

大孔吸附树脂法分离提取蜂王浆中 10-羟基-2-癸烯酸

张其安¹, 王娟², 杨少波^{1,*}

(1.山东华康蜂业有限公司, 山东日照 276500; 2.山东水利职业技术学院, 山东日照 276826)

摘要: 研究不同大孔吸附树脂对蜂王浆中10-羟基-2-癸烯酸的吸附性能, 对吸附性能优良的树脂进行解吸性能比较, 并对解吸剂进行筛选。结果表明: X-5树脂对10-羟基-2-癸烯酸的吸附及解吸性能最好, 其饱和吸附量为9.7mg/g, 最佳解吸剂为体积分数90%的乙醇溶液, 以90%乙醇溶液进行动态解吸, 解吸率达91.7%。真空冷冻干燥获得白色粉末状10-羟基-2-癸烯酸, 经高效液相色谱法检测其纯度为80.4%。

关键词: 蜂王浆; 10-羟基-2-癸烯酸; 大孔吸附树脂; 分离提取

Separation of 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid from Royal Jelly by Use of Macroporous Resin

ZHANG Qi-an¹, WANG Juan², YANG Shao-bo^{1,*}

(1. Shandong Huakang Honey Products Co. Ltd., Rizhao 276500, China;

2. Shandong Vocational College of Water Conservancy, Rizhao 276826, China)

Abstract: 10-Hydroxy-2-decenoic acid (HDA), a special bioactive component in royal jelly, has many physiological functions. In this study, we investigated the adsorption and desorption properties of HDA from royal jelly on macroporous resin and explored the optimal elution solution. X-5 resin had the best adsorption and desorption capacity for HDA and its saturated absorption capacity was 9.7 mg/g. The optimal elution solution was 90% alcohol, resulting in a dynamic desorption rate of 91.7%. The final product prepared by vacuum freeze-drying was white power with a purity of 80.4% as analyzed by HPLC.

Key words: royal jelly; 10-hydroxy-2-decenoic acid; macroporous resin; isolation and extraction

中图分类号: S896.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0116-04

蜂王浆是一种药食两用食品, 又名蜂皇浆, 由11~21日龄的青年工蜂下咽头腺和大颚腺分泌, 主要用于饲喂蜂王和幼虫, 呈乳白色、淡黄色或浅橙色半透明黏稠浆状物质, 有特殊香味, 味酸、涩、辛、略甜, 富含蛋白质、糖类、脂肪酸、维生素、游离氨基酸等生理活性物质^[1-3]。蜂王浆具有活化细胞、促使伤口愈合、促进内分泌、增加食欲、增强体力、防治骨质疏松、延缓衰老、安神、抗菌、抗癌、抗辐射等多种生理活性, 具有极高的医药和保健价值^[3-7]。

10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-HDA)又称王浆酸, 是蜂王浆中主要的生理活性成分, 德国科学家Lange于1921年首次在工蜂上颚腺中发现^[8]。1957年, Barker等首先报道从蜂王浆中分离得到10-HDA^[9]。此后, 国内外学者从性质、结构、药理及测定等方面对10-HDA进行了较为深入的研究。10-HDA是一种不饱和脂肪酸, 分子式为HO—CH₂—(CH₂)₆—CH=CH—COOH(C₁₀H₁₈O₃), 为白色絮状结晶或针状结晶, 不

易吸潮, 在高温条件下易变为油状或焦化, 低温冷冻干燥时不易升华。熔点为64℃, 溶于甲醇、乙醇、乙醚和氯仿, 微溶于丙酮, 难溶于水^[10-11]。研究表明, 10-HDA对人和动物具有多方面的药理作用^[12-13]。10-HDA作为一种拥有显著生理活性的物质, 不仅可以作为药物使用, 而且还是食品、化妆品的添加剂, 此外可以用于合成香料和医药中间体, 因此市场需求极大。

迄今为止, 已报道的10-HDA的提取方法主要有乙醇提取法、乙醚提取法、溶液沉淀结晶法、醇中沉淀结晶法及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8]等。有机溶剂提取法不但过程复杂、工序繁琐、回收率较低, 而且获得的10-HDA纯度不高。HPLC法虽然可获得纯度较高的10-HDA, 但是不适合工业化生产。本实验利用大孔吸附树脂提取蜂王浆中的10-HDA, 以期获得高纯度的10-HDA, 为10-HDA的工业化生产提供理论参考。

收稿日期: 2011-11-26

作者简介: 张其安(1966—), 男, 会计师, 本科, 研究方向为蜂产品加工与检测。E-mail: sdhkf@126.com

*通信作者: 杨少波(1978—), 男, 硕士, 研究方向为蜂产品加工与检测。E-mail: hkhoney@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂王浆采自山东华康蜂业有限公司合作社蜂场。大孔吸附树脂AB-8、X-5、D3520、D4020、H103、Nka-9由南开大学提供。

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、乙醇(分析纯) 天津市科密欧化学试剂开发中心; 10-HDA标准品(纯度 $\geq 99.0\%$)上海安普生物科技有限公司; 水为超纯水。

1.2 仪器与设备

LC-10AVP Plus高效液相色谱仪(配有SPD-10AVP紫外检测器、DGU-20A₃在线脱气机、LC-20ATXL泵、CTO-10ASVP柱温箱、手动进样器、LC-Solution数据处理软件)、AUY220型分析天平 日本岛津公司; DHZ-DA恒温振荡培养箱 太仓市豪诚实验仪器制造有限公司; BT100-2J恒流泵 保定兰革恒流泵有限公司。

1.3 方法

1.3.1 10-HDA质量浓度的测定

10-HDA质量浓度的测定参照文献[14]中方法, 将提取液、吸附残液、解吸液定容到一定体积后采用高效液相色谱外标法测定10-HDA质量浓度。

1.3.2 10-HDA提取液的制备

准确称取蜂王浆样品, 将蜂王浆样品与体积分数为95%的乙醇溶液按1:3(*m/V*)的比例混合, 振荡混匀, 置于超声波中超声提取15min, 3000r/min离心5min, 取上清液。将上清液用4倍体积的去离子水稀释, 振荡混匀, 静置1h后3000r/min离心5min, 取上清液, 即为10-HDA提取液。

1.3.3 大孔吸附树脂吸附性能的比较

取处理好的大孔吸附树脂(AB-8、X-5、D3520、D4020、H103、Nka-9)5g/份, 分别加入50mL 10-HDA提取液, 150r/min振荡吸附5h。测定提取液、吸附残液中10-HDA的含量, 计算吸附率, 比较各种树脂对10-HDA的吸附性能。每个处理设置2个重复。

1.3.4 大孔吸附树脂解吸性能的比较

取1.3.3节中筛选出的吸附性能优良的大孔吸附树脂5g/份, 分别加入50mL 10-HDA提取液, 150r/min振荡吸附5h。然后分别用体积分数50%、75%的乙醇、甲醇和丙酮解吸剂, 150r/min振荡静态解吸4h。测定提取液、解吸液、吸附残液中10-HDA的含量, 计算解吸率, 比较各种大孔吸附树脂的解吸性能。每个处理设置2个重复。

1.3.5 乙醇溶液体积分数对解吸效果的影响

以体积分数为25%、50%、75%、90%的乙醇溶液为解吸剂, 分别对吸附后的树脂静态解吸。测定提取液、解吸液、吸附残液中10-HDA的含量, 计算解吸率, 比较不同体积分数乙醇溶液的解吸效果。每个处理设置2个重复。

1.3.6 X-5树脂饱和吸附量的测定

取筛选到的X-5树脂5g/份, 分别加入10-HDA中提取液20、30、40、50、60mL, 150r/min振荡吸附5h。测定提取液、吸附残液中10-HDA的含量, 绘制吸附曲线, 计算树脂的吸附量。每个处理设置2个重复。

1.3.7 90%乙醇溶液动态解吸曲线及动态解吸率的测定

X-5树脂: 提取液1:10(*m/V*), 150r/min振荡吸附5h。弃去上清液, 树脂用去离子水冲洗3次后装入直径16mm, 柱长400mm的层析柱, 先用3倍柱体积的30%乙醇溶液洗脱。然后用90%的乙醇溶液对10-HDA进行动态解吸。流速为1mL/min, 用自动部分收集器分管收集解吸液, 每10min收集一管, 每管10mL, 测定提取液、吸附残液以及每管解吸液中10-HDA含量, 绘制解吸曲线并计算动态解吸率。

1.3.8 10-HDA纯度的测定

收集动态解吸液中10-HDA含量较高的几管, 解吸液经旋转蒸发、冷冻干燥, 获得纯化的10-HDA。准确称取一定质量纯化后的10-HDA溶于无水乙醇, 添加内标物质, 定容到一定体积, 高效液相色谱外标法测定10-HDA的质量浓度^[14]。10-HDA纯度计算公式为:

$$\text{10-HDA纯度}/\% = \frac{c \times V}{m} \times 100$$

式中: *c*为10-HDA的质量浓度(g/L); *V*为定容体积/L; *m*为10-HDA样品质量/g。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂吸附性能的比较

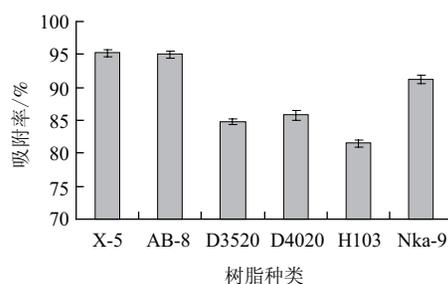


图1 大孔吸附树脂吸附性能比较

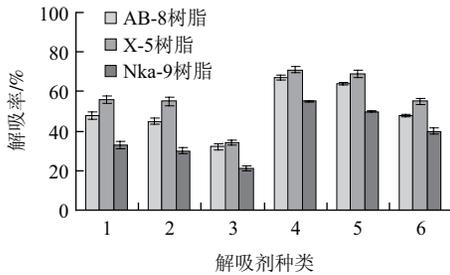
Fig.1 Comparison of adsorption capacity among different macroporous resins

由图1可以看出, X-5、AB-8、Nka-9树脂对10-HDA的吸附率均达到90%以上, 其他3种树脂吸附性能较差。因此, 选择X-5、AB-8、Nka-9树脂继续考察其解吸性能。

2.2 大孔吸附树脂解吸性能的比较

由图2可以看出, 同一种解吸剂, 体积分数越高解吸效果越好; 不同解吸剂, 以75%甲醇溶液和75%乙醇溶液作为解吸剂时解吸效果较好, 经统计分析软件SAS分析, 两者同种树脂两种解吸剂在0.05水平上无显著性差

异。3种大孔吸附树脂以X-5树脂的解吸性能最好,其静态解吸率达71%。综合各种大孔吸附树脂对10-HDA的吸附性能和解吸性能,X-5树脂对10-HDA的吸附、解吸性能均较好,但是解吸率仍达不到工业化生产的要求,需要继续研究更合适的解吸剂。



1. 50%乙醇溶液; 2. 50%甲醇溶液; 3. 50%氯仿溶液; 4. 75%甲醇溶液; 5. 75%乙醇溶液; 6. 75%氯仿溶液。

图2 大孔吸附树脂解吸性能比较

Fig.2 Comparison of desorption capacity among different macroporous resins

2.3 乙醇体积分数对解吸效果的影响

综合环保、经济等各方面的因素,选择乙醇溶液为10-HDA的解吸剂,以筛选到的X-5树脂为10-HDA的最佳吸附树脂,考察不同体积分数的乙醇溶液对10-HDA的解吸效果,其解吸效果如图3所示。可以看出,体积分数为30%的乙醇溶液不能将X-5树脂所吸附的10-HDA解吸下来;当乙醇体积分数在40%~90%范围内时,随着乙醇溶液体积分数的增大,解吸率逐渐升高,90%乙醇溶液解吸率最高,可达87.5%。

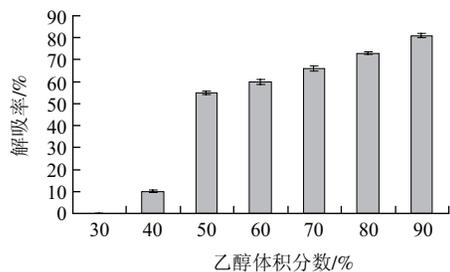


图3 乙醇体积分数对解吸效果的影响

Fig.3 Effect of alcohol concentration on desorption efficiency

2.4 X-5树脂对10-HDA吸附量的确定

将1.3.6节中提取液的体积换算成10-HDA的质量,以10-HDA的质量为横坐标,吸附率为纵坐标,绘制X-5树脂对10-HDA的吸附曲线,如图4所示。随着10-HDA质量的增加,吸附率逐渐降低,5g树脂加入10~40mg提取液时,10-HDA可被完全吸附;5g树脂加入50mg 10-HDA时吸附率可达97.4%。考虑到实际生产中应尽量减少10-HDA损失,降低生产成本,选取吸附率为97.4%时树脂吸附的10-HDA的质量为吸附量。经测定,X-5树脂的饱和吸附量为9.7mg/g。

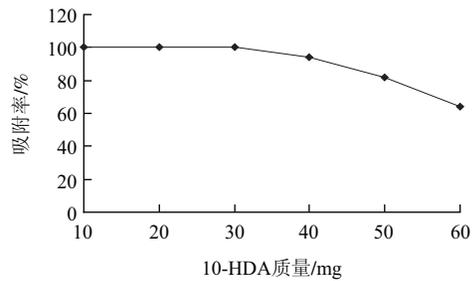


图4 X-5树脂对10-HDA的吸附量

Fig.4 Adsorption amount of 10-HDA on X-5 resin

2.5 90%乙醇溶液的动态解吸曲线

经动态解吸后,收集各管解吸液,分别测定10-HDA含量。以解吸液的体积为横坐标,解吸液中10-HDA质量浓度为纵坐标绘制动态解吸曲线如图5所示。可以看出,解吸液中10-HDA质量浓度比较集中,解吸效果较好,经计算各管的解吸率,结果总解吸率为95.3%,其中,质量浓度较高的部分(6~12管,70mL)的解吸率为91.7%,说明筛选出的树脂和解吸剂都比较理想。

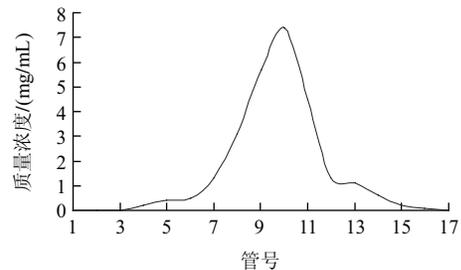


图5 X-5树脂的动态解吸曲线

Fig.5 Dynamic desorption curve of X-5 resin

2.6 10-HDA纯度的测定

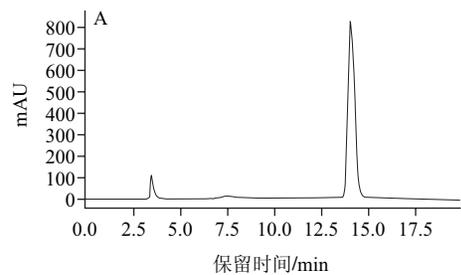


图6 10-HDA标准品(A)和制备的10-HDA纯品(B)色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of 10-HDA standard (A) and 10-HDA sample (B)

收集10-HDA质量浓度较高的第6~12管解吸液,经旋转蒸发、冷冻干燥后获得10-HDA纯品。对10-HDA标准品和制备的10-HDA纯品进行HPLC检测,10-HDA标准品的回归方程为: $Y=1657.78X+28.69$, $r=0.9987$,说明10-HDA在0~0.2mg/mL范围内线性关系良好。10-HDA标准品和制备的10-HDA纯品HPLC色谱图如图6所示。经计算,制备的10-HDA纯品纯度为80.4%。

3 讨论

大孔吸附树脂是一类多孔立体结构的非离子型人工合成的有机高分子聚合物吸附剂,理化性质较稳定,不溶于酸、碱及有机溶媒,对有机物有浓缩、分离作用且不受无机盐类及强离子、低分子化合物的干扰。其本身由于范德华力或氢键的作用,具有吸附性;还具有网状结构和很高的比表面积,故具有筛选性能^[15]。因此,大孔吸附树脂广泛应用于水处理、化工、制药以及食品方面的分离及纯化。

本实验筛选的大孔吸附树脂X-5对10-HDA选择性较好,有较大的吸附量,容易吸附、解吸,动态解吸率高,用于分离、纯化10-HDA可获得高纯度的10-HDA,而且具有回收率高、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等诸多优点,适用于10-HDA的大规模工业化生产。

参考文献:

- [1] 中国国家标准化管理委员会. GB 9697—2008 蜂王浆[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [2] 王腾飞. 产10-羟基-2-癸烯酸微生物菌株的选育[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2006.
- [3] HIROSHI I, MASAMITSU S, KAZUHIRO T, et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human[J]. BMC Complement Altern Med, 2009, 9: 45.
- [4] YOSHIMI N, KAZUHIRO T, MASAMITSU S, et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities[J]. BMC Complement Altern Med, 2009, 9: 4.
- [5] SABURO H, YOSHIZO O, SATOSHI U, et al. Royal jelly prevents osteoporosis in rats beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2006, 3(3): 339-348.
- [6] JUYOUNG K, YOUNGAE K, HYEJEONG Y, et al. Royal jelly enhances migration of human dermal fibroblasts and alters the levels[J]. Nutrition Research and Practice, 2010, 4(5): 362-368.
- [7] YOKO H, YASUNORI F, HIROE M, et al. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): 523-527.
- [8] 贺春玲, 嵇保中, 刘曙文, 等. 10-羟基-2-癸烯酸研究进展及展望[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 227-231.
- [9] BARKER S A, FOSTER A B, LAMB D C, et al. Biological origin and configuration of 10-hydroxy- δ^2 -decenoic acid[J]. Nature, 1959, 184(9): 634-639.
- [10] 王海燕. 产10-HDA菌株的改良及发酵调控[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2008.
- [11] 刘晓华, 孙文基. 王浆酸的研究进展[J]. 中国药品标准, 2004, 5(1): 9-10.
- [12] SATORU I, YUJI N, HIDEFUMI F, et al. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-*trans*-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012(2012): 1-6.
- [13] HIROSHI I, YUICHI C, MASAMITSU S, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2009, 6(4): 489-494.
- [14] 陈杰. HPLC法测定蜂王浆及蜂王浆冻干粉中的10-羟基- α -癸烯酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1077-1078.
- [15] JIANG Xinyu, ZHOU Jinhua, ZHOU Chunshan. Study on adsorption and separation of naringin with macroporous resin[J]. Front Chem Chin, 2006, 1(1): 77-81.