

大孔树脂 SPE — RP-HPLC 检测大枣中的 cAMP

徐 涛, 潘 见, 袁传勋, 金日生, 开桂青
(合肥工业大学 农产品生物化工教育部重点实验室, 安徽 合肥 230069)

摘 要: 目的: 建立测定大枣中环磷酸腺苷成分的反相高效液相色谱方法。 方法: 市售大枣切碎用 20% 乙醇水提取, pH 与有机溶剂协同作用下经过大孔树脂梯度分离纯化环磷酸腺苷。采用 Waters Xterra RP18 色谱柱(150mm × 3.9mm, 5 μ m); 流动相为甲醇—(0.050mol/L 磷酸二氢钠溶液)(10:90)系统; 柱温为(30 ± 1)℃; 流速为 1.0ml/min; 检测波长为 254nm。 结果: 环磷酸腺苷与其它组分的色谱峰得到基线分离。环磷酸腺苷的线性范围在 0.08~0.8 μ g 之间, 相关系数 $r = 0.9999$ 。加样平均回收率为 100.04%, 环磷酸腺苷的相对标准偏差为 1.21%($n=6$)。最低检测限为 0.5ng。结论: 本方法分离效果好, 快捷准确, 灵敏度高, 重复性好, 可作为评价大枣及其制品的参考依据。

关键词: 环磷酸腺苷; 大孔树脂; 纯化; 检测; 高效液相色谱法

Determination of cAMP in Ziziphus Jujuba by Macro Porous Resins SPE - RP-HPLC

XU Tao, PAN Jian, YUAN Chuan-xun, JIN Ri-sheng, KAI Gui-qing
(Key Laboratory of Bioprocess of the Ministry of National Education,
Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Objective To develop a method for determination of cAMP in Ziziphus Jujuba by RP-HPLC. Method: Ziziphus Jujuba was cut up and extracted by 20% ethanol -water solution. The concentrated solution was purified by micro porous resins, with elution of pH and solvent gradient. The resultant extracts were separated on a Waters Xterra RP18 column (150mm × 3.9mm, 5 μ m) and a mobile phase of methanol-0.050mol/L KH_2PO_4 (10:90) at a flow rate of 1.0ml/min and temperature (30 ± 1)℃. The detection wavelength was 254nm. Results: In the chromatogram, cAMP was separated in baseline from other ingredient. cAMP had good linearity in the range of 0.08 μ g to 0.8 μ g with the correlation coefficients of 0.9999. The average recovery was 100.04% with RSD 1.21% ($n=6$). The method permitted detection limits was as low as 0.5 ng at a signal-to-noise ratio of 3. Conclusion: The method was swift, accurate, highly sensitive and good in repetition.

Key words: cAMP; micro porous resins; purification; determination; HPLC

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0179-03

大枣(Ziziphus Jujuba)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物枣树(Ziziphus Jujuba Mill.)的成熟果实,原产于中国^[1]。传统中医理论和现代研究表明,大枣有补中益气、养血安神的作用^[2]。大枣营养丰富,环磷酸腺苷是已知植物中含量中最高的^[2]。环磷酸腺苷(Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cAMP)是第一个发现的第二信使,通过激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶(PKA),把各种调节信息带到细胞内特定的靶部位,从而起到调节酶的活性、基因表达、细胞分裂和分化等重要的生理作用^[3]。cAMP/PKA 信号通路抑制细胞增殖,具有调节细胞分裂的作用,能阻止正常细胞癌变,并能增强白细胞

的吞噬活力,提高机体免疫细胞的防御功能^[4]。

关于 cAMP 的测定有相关报道^[5,6],大枣中 cAMP 的反相高效液相色谱检测方法未见报道。

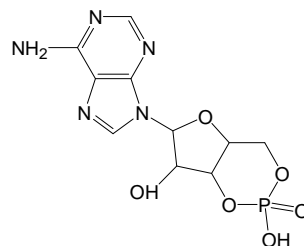


图1 环磷酸腺苷的结构式

Fig.1 Structure of cAMP

收稿日期: 2004-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20136020)

作者简介: 徐涛(1978-),男,博士研究生,研究方向为天然产物分离纯化技术。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大枣 购于当地超市,产地为山东省和陕西省等;
食用乙醇 合肥酒厂;二次重蒸水;色谱用甲醇;盐酸、氢氧化钠 中国医药集团上海化学试剂公司;
cAMP 标准品(纯度 99%)Sigma; AB-8 大孔树脂 天津南开大学化工厂。

1.2 仪器与设备

Waters 2487 紫外双波长检测器, Waters 515 泵, Waters Xterra RP18 色谱柱(3.9 × 150mm, 5 μm), Rheodyne 进样器; 冷冻干燥机; 旋转蒸发仪。

2 结果与分析

2.1 标准品溶液的制备 精密称取 cAMP 对照品 4.0mg 置于 50mg 量瓶中,加入流动相溶解并稀释到刻度,摇匀,得每 1ml 含 0.08mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 AB-8 大孔树脂用 5BV(柱床体积) 蒸馏水浸泡过夜,半流体状装于层析柱中。4BV 的 5% 盐酸溶液(W/V)浸泡 2h, 2BV/h 5% 盐酸溶液流动洗脱 3h, 蒸馏水洗至溶液呈中性; 4BV 的 5% 氢氧化钠溶液(W/V)浸泡 2h, 2BV/h 5% 氢氧化钠溶液流动洗脱 3h, 蒸馏水洗至溶液呈中性; 4BV 的 95% 乙醇浸泡过夜, 蒸馏水洗至溶液呈中性。精密称量处理过的 AB-8 约 200mg 加入到 SPE 小柱(内径 1.2cm)中待用。大枣 10g 切碎后用 20% 乙醇 50℃浸泡 3 次(固液比分别为 5:1、3:1 和 2:1), 合并滤液, 浓缩至没有乙醇的气味。过滤, 乙酸调节溶液的 pH 为 4.5。小心将上述溶液加到 SPE 小柱的柱顶, 蒸馏水(pH 为 4.5)洗至洗脱液无色澄清, 10% 乙醇溶液(pH 为 4.5)50ml 洗脱, 15% 乙醇溶液 50ml 洗脱。洗脱液 50℃减压浓缩至干, 15% 甲醇溶液溶解定容至 5ml。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters Xterra RP18 色谱柱(150mm × 3.9mm, 5 μm)。

流动相: 0.050mol/L KH₂PO₄-甲醇(90:10); 流速: 1.0ml/min; 柱温(30 ± 1)℃; 波长 254nm。

2.4 系统适用性 标准品和供试品溶液按上述色谱条件进样, 见图 2, 主峰的理论塔板数 $N = 4500$, 与其他峰的分度度 $R_s = 2.2$ 。

2.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0ml, 分别置于 10ml 量瓶中, 加入流动相稀释至刻度(浓度分别为 0.004、0.008、0.016、0.024、0.032 和 0.04g/L)。精密吸取上述对照品溶液 20μl (即为 0.08、0.16、0.32、0.48、0.64 和 0.8 μg), 注入色谱仪, 测得峰面积。以 cAMP 进样量 C (μg) 对峰面积 A

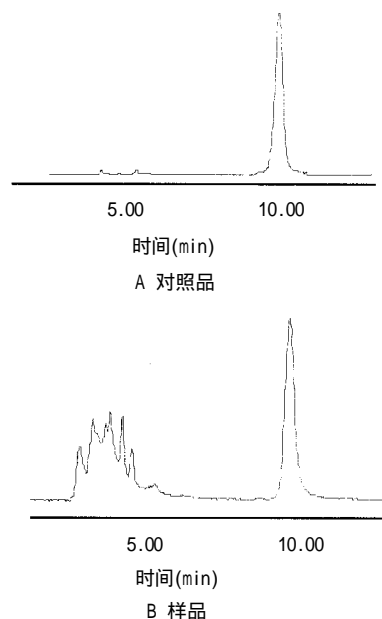


图2 环磷酸腺苷对照品和样品的 HPLC 图谱
Fig.2 HPLC of cAMP in standard and Ziziphus Jujuba extract

进行线性回归($n = 6$), 得回归方程 $A = 2353353.71 C - 4603.78$ ($r = 0.9999$)。结果表明, cAMP 在进样量 0.08~0.8 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 取对照品和供试品溶液 20μl, 按上述色谱条件分别重复进样 10 次(每次 20μl), 测定峰面积, 其 RSD 分别为 0.4% 和 1.5%。

2.7 稳定性试验 精密吸取对照品溶液 20μl, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 注入色谱仪, 按上述色谱条件测得峰面积, 其相对标准方差 RSD 为 0.8%。同时对供试品重复上述试验, RSD 为 1.7%, 表明对照品和供试品在 12 h 之内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品, 在同日内和不同日期, 分别由不同操作者, 按拟定的含量测定方法, 分别制备供试品溶液, 在同一台仪器测定 cAMP 的含量 5 次, 其日内 RSD 为 1.9%, 日间的 RSD 为 2.1%, 表明重复性好。

2.9 回收率试验 取已知含量的样品 5 份, 精密称定, 分别加入一定量的 cAMP 对照品溶液, 按拟定的含量测定方法, 分别测定 cAMP 的含量见表 1, cAMP 的平均回收率为 100.04%, RSD 为 1.21%, 表明本法有良好的回收率。

2.10 检测限 在信噪比 $S/N = 3$ (254nm) 的检测限为 0.5 ng。

2.11 样品测定 取大枣供试品溶液(3个)和对照品溶液在上述色谱条件下进样, 每次 20 μl, 用外标法测定 cAMP 的含量。结果见表 2。

表1 回收率试验

Table 1 Recovery test of Ziziphus Jujuba extract

编号	称样重 (g)	样品中 cAMP量(g)	加入对 照品量(mg)	cAMP 实测量(mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	4.997	0.4897	0.04	0.5238	99.89	100.04	1.21
2	5.006	0.4906	0.04	0.5361	101.04		
3	5.002	0.4902	0.08	0.5759	100.99		
4	4.996	0.4896	0.08	0.5759	99.96		
5	5.003	0.4903	0.12	0.6167	101.05		
6	5.002	0.4902	0.12	0.5998	98.30		

表2 大枣中cAMP的含量测定结果

Table 2 Determination of cAMP in Ziziphus Jujuba

编号	含量(%)	RSD(%)
1	0.0103	1.18
2	0.0071	1.83
3	0.0095	1.59

3 讨 论

3.1 样品的提取结果 分别采用水、20%、50%、80%乙醇作为提取溶剂。水的提取效果最好,但是杂质也较多。乙醇提取的样品最为干净,但是含量最低。这是由于cAMP为水溶性成分,在有机溶剂中的溶解度较差。综合考虑上述两种因素,最终选择10g样品用20%乙醇50℃浸泡3次,已经基本提尽大枣中的cAMP。

3.2 cAMP的纯化 大孔吸附树脂是提取中药水溶性有效成分的常用方法。具有吸附量大,可以重复利用的特点。大枣中杂质含量高,对分析结果的准确性造成影响,同时提取物中的不可逆吸附物质对分析柱的损伤较大。

3.2.1 pH梯度的影响 cAMP具有弱酸性,磷酸基团的Pka值约为1.0。为了增加其在树脂表面的吸附,调节溶液的pH分别为3.5、4.5、5.5,测定不同条件下的吸附等温线。过强的酸性对成品的品质有影响,同时树脂表面吸附较多的酸性离子,不利于cAMP在其表面的吸附。最终选择洗脱溶液的pH为4.5。为了方便cAMP

的洗脱,在最终洗脱样品的溶液中并不加入酸类物质。

3.2.2 有机溶剂的影响 水作为洗脱剂难以蒸干,对检测不利。采用乙醇水的混合溶剂梯度洗脱优于等度洗脱,水洗去提取物中的大量糖类物质,10%乙醇水溶液有效的去处大枣中与cAMP性质相似的杂质。梯度洗脱可以减少洗脱过程中cAMP的流失,有利于样品纯度的提高。

3.2.3 双梯度的分离效果 单一的改变pH值或有机溶剂的浓度,不能很好的分析目标物质。根据cAMP的性质,调节其在分离分析过程中的所处状态,综合考虑pH和有机溶剂的影响,取得了很好的分析结果。同时,样品预处理方法对于提取分离大枣中的cAMP有提示作用。

3.3 cAMP的鉴定 由于大枣中cAMP的含量较低,用如下方法进行cAMP的验证:(1)标准品和供试品的保留时间比较。(2)在供试品中添加标准品溶液进行验证。(3)标准品和供试品在254nm和280nm处的吸收值的比较。试验证明该方法可以用于大枣中cAMP的检测。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草[M]. 1999.
- [2] 樊君, 吕磊, 尚红伟. 大枣的研究与开发进展[J]. 食品科学, 2003, 24(4): 161-163.
- [3] Daniel P B, et al. Cyclic AMP signaling and gene regulation [J]. Annu Rev Nutr, 1998, (18): 353-383.
- [4] Chen T C, et al. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas[J]. Lab Invest, 1998, 78: 165-174.
- [5] 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, 22(1): 23.
- [6] 刘孟军, 王永蕙. 枣和酸枣等14种园艺植物cAMP含量的研究[J]. 河北农业大学学报, 1991, 14(10): 20-22.

信 息

研究人员在啤酒花中发现抗癌物质

啤酒花中含有一种独特的可抑制致癌酶的微量营养素。从啤酒花中分离出黄腐醇。美国俄勒冈州药学院的医药化学助理教授佛瑞德·史迪文斯发现黄腐醇具有一些独特功效。除了能抑制肿瘤生长并抑制其他可激活癌细胞的化学酶外,它还可增加一些对人体有害的化合物的水溶性,使其能更为容易地被排泄到人体外。虽然现在生产的大多数啤酒的啤酒花含量较低,并未含有太多的黄腐醇,但在烈性黑啤酒、烈性啤酒以及淡色啤酒中,这种化合物的含量较高。