

# 金丝小枣环磷酸腺苷提取工艺优化

姜大勇<sup>1</sup>, 王佩玉<sup>1</sup>, 李晓静<sup>2</sup>, 解恒杰<sup>1</sup>, 刘立文<sup>1</sup>, 邵华伟<sup>1</sup>

1. 山东省食品药品检验研究院, 产业技术基础公共服务平台, 山东济南

2. 山东省水利勘测设计院有限公司, 山东济南

**摘要:**以水为溶剂, 采用回流法提取金丝小枣中的cAMP, 并利用高效液相色谱法(HPLC)对提取物中的cAMP含量进行定量分析。以cAMP提取含量及回收率作为综合评价指标, 系统考察并比较了不同提取纯化方案的效果。确定了最佳提取纯化工艺为: 使用D293阴离子交换树脂进行富集纯化, 最佳操作条件为上柱枣汁pH6.0, 上柱流速控制为3mL/min; 以0.05mol/LHCl溶液作为洗脱剂, 控制洗脱流速为1.5mL/min; 收集洗脱液后用氨水调节pH至中性(7.0), 最后采用氧化铝柱进行脱色处理。该优化工艺能高效、稳定地提取金丝小枣中的环磷酸腺苷, 为其深度开发与利用提供了可靠的技术依据。

**关键词:** 金丝小枣; 环磷酸腺苷(cAMP); 离子交换树脂; 提取工艺优化

---

## Optimization of the Extraction Process of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) from Leling Golden Silk Small Jujube

Dayong Jiang, Peiyu Wang, Xiaojing Li, Hengjie Xie, Liwen Liu, Huawei Shao

1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Industrial Public Technical Service Platform, Jinan, Shandong

2. Shandong survey and Design Institute of Water Conservancy Co., LTD, Jinan, Shandong

**Abstract:** Using water as the solvent, cAMP was extracted from the jujubes by the reflux extraction method. The cAMP content in the extracts was quantitatively analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The extraction yield and recovery rate of cAMP were used as comprehensive evaluation indicators to systematically investigate and compare the effects of different extraction and purification schemes. The optimal extraction and purification process was determined as follows: enrichment and purification using D293 anion exchange resin, with the optimal conditions being the pH of the jujube juice for loading at 6.0 and a loading flow rate of 3 mL/min; using a 0.05 mol/L HCl solution as the eluent with an elution flow rate controlled at 1.5 mL/min; the collected eluate was adjusted to a neutral pH (7.0) with ammonia water, followed finally by decolorization using an alumina column. This optimized process can efficiently and stably extract cAMP from Leling Golden Silk Small Jujube, providing a reliable technical basis for its further development and utilization.

**Keywords :** Leling Golden Silk Small Jujube; Cyclic adenosine monophosphate (cAMP); Anion exchange resin; Extraction process optimization

---

\* 作者简介: 第一作者: 姜大勇(1982-), 男, 本科, 高级工程师, 研究方向: 食品科学与工程。通讯作者: 李晓静(1984-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 环境科学。

## 1 引言

枣含有丰富的营养成分,一般含糖76%~88%,含酸0.2%~1.6%,每100g含维生素C397~384.5mg,枣含水量较低,干物质较高,出干率为69~71%[1-3]。枣还含有维生素P、维生素A、维生素B和黄酮类物质环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)等[4,5],故枣又有“天然维生素”的美誉。

环磷酸腺苷是金丝小枣中一种重要的生物活性物质[6,7],具有增强免疫力、改善心血管功能、抗过敏等多种生理功效[8]。高效、高得率地从枣中提取cAMP一直是食品科学和中药学研究的热点[9]。本研究以金丝小枣为材料提取纯化获得高纯度的cAMP,为从枣等天然植物工业化生产cAMP药品和功能性食品奠定了基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

金丝小枣:选取无霉变金丝小枣去核后经40℃干燥,粉碎后过60目筛,室温条件下密封保存。

实验试剂:纯度99.9% cAMP标准品,美国Sigma公司;氢氧化钠(分析纯),盐酸(分析纯),硝酸银(分析纯),D293阴离子交换树脂,732阳离子交换树脂,95%酒精,氢氧化钡(分析纯);蒸馏水,自制。

### 2.2 仪器与设备

高压液相色谱仪(包括WatersTM600高压泵、WatersTM486可变波长检测器、N-2000双通道色谱工作站),美国Agilent公司;HZQ-Q离心机,上海安亭科学仪器有限公司;BSZ-100自动收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司;HD-3紫外检测仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;AL204电子天平,梅特勒托利多有限公司。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 枣汁的制备方法

目前枣汁的制备多采用醇提,本实验采用沸水

浸提15分钟[10],收率得到了有效的提高,浸提结果如表1。

#### 2.3.2 样品的预处理、检测

残留液的处理:残留液取出50mL加入13%Ba(OH)<sub>2</sub>溶液的上清液5mL,放入冰箱冷藏保存2h,使大部分蛋白质沉淀,离心去沉淀,上清液取小样,用高压液相(HPLC)检测cAMP的含量。

原枣汁样品的预处理:取原枣汁50mL,加入5mL 13%的饱和Ba(OH)<sub>2</sub>,离心去蛋白,HPLC检测cAMP的含量。

其它洗脱液及残留液调pH为7.0后,直接取样用高压液相检测。

#### 2.3.3 阴离子交换树脂提取操作方法

取一定量D293阴离子交换树脂,先用1mol/L的NaOH溶液浸泡,后用蒸馏水洗至中性,再用1mol/LHCl溶液浸泡树脂3h,最后蒸馏水洗至流出,液用硝酸银检验无浑浊,即可取500mL枣汁以3mL/min的流速上柱。

#### 2.3.4 四种不同方案提取cAMP

1) 方案一:500mL枣汁经D293阴离子交换柱上柱交换,然后用NaCl-HCl洗脱液(NaCl含量0.4mol/L,HCl含量0.1mol/L)洗脱。所得洗脱液调pH至7.0,然后经中性氧化铝柱脱色。最后所得流出液进行浓缩结晶。高压液相检测cAMP含量。

2) 方案二:500mL枣汁经D293阴离子交换柱上柱交换,然后用NaCl-HCl洗脱液(NaCl含量0.4mol/L,HCl含量0.1mol/L)洗脱,得到的洗脱液调pH至1.0使cAMP带正电,然后上732阳离子交换树脂(Na型)。用0.1mol/LNaOH洗脱液洗脱。收集高峰处的洗脱液,调pH至7.0,取小样,高压液相检测cAMP含量。

3) 方案三:500mL枣汁经D293阴离子交换树脂提取(洗脱液0.4M NaCl-0.1 M HCl),然后进行除盐处理。先将阴离子交换树脂处理成OH型,由于cAMP洗脱液pH在1.0左右,此时cAMP带正电,应从树脂中

表1. cAMP浸提实验结果

	cAMP峰高	cAMP峰面积	cAMP浓度(mg/L)	干枣质量(kg)	枣汁体积(mL)
标样	116216.43	2969188.5	40	-	-
枣汁	34097.66	1456893.25	14.083	0.9	4550

流出, 而Cl<sup>-</sup>则被交换上柱。反应方程式: R-OH+Cl<sup>-</sup>=R-Cl+OH<sup>-</sup>。收集开始出峰至pH由碱变中性的流出液。按收集先后顺序对收集试管编号1、2、3、4。用高压液相检测各试管中cAMP的含量。

4) 方案四: 500mL枣汁经D293阴离子交换树脂上柱提取, 洗脱液为0.05mol/L HCl, 分段收集洗脱液, 取峰值及其左右处的收集液, 同样按收集先后顺序对收集试管编号1、2、3、4、5(峰值处), 用高压液相检测各试管中 cAMP 的含量。最后经中氧化铝脱色。

### 2.3.5 cAMP 含量计算方法

$$C_{cAMP} = C \times \frac{A}{B} \times D$$

C—标样浓度 (mg/mL)

A—待测样品在 HPLC 中所测峰高

B—标样在 HPLC 中所测峰高

D—校正因子 (待测样品加入氢氧化钡后的体积与原体积之比)

## 3 结果与分析

### 3.1 不同方案提取 cAMP含量分析

经高压液相检测, 方案一各取样结果如表2。此方案在洗脱液中加入NaCl, 目的是加强洗脱液的离子强度, 使cAMP能够充分洗脱出来, 因此回收率比较高, 但是此过程中引入的NaCl杂质, 使得cAMP纯度很低, 结晶后成品中含有大量盐分。

表2. 方案一操作过程中取样cAMP的含量

	峰高	峰面积	浓度 (mg/L)
标样	116216.43	2969188.5	40
原枣汁	34097.66	1456893.25	14.083
残留液	4408.4	192527.2	1.8966
洗脱液	230073.5	6858666	86.39

由于采取方案一所得cAMP洗脱液可能含有大量阴离子杂质, 方案二将cAMP调整为带正电, 然后与732阳离子交换树脂交换就有可能去掉这些杂质。但阳离子洗脱后, cAMP含量大大降低, 可能原因是732阳离子交换树脂对cAMP吸附效果不佳。调pH值时又引入杂质, 因此, 此方案所得cAMP洗脱液含有的盐分比方案一还要高。高压液相检测结果如表3。

表3. 方案二操作过程中取样 cAMP 的含量

	峰高	峰面积	浓度
标样	116216.43	2969188.5	40
阴离子洗脱液	230073.5	6858666.0	86.39
阳离子洗脱液	42745.5	1252391.4	14.71

由于方案一和方案二操作过程中用0.4mol/L NaCl-0.1 mol/LHCl作为洗脱液, 且调pH过程中引入了NaOH或HCl, 使得最终所得cAMP溶液含有大量NaCl而影响后面的结晶操作。因此方案三考虑使用阴离子交换树脂除去Cl<sup>-</sup>, 再用阳离子交换树脂除去Na<sup>+</sup>。用紫外检测仪检测流出液并对其进行部分收集。同时检测pH的变化。收集开始出峰至pH由碱变中性的流出液。按收集先后顺序对收集试管编号 1、2、3、4。用高压液相检测各试管中cAMP的含量。结果如表4所示。可以看出, 流出液cAMP含量很低且分布不均匀。可能原因为: Cl<sup>-</sup>与树脂交换后, OH<sup>-</sup>被交换到下流液体中使上柱液体pH不断升高, 当pH升到大于2.0时, cAMP变为带负电, 部分被交换到树脂上而不会流出。因此, 除盐过程使cAMP回收率大大降低, 此法并非最佳工艺路线。

表4. 方案三操作过程中取样 cAMP 的含量

试管号	峰高	峰面积	浓度 (mg/L)
标样	49451.383	1098419.250	7.5
1	16579.307	497448.813	2.5145
2	44257.027	1096718.125	6.7122
3	62135.113	1552371.750	9.4237
4	140011.344	3302543.500	21.2347

方案四采用D293阴离子交换树脂上柱, 洗脱液改为0.05 mol/L HCl, 分段收集洗脱液, 取峰值及其左右处的收集液, 同样按收集先后顺序对收集试管编号1、2、3、4、5(峰值处), 用高压液相检测。从表5中结果可以看到, 峰值处cAMP含量远大于相邻试管收集液, 证明此方法出峰比较集中。同时, 峰值处洗脱液用氨水调pH值至7.0左右, 然后上氧化铝柱脱色。如此操作溶液中就不存在 NaCl, 而是NH<sub>4</sub>Cl。NH<sub>4</sub>Cl在加热浓缩过程中分解可生成氨气和氯化氢气体从而挥发掉。因此方案四摆脱了其它方案工艺过程中引入大量杂质的操作, 可使cAMP的纯度有效提高, 保证了cAMP结晶的完成。综合考虑回收率、纯度及生产成本, 此方法为较优工艺路线。

### 3.2 不同方案比较

经计算,对不同工艺cAMP提取所得的数据汇总,结果如表6。由表中数据可以看出,方案四所得cAMP提取液的cAMP含量和回收率虽然都不及方案一高,但两者差距并不大,因方案四不会引入杂质,在工业生产中应最先考虑此种工艺。

## 4 讨论

本实验中,以金丝小枣为原料,先将其按料液比为1:10的比率制备成枣汁(此时pH值大约为6.0左右,cAMP带负电),然后采用D293阴离子交换树脂提取环磷酸腺苷。研究制定了四种提取方案,并通过实施方案得出了如下结果:

方案一:使用D293阴离子柱,用0.4M NaCl-0.1M HCl作为洗脱液,此方案因NaCl的存在使得洗脱液离子强度增强,回收率比较高,但是会引入NaCl杂质,因此并非优选方案。方案二:先经一次D293上柱,洗脱液仍为0.4M NaCl-0.1M HCl,之后调pH值至1.0使cAMP带正电,再经732阳离子交换树脂,洗脱液为0.1M NaOH。此方案回收率很低,因此也非优选方案。方案三:经D293上柱洗脱后,通过离子交换进行除盐处理,但效果不佳,主要问题是回收率太低且出峰不集中。方案四:考

虑到在实验过程中要避免引入NaCl杂质,因此采用0.05mol/L HCl作为洗脱液,用氨水调pH值至中性,再经中性氧化铝脱色。此方法有两方面优点,首先洗脱液浓度降低后,可以减少比cAMP更难洗脱的杂质的引入。其次,用氨水调pH值所生成的NH<sub>4</sub>Cl可以在蒸发浓缩过程中分解成氨气和氯化氢挥发掉,有利于cAMP的结晶。此方案因洗脱液强度不高,回收率会稍微有所降低。

通过对各方案所得数据的比较,并综合考虑提取成本、生产效率及结晶操作的实现,确定方案四为较优提取路线。操作条件为:上柱枣汁pH为6.0,上柱流速为3mL/min,洗脱液为0.05mol/L HCl,洗脱流速为1.5mL/min。

## 参考文献

- [1]曲泽洲,王永蕙.中国果树志.枣卷[M].北京:中国林业出版社,1993.
- [2]雷昌贵,陈锦屏,卢大新.红枣的营养成分及其保健功能[J].现代生物医学进展,2006,6(003):56-57. DOI:10.3969/j.issn.1673-6273.2006.03.020.
- [3]王向红,崔同,刘孟军,等.不同品种枣的营养成分分析[J].营养学报,2002,24(2):206-208.
- [4]艾启俊,张德权.果品深加工新技术[M].北京:化学工业出版社,2002,230-231.

表5. 方案四操作过程中取样cAMP的含量

编号	峰高	峰面积	浓度 (mg/L)
标样	49451.383	1098419.250	7.5000
1	2152.808	74552.969	0.3265
2	2854.765	147411.688	0.4330
3	6688.211	168334.578	1.0144
4	28692.260	870360.938	4.3516
5 (峰值)	487553.781	10794163.000	73.9444

表6. 各方案结果比较

	上柱枣汁体积(mL)	cAMP 含量 (mg/L)	cAMP 回收液体积(mL)	cAMP 含量 (mg/L)	回收率 (%)
方案一	500	14.083	84	79.19	94.47
方案二	500	14.083	25.20	14.71	5.26
方案三	500	14.083	15.30	21.23	4.61
方案四	500	14.083	85.89	73.94	90.19

- [5]陈霜江, 袁野, 潘富旭, 等. 枣果中主要糖组分和环磷酸腺苷积累特征分析[J]. 中国南方果树, 2023, 52(3): 186-190. DOI:10.13938/j.issn.1007-1431.20220618.
- [6]张秀清. 金丝小枣中提取环磷酸腺苷的方法及在预防癌症上的应用: CN201811379610.1[P].
- [7]杨静秋. 不同品种乐陵金丝小枣的营养成分比较研究[J]. 实验室检测, 2024, (4): 57-60.
- [8]毕珣, 刘庆春, 金峰, 等. 枣环磷酸腺苷提取液高原应激条件下抗疲劳作用实验研究[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(3):4. DOI:CNKI:SUN:ZGWY.0.2015-03-022.
- [9]史红梅, 尹卓容, 蒋文强. 高压液相色谱法测定金丝小枣环磷酸腺苷的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 3. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.05.046.
- [10]米东, 王琪, 李明润. 红枣环磷酸腺苷(cAMP)的提取工艺[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2007, 36(3): 3. DOI:10.3969/j.issn.1000-5137.2007.03.015.

