

贾文婷, 杨 慧, 吴洪斌. 不同预处理方式对红枣环磷酸腺苷提取率的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(12): 181–186.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.039

# 不同预处理方式对红枣环磷酸腺苷提取率的影响

贾文婷, 杨 慧, 吴洪斌

(新疆农垦科学院农产品加工研究所/新疆农垦科学院农产品加工重点实验室, 新疆石河子 832000)

**摘要:**环磷酸腺苷(cAMP)是机体内一种重要的生理活性物质,能调节机体细胞的多种功能活动,开发利用前景广阔。以新疆地区红枣为原料,采用超微粉碎法和真空冷冻干燥法对红枣进行预处理,通过响应面法建立了水浴提取环磷酸腺苷的二次多项数学模型,优化提取工艺参数,通过比较2种不同的预处理方式,得到的结果如下:超微粉碎法处理后cAMP提取率为318.31  $\mu\text{g/g}$ ,真空冷冻干燥处理后cAMP提取率为239.35  $\mu\text{g/g}$ 。

**关键词:**新疆红枣;环磷酸腺苷;提取;超微粉碎法;真空冷冻干燥法;响应面分析

**中图分类号:**S665.101;TS201.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)12-0181-05

环磷酸腺苷(cAMP)是细胞内的重要物质,参与调节物质代谢,是生命信息传递的“第二信使”<sup>[1-2]</sup>。它在动物体内可以增强心肌细胞抗损伤、抗缺血和缺氧能力,是动物体内一种广泛存在的、具有生理活性的重要物质<sup>[3-5]</sup>。目前,红枣中cAMP的含量是已知植物中最高的,随着红枣深加工及副产物综合利用产业化发展以及医疗和保健行业对cAMP需求量的增大,使用不同方法从红枣中提取cAMP的研究越来越多,因此,深入研究如何高效、低耗、环保地从红枣中提取cAMP具有重要意义<sup>[6]</sup>。

本研究以新疆地区红枣为原料,采用超微粉碎法、真空冷冻干燥法2种不同方式进行预处理,水浴法提取cAMP,通过单因素及响应面试验,利用Design-Expert中BBD统计软件,以红枣cAMP提取率为响应值,获得2种预处理方式的最佳工艺,并通过高效液相色谱法测定其提取率,以期为提高cAMP提取率提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红枣,购自新疆石河子市农贸市场。

收稿日期:2019-07-05

基金项目:新疆生产建设兵团工业科技攻关项目(编号:2015AB030)。

作者简介:贾文婷(1987—),女,河北鹿泉人,硕士,助理研究员,主要从事果蔬加工研究。E-mail:4947637@qq.com。

通信作者:吴洪斌,硕士,副研究员,主要从事果蔬加工研究。E-mail:258086146@qq.com。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 超微粉碎机、真空冷冻干燥机、烘箱、高效液相色谱仪、电子天平、台式低速离心机、数显恒温水浴锅、旋转蒸发器。

1.2.2 试剂 cAMP标准品(纯度>99%)、甲醇(色谱纯)、磷酸二氢钾(优级醇)、果胶酶、纤维素酶。

### 1.3 方法

1.3.1 对照品溶液的制备 精密称取cAMP标准品,加适量蒸馏水制成15  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,摇匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤即得对照品溶液<sup>[7]</sup>。

1.3.2 样品的制备 精密称取采用不同预处理方式处理后的枣粉10.00 g,加入440 mL超纯水,于90  $^{\circ}\text{C}$ 下水浴提取2次,每次1 h,合并提取液,于离心机中3 000 r/min离心15 min,取上清液减压浓缩至100 mL,过0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜<sup>[8]</sup>,得样品溶液。

1.3.3 色谱条件 ZORBAX SB-Aq C18色谱柱(3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm),柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ ,以 $V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=40:60$ 为流动相,流速为0.6 mL/min,进样量为5  $\mu\text{L}$ 。

1.3.4 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子检测,雾化气( $\text{N}_2$ )压力设为0.28 MPa;干燥气( $\text{N}_2$ )的流速设为10 L/min,干燥气( $\text{N}_2$ )的温度设为350  $^{\circ}\text{C}$ 。多反应监测(MRM)模式监测反应质荷比( $m/z$ )为330.10~136.00。碎裂电压为140 V;碰撞能量为25 V。

1.3.5 制作标准曲线 取“1.3.1”节中配制的cAMP对照溶液,加超纯水配制成1.00 mg/mL的混

合储备液,于 4 ℃ 保存;使用时用超纯水稀释,配制  
成 cAMP 质量浓度为 0. 01、1、10、50、100、500、  
1 000 ng/mL 的混合对照品溶液<sup>[9]</sup>。标样图谱如图  
1 所示。

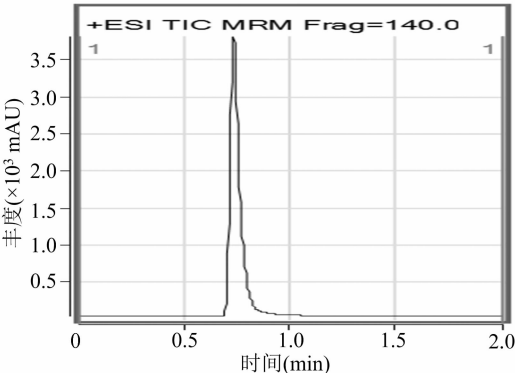


图1 环磷酸腺苷的总离子流图(TIC)

2 结果与分析

2.1 超微粉碎法最佳工艺

2.1.1 单因素试验结果 影响红枣超微粉碎的主要参数有物料水分含量(%)、单次打粉时间(s)、打粉次数(次)。分别对这几个参数进行单因素试验,(1)在单次打粉时间为 10 s、打粉次数为 5 次的条件下,分别测定物料含水量为 6%、8%、10%、12%、14% 时的 cAMP 提取率;(2)在物料含水量为 10%、打粉次数为 5 次的条件下,分别测定单次打粉时间为 8、10、12、14、16 s 时的 cAMP 提取率;(3)在物料含水量为 10%、单次打粉时间为 10 s 的条件下,分别测定打粉次数为 1、3、5、7、9 次时的 cAMP 提取率。从表 1 可以看出,cAMP 提取率随物料含水量的增加先增大后减小,在物料含水量为 10% 时达到最大值;cAMP 提取率随单次打粉时间的增加先增大后减小,在单次打粉时间为 10 s 时达到最大值;cAMP 提取率随打粉次数的增加先增大后减小,在打粉次数为 5 次时达到最大值。因此,选择物料含水量为 8%、10%、12%,单次打粉时间为 5、10、15 s,打粉次数 3、5、7 次进行响应面分析。

2.1.2 响应面优化结果 根据前期单因素试验的结果,选取物料水分含量(A)、单次打粉时间(B)、打粉次数(C)作为自变量,产品的 cAMP 提取率( $Y_1$ )作为因变量,进行二次回归正交旋转组合试验,各因子的水平设置及编码值见表 2。

利用 Design - Expert 软件设计试验方案,试验设计及结果见表 3。

表 1 单因素试验结果

物料水分含量 (%)	cAMP 提取率 (μg/g)	单次打粉时间 (s)	cAMP 提取率 (μg/g)	打粉次数 (次)	cAMP 提取率 (μg/g)
6	265.110	8	295.80	1	260.12
8	288.195	10	300.71	3	294.75
10	296.750	12	290.56	5	303.25
12	281.010	14	263.61	7	273.75
14	248.655	16	243.96	9	251.47

表 2 因素水平编码

编码值	A:物料水分含量 (%)	B:单次打粉时间 (s)	C:打粉次数 (次)
-1	8	5	3
0	10	10	5
1	12	15	7

表 3 试验设计结果

编号	物料水分含量 (%)	单次打粉时间 (s)	打粉次数 (次)	cAMP 提取率 (μg/g)
1	-1	-1	0	296.54
2	1	-1	0	303.04
3	-1	1	0	308.24
4	1	1	0	290.30
5	-1	0	-1	293.21
6	1	0	-1	286.57
7	-1	0	1	298.97
8	1	0	1	300.75
9	0	-1	-1	300.33
10	0	1	-1	297.12
11	0	-1	1	302.91
12	0	1	1	301.92
13	0	0	0	327.12
14	0	0	0	328.52
15	0	0	0	328.12
16	0	0	0	325.13
17	0	0	0	325.84

2.1.3 响应面结果分析 应用 Design - Expert 7.0.0 软件进行多元回归拟合,得到的模拟回归方程为

$$Y_1 = 326.95 - 2.04A - 0.65B + 3.42C - 6.11AB + 2.10AC + 0.55BC - 16.56A^2 - 10.86B^2 - 15.52C^2。$$

响应面的回归显著性方差分析结果见表 4,可以看出,该回归模型具有极显著性( $P < 0.0001$ ),失拟项( $P = 0.1002 > 0.05$ )不显著,相关系数  $R^2 = 0.9895$ ,大于 0.9,说明模型相关度较好<sup>[10]</sup>。分别

以物料水分含量、单次打粉时间、打粉次数作响应面与等高线分析,由图 2 至图 4 可知,打粉次数( $C$ )对环磷酸腺苷提取率的影响较大,表现为对应曲线

较陡;物料水分含量( $A$ )和单次打粉时间( $B$ )对应曲线较平缓,表明它们对环磷酸腺苷的提取效果影响较小,这与回归分析的结果(表 4)相吻合。

表 4 cAMP 提取率响应面结果的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	3 262.963	9	362.551 4	72.955 16	<0.000 1
$A$	33.211 25	1	33.211 25	6.683 003	0.036 2
$B$	3.432 2	1	3.432 2	0.690 652	0.433 4
$C$	93.297 8	1	93.297 8	18.774 04	0.003 4
$AB$	149.328 4	1	149.328 4	30.048 92	0.000 9
$AC$	17.724 1	1	17.724 1	3.566 569	0.100 9
$BC$	1.232 1	1	1.232 1	0.247 932	0.633 8
$A^2$	1 154.04	1	1 154.04	232.224 2	<0.000 1
$B^2$	496.633 5	1	496.633 5	99.936 11	<0.000 1
$C^2$	1 013.603	1	1 013.603	203.964 4	<0.000 1
残差	34.786 57	7	4.969 51		
失拟项	26.379 45	3	8.793 15	4.183 668	0.100 2
纯误差	8.407 12	4	2.101 78		
总残差	3 297.749	16			

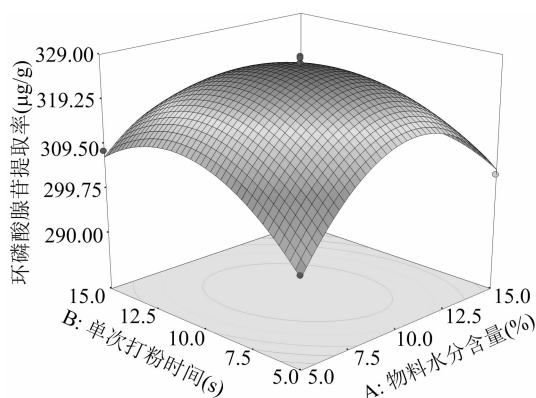


图2  $A$ 、 $B$ 及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

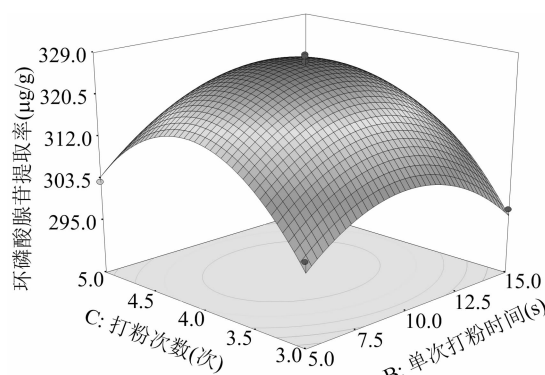


图4  $B$ 、 $C$ 及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

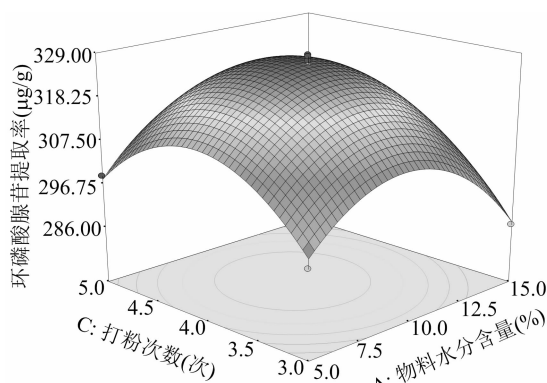


图3  $A$ 、 $C$ 及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

从对回归方程模型因变量的方差分析可知,模型一次项  $B$  ( $P = 0.433\ 4$ ) 不显著,  $A$  ( $P = 0.036\ 2$ ) 和  $C$  ( $P = 0.003\ 4$ ) 较显著。表明物料水分含量( $A$ )、

打粉次数( $C$ )对 cAMP 提取率的主效应明显,各因素的主效应关系为打粉次数 > 物料水分含量 > 单次打粉时间。

**2.1.4 工艺条件优化** 为了进一步确定最优工艺条件,采用 Design Expert 软件对试验参数进行进一步优化,对回归方程取一阶偏导等于零,得到曲面最高点,求导方程最后得出,各参试因子的最优工艺条件分别为物料水分含量 9.73%,单次打粉时间 10 s,打粉次数 4 次,该条件下 cAMP 的预测提取量为 327.185  $\mu\text{g/g}$ 。

**2.1.5 重复验证试验** 为验证模型的可行性,在回归模型预测值的基础上,在物料水分含量为 9.73%,单次打粉时间为 10 s,打粉次数为 4 次的条件下重复 6 次试验,取平均值,得 cAMP 提取率为

318.31 μg/g,实际提取值与理论提取值的吻合度为 97.29%,表明采用响应面法得到的最优提取条件各参数可靠<sup>[11]</sup>。

2.2 真空冷冻干燥法最佳工艺

2.2.1 单因素试验结果 影响红枣真空冷冻干燥的主要参数有真空度(A)、干燥温度(B)、干燥时间(C)。分别对这几个参数进行单因素试验:(1)在干燥温度为 60℃、干燥时间为 5 h 的条件下,分别测定真空度为 0.03、0.05、0.07、0.09、0.11 MPa 时的 cAMP 提取率;(2)在真空度为 0.07 MPa、干燥时间为 5 h 的条件下,分别测定干燥温度为 40、50、60、70、80℃时的 cAMP 提取率;(3)在真空度为 0.07 MPa、干燥温度为 60℃的条件下,分别测定干燥时间为 1、3、5、7、9 h 时的 cAMP 提取率。结果(表 5)发现,cAMP 提取率分别在真空度为 0.09 MPa、干燥温度为 60℃、干燥时间为 7 h 下达到最大值。因此,选取真空度为 0.7、0.9、1.1 MPa,干燥温度为 50、60、70℃,干燥时间为 5、7、9 h 进行响应面分析。

表 5 单因素试验结果

真空度 (MPa)	cAMP 提取 率(μg/g)	干燥温度 (℃)	cAMP 提取 率(μg/g)	干燥时间 (h)	cAMP 提取 率(μg/g)
0.03	192.68	40	197.45	1	165.63
0.05	207.41	50	202.34	3	197.42
0.07	213.54	60	236.45	5	212.31
0.09	238.43	70	210.47	7	239.64
0.11	221.57	80	201.36	9	217.67

2.2.2 响应面优化结果 根据前期单因素试验的结果,选取真空度(A)、干燥温度(B)、干燥时间(C)作为自变量,产品的 cAMP 提取率( $Y_1$ )作为因变量,进行二次回归正交旋转组合试验,各因子的水平设置及编码值见表 6。

表 6 因素水平编码

编码值	A:真空度 (MPa)	B:干燥温度 (℃)	C:干燥时间 (h)
-1	0.7	50	5
0	0.9	60	7
1	1.1	70	9

利用 Design - Expert 软件设计试验方案,试验设计及结果见表 7。

2.2.3 响应面结果分析 应用 Design - Expert 7.0.0 软件进行多元回归拟合,得到的模拟回归方程为

表 7 试验设计结果

编号	A:真空度 (MPa)	B:干燥温度 (℃)	C:干燥时间 (h)	cAMP 提取率 (μg/g)
1	-1	-1	0	222.408
2	1	-1	0	227.280
3	-1	1	0	231.180
4	1	1	0	217.728
5	-1	0	-1	219.912
6	1	0	-1	214.932
7	-1	0	1	224.232
8	1	0	1	225.564
9	0	-1	-1	218.252
10	0	1	-1	222.840
11	0	-1	1	227.184
12	0	1	1	226.440
13	0	0	0	249.840
14	0	0	0	246.396
15	0	0	0	247.596
16	0	0	0	243.852
17	0	0	0	246.636

$$Y_1 = 246.86 - 1.53A + 0.38B + 3.44C - 4.58AB + 1.58AC - 1.33BC - 12.37A^2 - 9.85B^2 - 13.34C^2。$$

响应面的回归显著性方差分析结果见表 8,可以看出,该回归模型具有极显著性( $P < 0.0001$ ),失拟项( $P = 0.7260 > 0.05$ )不显著,相关系数  $R^2 = 0.9888 > 0.9$ ,说明模型相关度较好<sup>[12]</sup>。由回归方程可知,各因素对环磷酸腺苷提取率的贡献值为真空度 28.59%、干燥温度 7.10%、干燥时间 64.29%。

分别以真空度、干燥温度、干燥时间作响应面与等高线分析,由图 5 - 图 7 可知,干燥时间(C)对提取环磷酸腺苷含量的影响较大,表现为对应曲线较陡;真空度(A)和干燥温度(B)对应曲线较平缓,表明它们对环磷酸腺苷的提取效果影响较小,这与回归分析的结果(表 8)相吻合。

从对回归方程模型因变量的方差分析可知,模型一次项 A( $P = 0.0567$ )、B( $P = 0.5858$ )不显著,C( $P = 0.0014$ )显著,表明干燥时间对 cAMP 提取率的主效应明显,各因素的主效应关系为干燥时间 > 真空度 > 干燥温度。

2.2.4 工艺条件优化 为了进一步确定最优工艺条件,由 Design Expert 软件对试验参数进行进一步优化,对回归方程取一阶偏导等于零,得到曲面最高点,求导方程最后得出,各参试因子的最优工艺条件分别为真空度 0.89 MPa,干燥温度 60.24℃,

表 8 cAMP 提取率响应面结果的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 223.9	9	247.1	68.691 07	<0.000 1
A	18.690 5	1	18.690 5	5.195 753	0.056 7
B	1.173 512	1	1.173 512	0.326 223	0.585 8
C	94.421 28	1	94.421 28	26.248 08	0.001 4
AB	83.942 24	1	83.942 24	23.335 02	0.001 9
AC	9.960 336	1	9.960 336	2.768 864	0.140 1
BC	7.107 556	1	7.107 556	1.975 822	0.202 6
A <sup>2</sup>	643.969 2	1	643.969 2	179.016 4	<0.000 1
B <sup>2</sup>	408.349 9	1	408.349 9	113.516 8	<0.000 1
C <sup>2</sup>	748.949 8	1	748.949 8	208.199 8	<0.000 1
残差	25.180 85	7	3.597 265		
失拟项	6.445 3	3	2.148 433	0.458 686	0.726 0
纯误差	18.735 55	4	4.683 888		
总残差	2 249.08	16			

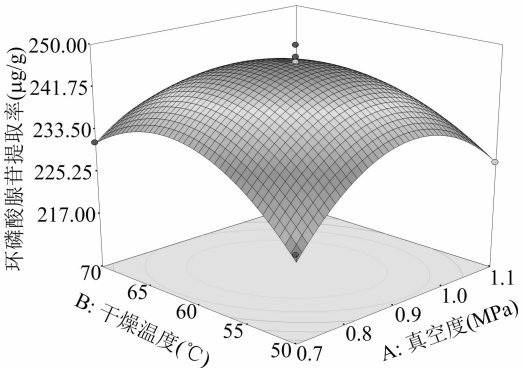


图5 A、B及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

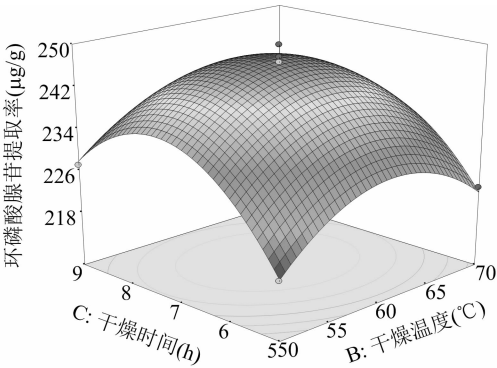


图7 B、C及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

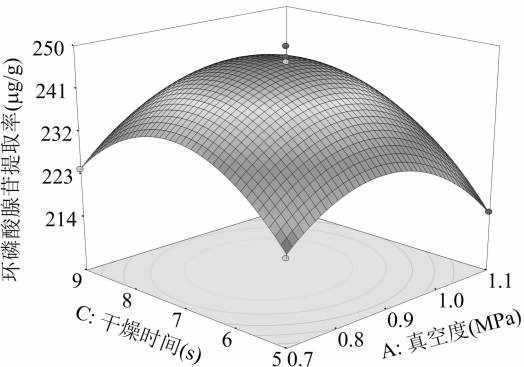


图6 A、C及其相互作用对 cAMP 提取率的影响

干燥时间 7.25 h,该条件下 cAMP 的预测提取率为 247.127 μg/g。

2.2.5 重复验证试验 为验证模型的可行性,在回归模型预测值的基础上,在真空度为 0.89 MPa,干燥温度为 60.24 ℃,干燥时间为 7.25 h 条件下重复 6 次试验,取平均值,得 cAMP 提取率为 239.35 μg/g,实际提取值与理论提取值的吻合度为 96.85%,表

明采用响应面法得到的最优提取条件各参数可靠<sup>[13]</sup>。

3 结论

比较 2 种不同的预处理方式可知,超微粉碎法处理后 cAMP 提取率为 318.31 μg/g,真空冷冻干燥处理后 cAMP 提取率为 239.35 μg/g,说明超微粉碎法处理优于真空冷冻干燥处理,且从综合环保节能的角度来看,选取超微粉碎法经济且提取效率高,可以作为提取 cAMP 的一种有效的前处理方式。

参考文献:

[1]徐 涛,潘 见,袁传勋,等. 大孔树脂 SPE-RP-HPLC 检测大枣中的 cAMP[J]. 食品科学,2005,26(12):179-181.  
[2]米 东,王 瑛,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):77-79.  
[3]尤逢惠. 大枣 cAMP 的分离纯化工艺研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2007.

邵 坚,陈 芳,吴样明,等. 不同产地乌鸡氨基酸特征及其蛋白质品质评价[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):186-191.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.040

# 不同产地乌鸡氨基酸特征及其蛋白质品质评价

邵 坚,陈 芳,吴样明,刘慧莹,李谔光

(江中药业股份有限公司,江西南昌 330004)

**摘要:**采用氨基酸比值系数法及主成分分析法对 3 个产地共 9 批次乌骨鸡的氨基酸含量和组成进行分析,以评价乌骨鸡氨基酸组成及营养价值。结果表明,不同产地乌骨鸡中氨基酸含量基本一致,含有丰富的必需氨基酸、儿童必需氨基酸、支链氨基酸和条件必需氨基酸,但 Pro、Ala、Cys、Gly、Arg 含量存在差异。乌骨鸡中氨基酸与 FAO/WHO 氨基酸模式及 FBN/IOM 氨基酸模式较为一致,必需氨基酸营养价值高,蛋氨酸和胱氨酸为乌骨鸡第一限制性氨基酸。主成分分析提取 3 个主成分,贡献率达 90.111%,其中第一主成分贡献率达 54.086%;Leu、Ile、Phe、His、Lys 在第一主成分系数占较大比重,是乌骨鸡中代表性氨基酸。

**关键词:**乌骨鸡;氨基酸比值系数法;主成分分析;蛋白质品质

**中图分类号:** TS251.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0186-06

FAO/WHO 氨基酸模式,是联合国粮农组织和世界卫生组织 (FAO/WHO) 1973 年提出的人体必需氨基酸模式。FBN/IOM 氨基酸模式,是美国科学院医学研究所和美国食品营养研究会于 2002 年提出的儿童必需氨基酸模式<sup>[1]</sup>。通过氨基酸模式对比进行氨基酸评分可较为科学地对蛋白质营养价值进行评价<sup>[2]</sup>。

乌骨鸡 (*Gallus gallus domesticus* Brisson) 属雉科动物,其皮、肉、骨俱黑,是营养价值极高的滋补品<sup>[3]</sup>。乌骨鸡蛋白中氨基酸种类齐全,氨基酸含量远高于白鸡,具有丰富的必需氨基酸、鲜味氨基酸

含量<sup>[4-5]</sup>。乌鸡现资源分布主要有 3 个类型:白丝羽乌骨鸡,主产于江西泰和地区;白扁羽乌骨鸡,主产于浙江省江山地区;黑扁羽乌骨鸡,主产于陕西略阳地区、云南昭通地区。为更科学合理地对比乌鸡蛋白营养价值进行评价,本试验选取白丝乌骨鸡、白扁羽乌骨鸡、黑扁羽乌骨鸡各 3 批次,对比 FAO/WHO 氨基酸模式和 FBN/IOM 氨基酸模式,通过氨基酸系数比值法对乌鸡蛋白营养价值进行评价,并对乌鸡中氨基酸进行主成分分析,阐述其氨基酸间规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验所用白丝羽乌骨鸡 (批号: TH20180301, TH20180506, TH20180712), 购于泰和乌骨鸡原种鸡场;白扁羽乌骨鸡 (批号: JS20180308, JS20180511, JS20180723), 购于江山市蓝丰种禽有限公司;黑扁羽乌骨鸡 (批号: LY20180309, LY20180520,

收稿日期:2019-07-02

基金项目:江西省青年科学家项目 (编号:20142BCB23C29)。

作者简介:邵 坚 (1988—),男,江西景德镇人,硕士,工程师,研究方向为产品基础研究及其评价。E-mail: shaojian1988@126.com。

通信作者:李谔光,博士,主任药师,从事中药产品开发与质量评价。

E-mail: lyg@jzjt.com。

[4]程 功,白焱晶,赵玉英. 枣属植物化学成分及药理活性研究概况[J]. 国外医药(植物药分册),1999,14(4):151-157.

[5]Nikolaus A. The current status of cyclic AMP in high plants[J]. Annual Review of Plant Physiology,1977,2(8):123-132.

[6]Cyong J C, Hanabusa K. Cyclic adenosine monophosphate in fruits of *Zizyphus jujube*[J]. Phytochemistry,1980,19:2747-2748.

[7]王立霞,和田玉枣 cAMP 的分析检测方法的研究[J]. 食品科技,2011(7):303-306.

[8]崔志强,孟宪军. 微波辅助萃取冬枣环磷酸腺苷工艺研究[J]. 食品科学,2007,28(4):163-166.

[9]毕金峰,于静静,丁媛媛,等. 响应面法优化冬枣变温压差膨化干燥工艺研究[J]. 中国食品学报,2011,11(6):119-128.

[10]李学贵,蒋文强,王传芬. HPLC 法测定大枣提取液中环腺苷酸含量的研究[J]. 山东化工,2005,34(5):27-28.

[11]李 明,杨国林,米 沙,等. 大枣环磷酸腺苷 (cAMP) 提取工艺的研究[J]. 中药材,2007,30(9):1143-1145.

[12]崔志强,孟宪军. 超声波辅助提取冬枣环磷酸腺苷工艺研究[J]. 食品科技,2006,31(12):46-49.

[13]周向辉,王 娜,石聚领,等. 微波-超声波联合提取枣中环磷酸腺苷的工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(18):196-201.