

红枣环磷酸腺苷的提取研究

康 健¹ 张佳欣² 王淼霜² 赵山山² 郝光飞²

(1. 灏灵赛奥(天津)生物科技有限公司 天津 300457

2. 河北工程大学 生命科学与食品工程学院 河北 邯郸 056000)

[摘 要] 环磷酸腺苷(cAMP)是机体内重要的生物活性物质,在保健和医学领域都有着重要的应用价值。天然来源的环磷酸腺苷对人体无毒副作用,随着人们对环磷酸腺苷的需求量增大,从天然提取物中提取环磷酸腺苷成为首选方法。红枣是目前已知环磷酸腺苷含量最高的生物,且我国红枣种植面积占全球99%以上,品种高达700余种,丰富的红枣资源为其研究奠定物质基础。文章综述了近年来红枣环磷酸腺苷提取研究成果,并对环磷酸腺苷的提取做出了展望,旨在为红枣环磷酸腺苷深入研究和开发提供参考。

[关键词] 红枣;环磷酸腺苷;提取

前言

环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)分子式为C₁₀H₁₂N₅O₆P,是一种环状核苷酸,被称为生命信息传递的“第二信使”,具有增强免疫力、调控基因表达、改善血液循环、促进激素分泌和神经递质合成、预防癌症发生等生理功能^[1-5],并且在临床上应用于心血管疾病、呼吸系统疾病、肝胆疾病、神经系统疾病和甲亢等疾病的治疗,尚未发现有明显的副作用,具有较高的临床应用价值^[6]。目前,环磷酸腺苷的主要制备方式有化学合成法、微生物发酵法和天然产物提取法。其中化学合成法制得的环磷酸腺苷产率低、成本高,制备过程使用的化学试剂存在不能完全去除的隐患和环境危害。微生物发酵法的培养周期长,制备产物中可能含有菌体其他代谢物^[7],而天然产物提取法所得环磷酸腺苷提取率高且纯度高,成为制备首选。

环磷酸腺苷虽广泛存在于生物细胞中,但含量极少^[8]。从动物内脏中提取得到的环磷酸腺苷价格不菲,在实验和临床中难于广泛使用,因此寻找含环磷酸腺苷较多的天然产物成为实现环磷酸腺苷应用价值的重要前提。直到1984年,JC Cyong^[9]发现在180多种天然植物中红枣环磷酸腺苷含量最高,约为动物肝、脑组织中的10倍,推动了该研究的进展,红枣中提取中环磷酸腺苷一时间成为主要研究对象。我国红枣资源丰富、品种繁多。2015年,我国红枣产量已达808.5万吨,是1995年的10.3倍。红枣产量的不断增长导致价格的一再降低,以新疆红枣为例,1995年新疆红枣产量为0.3万吨,2015年收获305.4万吨红枣,增长1175倍,但红枣价格由30多元/公斤降至7、8元/公斤,对红枣行业发展造成威胁^[10]。显然粗加工已经无法满足快速发展的红枣行业,红枣产业化急需解决红枣精、深加工增值技术的问题,提高红枣附加值。就目前红枣行业形势来看,市场急需、资源丰富、价格较低,适合开展红枣环磷酸腺苷提取工艺的研究。本文对红枣环磷酸腺苷提取的方法进行综述,旨在为红枣环磷酸腺苷深入研究和开发提供参考。

1 溶剂提取法

溶剂提取法是传统的天然产物提取方法,其工艺简单,依据相似相溶原理,通过选用对有效成分溶解度大的溶剂,将有效成分从植物组织中溶解出来。红枣环磷酸腺苷的提取溶剂一般选用水和乙醇进行提取,提取的方法包括浸提法、回流提取法和连续回流提取法。浸提法最为简单,但在实际操作中,操作繁琐、溶剂消耗量大。回流加热装置在一定程度上减少溶剂蒸发消耗,但

仅适合少量样品提取实验。连续回流提取法的主要仪器为索氏提取器,利用溶剂回流和虹吸原理而具有溶剂消耗少、提取效率高的优点,使得连续回流提取法成为从固体物质中萃取化合物最经典的方法^[11]。

在以灵武长枣、中宁圆枣、同心圆枣、山东大枣和陕北滩枣为研究对象实验中,经过预实验对红枣环磷酸腺苷的不同提取方法进行选择,最后采用连续回流提取法提取红枣环磷酸腺苷。实验结果显示不同品种红枣的环磷酸腺苷提取量存在差异,其中灵武长枣的提取量为335.7 μg/g,位居五个品种首位^[12]。试验研究中,学者选用的试验原料多为品种优、品质高的红枣,热那汗·买买提^[13]却将目光停留在“次等枣”上,低价购买当地的“次等枣”进行回流提取试验,在最优工艺条件下测得其环磷酸腺苷平均提取量为346 μg/g,在红枣环磷酸腺苷含量的正常范围内。这说明“次等枣”也有较大的利用价值,可为红枣行业带来一定的经济效益。

2 超声波辅助提取法

超声波辅助提取法利用超声的空化效应、热效应和机械作用使植物瞬间破裂,有效物质受超声波的振动作用影响而快速释放、扩散和溶解进入溶剂。采用此方法对不同红枣品种展开研究,测得灵武长枣、新疆红枣、和田玉枣、赞皇枣的环磷酸腺苷提取量分别为331.0 μg/g、502.2 μg/g、771.95 μg/g、644.46 μg/g^[14-15]。其中,对赞皇枣进行试验时,与溶剂提取法454.99 μg/g的提取量相比提高了41.6%^[15]。超声波辅助提取法具有提取效率高、操作简单、节约能耗、经济效益高等优点外,也存在着超声波的热效应破坏有效成分;介质不均匀会直接影响提取率;试验过程中会产生巨大噪音,难以进行大规模提取等不足。

3 微波辅助提取法

微波辅助提取法又称为微波萃取,该方法根据物质对微波吸收能力不同的特性,使得萃取体系中某些组分被选择性加热,导致细胞分子间氢键松弛、细胞膜结构破裂,加速溶剂分子对基体的渗透和待提取成分的溶剂化,从而显著提高提取率。对和田玉枣又进行微波工艺提取环磷酸腺苷的研究,并与传统溶剂法和超声波提取法进行对比,三者的提取量依次为795.63 μg/g、620.28 μg/g和771.95 μg/g。对比分析发现,微波法提取率明显高于溶剂法,虽与超声波法提取率相近,但微波实验条件较易控制、工艺能耗较少,综合考虑微波辅助提取法优于二者。

4 酶提取法与其他技术联用

酶提取法是利用酶降解植物的细胞壁、果胶等物质,使植物组织形成疏松结构,从而获得植物有效成分的方法。酶催化作用具有专一性、高效性,且反应条件温和,使得提取过程中能耗少、成本低、提取纯度高。但酶活性极易受反应条件影响,需要严格控制反应条件,否则会影响酶反应速率和提取物纯度。因此实验室或加工工业中,常采用酶提取法与其它方法联合,达到预期成果。

利用超声波对红枣样品预处理,使细胞结构受到破坏,再进行酶处理帮助环磷酸腺苷充分扩散,从而达到提高得率的目的。在最佳超声波辅助酶提条件下得到环磷酸腺苷提取量与对照组结果相比,超声波辅助酶法的提取量明显高于水浴法、超声波提取法和酶提取法的提取量,达到预期。除了将酶提取法与超声波提取法结合,还有学者将其与微波辅助提取法结合。微波的连续高温对样品内部造成巨大压力而导致细胞破裂、环磷酸腺苷流出^[13],缩短酶解时间,降低成本^[11],试验得到环磷酸腺苷提取量为560.9 μg/g。

5 微波-超声波辅助提取技术

微波-超声波辅助提取技术直接将超声振动与开放式微波相结合。超声波的空化作用、机械效应和热效应,增加分子运动频率和速度,样品细胞被很大程度上破坏,再利用微波产生的电场和磁场加速有效物质扩散到溶剂中。通过该方法得到金丝小枣环磷酸腺苷提取率高达90.83%,相比超声辅助提取法和水提法的环磷酸腺苷提取率分别提高14.37%、28.66%。两者结合优势互补,显著提高环磷酸腺苷的提取率^[26],但提取时间较长,生产成本未得到显著降低。

6 组织破碎提取法

组织破碎提取法即闪式提取法,于1993年被刘延泽教授首次提出,之后随着对闪式提取器的研制和应用不断发展改进,在中药及天然药物成分提取、化工领域提取、生物技术、化妆品、食品、保健品等领域取得了一定的成就。组织破碎提取法依据植物组织破碎的原理,在室温下将植物原料与适当溶剂经过高速剪切植物原料破碎至微小颗粒,使得有效成分在负压作用下,被溶剂分子包围、解离、替代从而脱离原料进入溶剂中。此过程仅需数秒,快速高效的同时绿色节能、操作简单,深受学者喜欢。曾有学者对早脆王枣进行提取得到(149.5 ± 3.6) μg/g的提取量,明显高于超声辅助提取法得到的46.01 μg/g^[10]。

表1 红枣cAMP的提取重量得率

试验原料	提取方法	cAMP重量得率%
灵武长枣	索氏提取法	0.335700
阿克苏“次等枣”	回流提取法	0.346000
灵武长枣	超声波辅助提取法	0.331000
新疆红枣落地枣	超声波辅助提取法	0.502200
和田玉枣	超声波辅助提取法	0.771950
赞皇枣	超声波辅助提取法	0.644460
和田玉枣	微波辅助提取法	0.795630
佳县木枣	超声波辅助酶提法	0.154300
新疆红枣	微波辅助水酶法	0.560900
早脆王枣	组织破碎提取法	0.149500

从表中可以看出,微波辅助提取和田玉枣的重量得率最高,可为实验研究和工业生产提供数据参考。但红枣环磷酸腺苷的提

取量与试验所用的红枣品种、提取方法、优化工艺方法、优化工艺参数等相关,需要综合考虑各因素的影响。

展望

随着人们健康生活观念的加强,科研工作和临床应用对环磷酸腺苷的需求量日益增加。目前环磷酸腺苷最优制备方法是从天然提取物中提取,红枣因环磷酸腺苷含量高且资源丰富备受青睐,虽然学者对提取方法与工艺不断改善更新,但是就当下研究现状而言,从红枣中提取环磷酸腺苷的技术仍处于起步阶段,需要学者继续探索,尝试应用新的提取方法并研究其最优工艺。

目前在提取天然产物领域应用较多的提取方法还有超临界CO₂萃取法、超声强化超临界CO₂萃取法、高压脉冲电场提取法等。超临界流体萃取技术是目前国际上较先进的物理萃取技术。超临界流体穿透力强、密度大,改变压力或温度使得超临界流体的溶解度大幅度改变,根据超临界流体自身特性,将其作为溶剂进行萃取、分离单体。其中CO₂因成本低、纯度高、安全可靠、临界条件易达到等优点成为首选的萃取剂^[3]。应用超临界CO₂萃取法从常常被人们丢弃的枣核中提取黄酮类化合物,在研究得出的最优工艺条件下平均重量得率为1.6665%,是乙醇提取法的2.89倍,并称赞该萃取方法操作简单、提取率高、活性成分保存好、品质高,是一种很好的分离技术。

虽然超临界CO₂萃取法提取率高、绿色环保,但是在试验过程中,萃取耗时长、生产成本低,未在天然产物提取领域得到广泛应用。针对超临界CO₂萃取法中存在的问题,学者们将超声波辅助提取法应用于此。通过对比超临界CO₂萃取法和超声强化超临界CO₂萃取法两种方法在山楂果中提取原花青素的试验,得出以下结论:超声波强化超临界CO₂萃取法的最优工艺条件相比于单纯的超临界CO₂萃取法,降低了最佳萃取温度和最佳萃取压力,但萃取率明显提高^[9]。原花青素是一种水溶性黄酮类化合物,与红枣环磷酸腺苷理化性质相似,因此该技术有望成为枣中提取环磷酸腺苷的新思路。

高压脉冲电场技术最初应用于液态食品杀菌领域,被学者们公认为国际上研究最热门、最先进的杀菌技术之一。随着研究的深入,学者将该技术应用于天然产物的提取领域。高压脉冲电场技术利用细胞膜电穿孔原理对生物细胞膜进行处理,对组织细胞造成不可逆的破坏,从而提取细胞内的有效成分。此技术因具有操作时间短、节能环保、提取物的生理活性高、可连续性操作等优点^[5-7],受到学者们广泛关注并展开研究,成为食品非热处理领域研究的热点之一。通过高压脉冲电场辅助的方法、煎煮法与超声法三种方法对人参中的多种水溶性物质进行提取,试验中发现人参多糖应用高压脉冲电场提取法的提取率是煎煮法的3.71倍、超声法的1.33倍;高压脉冲电场提取人参皂苷的提取率是煎煮法的4.45倍、超声法的1.69倍^[13]。该实验数据证明了高压脉冲电场提取法在提取水溶性物质中的优越性,并增加了将此技术拓展到提取枣中环磷酸腺苷领域的可行性。

由此可见,枣中提取环磷酸腺苷的技术仍有很大的发展空间,研究出高提取率、高纯度、节能、安全、环保的提取方法是今后重要的研究方向,也是进一步开发利用红枣资源、推进红枣产业快速发展的有效途径。

(下转第720页)

初创期的公司股权。这类初创期公司的办公设备、场地、办公团队等往往都尚未具雏形，仅仅只有一个创业思路，而投资人既创业投资基金管理人看中了该企业的成长潜力和创业想法下的发展空间，帮助创业落地。

就资金进入的时期而言，创投基金的进入时期早于股权投资基金，属于初始轮的天使投资。而正是由于创投基金的融资进入时期较早，价格也相对较低，这意味着融资成本更低；但同时也需要承担极高的风险，投资周期也 longer。所以，创投基金的管理人会将投资组合多元化，投向不同行业领域、不同地区的企业，以降低及减少风险。VC 项目的主要退出方式为股权转让、并购和 IPO，后两者的占比近几年呈现连续上升趋势。

其他私募投资基金，是指投资除股权、证券及其衍生品以外的其他领域的基金，一般多投向于红酒、艺术品等商品。

私募资产配置类基金，是中国基金业协会于 2018 年 9 月刚开放的第四类私募牌照，是指底层资产标的为各类别私募基金（包含股权类基金、证券类基金以及其他类基金）以及公募基金或者其他依法设立的资产管理产品。本质上资产配置类牌照更像是涵盖范围较广的 FOF（Fund of Funds，基金中的基金）牌照，但与过往三类基金牌照不同的是，资产配置类基金突破过往基金业协会要求的“专项经营”，可以横跨一二级市场、债权市场进行投资。无论是投资的范围还是操作方式上都更为灵活。

总体来看，私募基金在中国发展迅猛，并保持着稳定增速的

状态，这是新兴市场的经济发展及中国企业数量多、发展快所带来的投资机遇，但与成熟市场如美国还有着较大差距，这意味着私募基金的投资和上升空间还十分广阔。私募成立之初，多以自有资金和散户为主，但近几年来银行、信托等机构逐渐成为私募基金资金来源的中坚力量和主要推动力，这一现象昭示着我国私募基金行业正逐渐向成熟、稳健的金融结构体系靠拢。私募基金通过对接机构资金，在一定程度上能保证更长更稳定的续航力及更全面的技术支持，无疑对我国金融业及经济发展有着重要作用。但同时私募也面临着一些问题，如监管不到位、专业人才缺失、缺乏完善的法律制度、市场资本流动性较差等等。如何建立符合我国国情的发展和培育体系是私募基金行业能否健全发展的关键。

参考文献：

[1] 赵羲，李路，陈彬. 中国私募证券投资基金行业发展现状分析——基于全球对比的视角 [J]. 证券市场导报, 2018(12): 61-67+74.

作者简介: 郁晶雯, 女, 出生年月 1988 年 7 月, 汉族, 籍贯上海, 学士学位, 就职于上海河东资产管理咨询有限公司交易部, 邮编 200031, 研究方向: 量化分析和策略在证券投资基金中的应用。

(上接第 792 页)

参考文献

[1] Yue X L, Jiang Y F, Liu Z Q, et al. Effect of naoreqing oral liquid on cAMP contents of hypothalamus and cerebrospinal fluid in endogenous pyrogen-induced febrile rabbits[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2005, 21(1):172-174.

[2] Sharma R K, Sharma S, Siddiqui S. Physiology of fruit ripening in jujube - a review. [J]. Haryana Journal of Horticultural Sciences, 2000.

[3] Kou X, Chen Q, Li X, et al. Quantitative assessment of bioactive compounds and the antioxidant activity of 15 jujube cultivars[J]. Food Chemistry, 2015, 173:1037-1044.

[4] Zaccolo M. cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies[J]. British Journal of Pharmacology, 2009, 158(1):50-60.

[5] Cho E A, Juhn Y S. The cAMP signaling system inhibits the repair of γ -ray-induced DNA damage by promoting Epacl-mediated proteasomal degradation of XRCC1 protein in human lung cancer cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2012, 422(2):256-262.

[6] 党立，王希敏，韩利文，等. 环磷酸腺苷的临床应用进展 [J]. 山东科学, 2007, 20(3):61-64.

[7] 樊君，石奇，尚红伟，等. 环磷酸腺苷的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(7):597-599.

[8] 易健华. cAMP 在细胞代谢中的调节作用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1981.

[9] Cyong J C, Hanabusa K. Cyclic adenosine monophosphate in fruits of Zizyphus jujuba. [J]. Phytochemistry, 1980, 19(12):2747-2748.

[10] 李春艳，廖晓军. 我国红枣产业发展情况分析 [J]. 农产品市场周刊, 2016(49):34-37.

[11] 陆家骧，周民峰，兰韬. 索氏提取法与超声提取法的比较研究 [J]. 污染防治技术, 2015, 28(03):67-69.

[12] 赵堂，郝凤霞，杨敏丽. 几种红枣中生物活性物质环磷酸腺苷的含量分析 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23):4955-4957.

[13] 热那汗·买买提，敬思群. 阿克苏“次等枣”环磷酸腺苷提取工艺优化 [J]. 食品科技, 2013(5):232-235.

[14] 胡云峰，姜晓燕，刘维维，崔翰元. 响应面法确定超声波提取灵武长枣中环磷酸腺苷 (cAMP) 的最佳条件 [J]. 食品科技, 2010, 35(07):213-216+221.

[15] 蒋劲博，王强，李建贵，阮晓，杨性民. 响应面法优化红枣中环磷酸腺苷 (cAMP) 超声提取工艺 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(01):114-120.