)

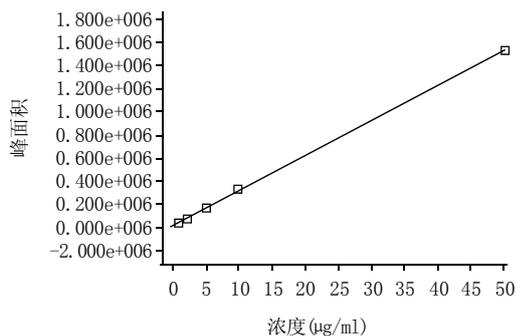


图2 cAMP 标准曲线

Fig.2 Standard curve of cAMP

2.2 水浴法与微波萃取法的比较

通过测定, 在选择相同的溶剂水的情况下, 微波萃取法的提取率明显高于水浴法, 结果如表2所示。

表2 提取结果
Table 2 Extraction results

提取方法	水浴法	微波辅助萃取
提取率(μg/g枣粉)	139.10	239.30

2.3 微波辅助萃取工艺

选择微波功率、浸泡时间、处理时间和料液比四个因素进行单因素试验, 在此基础上进行L₉(3⁴) 正交试验, 确定最佳提取条件。

2.3.1 微波功率对提取率的影响

在料液比1:25, 浸泡时间12h, 处理时间1min的条件下, 选取200、300、400、500、600W五个功率水平考察对cAMP提取率的影响, 结果如图3所示。

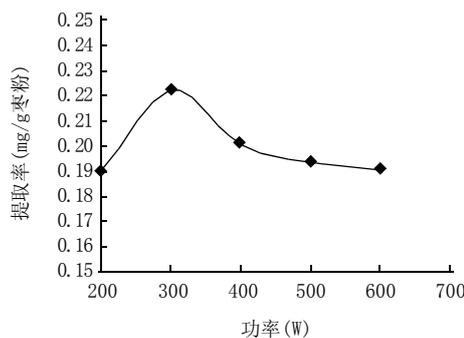


图3 微波功率对提取率的影响

Fig.3 Effects of microwave power on extraction rate

随着微波功率的增加, 提取率增加, 在300W时达到最高值, 以后功率提高, 提取率反而呈现下降趋势。这可能是高功率的微波造成cAMP分子的损失。综合考虑, 选择200、300、400W三个水平进行正交试验。

2.3.2 浸泡时间对提取率的影响

在微波功率300W, 料液比1:25, 处理时间1min的条件下, 选取0、6、12、18、24h五个浸泡时间水平考察对cAMP提取率的影响, 结果如图4所示。随着浸泡时间的延长, 提取率增加, 在6h时达到最高值, 以后浸泡时间延长, 提取率反而呈现下降趋势。这可能是由于过多杂质溶出, 吸附cAMP分子造成的。综合考虑, 选择4、6、8h三个水平进行正交试验。

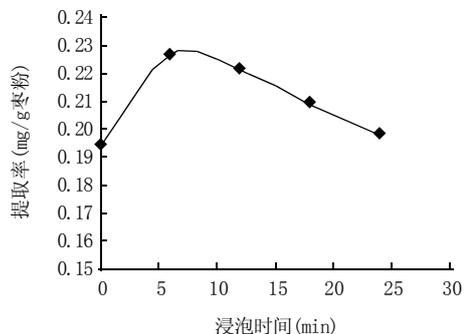


图4 浸泡时间对提取率的影响

Fig.4 Effects of marinated time on extraction rate

2.3.3 处理时间对提取率的影响

在微波功率300W, 料液比1:25, 浸泡时间6h的条件下, 选取1、2、3、4、5min五个处理时间水平

对 cAMP 提取率的影响, 结果如图 5 所示。随着处理时间的延长, 提取率逐渐增加, 在 2min 后, 提取率变化趋于平稳。综合考虑, 选取 1、2、3min 三个水平进行正交试验。

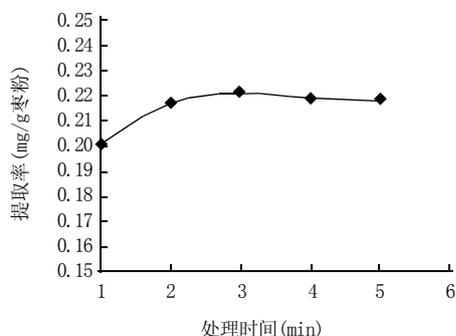


图 5 处理时间对提取率的影响

Fig.5 Effects of extraction time on extraction rate

2.3.4 料液比对提取率的影响

在微波功率 300W, 浸泡时间 6h, 处理时间 2min 的条件下, 选取 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 五个料液比水平考察对 cAMP 提取率的影响, 结果如图 6 所示。随着料液比的上升, 提取率增加, 1:15 后, 提取率变化趋于平稳。综合考虑, 选取 1:15、1:20、1:25 三个水平进行正交试验。

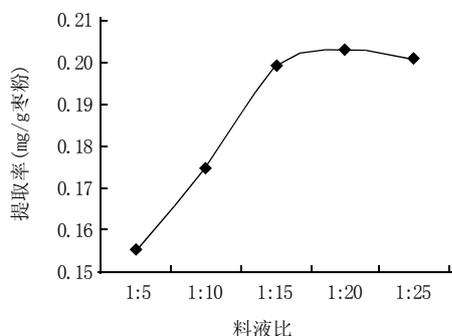


图 6 料液比对提取率的影响

Fig.6 Effects of ratio of material to liquor on extraction rate

2.3.5 正交试验

按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 结果及数据处理见表 3。由极差分析可知, 各因素对 cAMP 提取率影响的大小排序为: 功率 > 处理时间 > 料液比 > 浸泡时间。微波萃取的最优化条件为: 微波功率 200W、浸泡时间 6h、处理时间 3min、料液比 1:20。

3 结论与讨论

根据 Sutherland 提出的第二信使学说^[16]: 激素作为“第一信使”与靶细胞膜上的受体结合, 再通过激活效应酶腺苷环化酶催化 ATP 产生 cAMP, cAMP 作为第

表 3 正交试验结果及极差分析
Table 3 Result of orthogonal test and range analysis

试验号	因素				试验结果
	1 料液比	2 功率	3 浸泡	4 处理时间	
1	1	1	1	1	217.06
2	1	2	2	2	180.72
3	1	3	3	3	205.75
4	2	1	2	3	239.30
5	2	2	3	1	190.81
6	2	3	1	2	201.00
7	3	1	3	2	220.63
8	3	2	1	3	221.91
9	3	3	2	1	194.07
均值 1	201.177	225.663	213.323	200.647	
均值 2	210.370	197.813	204.697	200.783	
均值 3	212.203	200.273	205.730	222.320	
极差	11.026	27.850	8.626	21.673	

二信使, 引起一连串的胞内反应并产生生理效应。因此 cAMP 属于胞内的一种活性物质, 而微波所特有的细胞破碎作用, 无疑可以加速胞内 cAMP 的释放。这一点可以解释微波法的提取率远高于水浴法。

微波萃取冬枣中 cAMP 的最优化条件为: 微波功率 200W、浸泡时间 6h、处理时间 3min、料液比 1:20。在此条件下, cAMP 的提取率为 239.30 $\mu\text{g/g}$ 枣粉。

参考文献:

- [1] CYONG J C, KIYOMICHI H. Cyclic adenosine monophosphate in the fruit of ziziphus jujuba[J]. Phytochemistry, 1980, 19: 2747.
- [2] HANABUSA K, CYONG J C, TAKAHASHI M. High level of cyclic AMP in the jujube plum[J]. Planta Medica, 1981, 42: 380-384.
- [3] GANZLER K. Microwave extraction—a novel sample preparation method for chromatography[J]. Chromatography, 1986, 371: 299-306.
- [4] 冯年平, 沈岚, 韩朝阳, 等. 决明子微波萃取法与常用提取方法的比较[J]. 中成药, 2004(3): 189-191.
- [5] 李安平, 谢碧霞. 桔黄色素微波萃取的研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(1): 16-19.
- [6] 王巧娥, 沈金灿, 于文佳, 等. 甘草中甘草酸的微波萃取[J]. 中草药, 2003(5): 407-409.
- [7] 王伟华, 于国萍, 张立冬. 番茄红素微波萃取工艺条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 2004(5): 564-567.
- [8] 吴世斌, 葛跃, 耿莉, 等. 高效液相色谱法测定环磷酸腺苷及其制剂的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2001(1): 32-33.
- [9] 李学贵, 蒋文强, 王传芬. HPLC法测定大枣提取液中环腺苷含量的研究[J]. 山东化工, 2005(5): 9.
- [10] 王慕邹. 常用中草药高效液相色谱分析[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [11] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [12] 王向红. 枣果主要活性成分分析方法及其综合加工技术研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [13] 云自厚. 液相色谱检测方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] 何华. 现代色谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [15] 孙彦. 生物分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [16] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995.