

发酵液中提取 10-HDA 的研究

王腾飞,王海燕,刘洪玲,王 乐,王瑞明

(山东轻工业学院,食品与生物工程学院,山东 济南 250100)

摘 要: 10-HDA 为 10-羟基-2-癸烯酸(10-Hydroxy-2-Decenoic 酸),是蜂王浆中的特殊活性物质,抗菌、灭菌、强壮肌体和具有强烈抑制移植性 AKR 白血病、TA3 乳腺癌及多种腹水型艾利虚癌等癌细胞生长的作用。蜂王浆中 10-HDA 的提取方法有乙醚萃取法、乙醇提取法、溶液沉淀结晶法、醇中沉淀结晶法及从发酵液中提取法等。不同浓度、不同体积的乙醇对产率及质量有影响;不同体积的反萃取剂水对产率也有影响;不同温度对结晶有影响。(孙悟)

关键词: 10-HDA; 提取; 研究

中图分类号:TQ 920.1;TQ 22;O 623 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)01-0027-03

Study on the Extraction of 10-HDA from Fermenting Liquid

W ANG Teng-fei, W ANG Hai-yan, L IU Hong-ling, W ANG Le and W ANG Rui-m ing

(Department of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jifan, Shandong 250100, China)

Abstract: 10-HDA, the abbreviation of 10-hydroxy-2-decenoic acid, as a special active substance in royal jelly, has the functions including antibiosis, sterilization, tonicity, and inhibiting strongly the development of transplanted AKR leukemia and the growth of cancer cells of TA3 mammary cancer etc. The extraction methods of 10-HAD from royal jelly covers ether process, alcohol extracting method, liquid precipitate crystallization process, precipitate in alcohol crystallization process, and fermenting liquid extracting method. The quality and the yield of 10-HAD are mainly influenced by alcohol concentration, alcohol volume, back extractant water quantity, and temperature. (Trans. by YUE Yang)

Key words: 10-HDA; extraction; research

10-羟基-2-癸烯酸(10-Hydroxy-2-Decenoic 酸, 10-HDA),分子量 186.25,白色晶体,熔点 64℃,溶于甲醇、乙醇、乙醚和氯仿,微溶于丙酮,不溶于水,对石蕊试纸显酸性,能使溴水迅速褪色,也能使高锰酸钾溶液迅速褪色,对三氯化铁不显紫色,是一种天然的不饱和脂肪酸,是蜂皇浆的主要活性成分之一,又称蜂王酸或皇浆酸,10-羟基-2-癸烯酸的分子式为 $\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$)^[1]。

10-HDA 是蜂王浆中含有的特殊活性物质,是评价蜂王浆质量的重要指标,具有多种生理活性,抗菌^[2]、灭菌^[3]、强壮肌体和具有强烈抑制移植性 AKR 白血病、TA3 乳腺癌及多种腹水型艾利虚癌等癌细胞生长的作用^[4,5]。研究表明,10-HDA 具有免疫调节^[6]和抗肿瘤作用,可促进小鼠 T 淋巴细胞(T lymphocyte 子集)、脾白介素 2(Interleukin-2)的增加^[7]和肿瘤坏死因子(Tumor 坏死因素)的产生^[8],还能防止脱发^[9],治疗急性辐射损伤

^[10]和化学物质所致损伤^[11],以及用作化妆品的增效剂,防止衰老,刺激表皮再生和更新,同时对血管紧张素转化酶具有抑制活动,10-HDA 与百里醌或者含有百里醌的植物产物结合用来治疗艾滋病和其他的免疫缺乏疾病药物已经被发明^[12]。遗传毒理学和药理学研究结果表明,10-HDA 能促进骨髓细胞分裂,促进人体外周血淋巴细胞脱氧核糖核酸的合成,促进被 PHA 激活的淋巴细胞的转化作用,增强免疫力。

为了更好地了解 10-HDA 的特性,我们对蜂王浆进行了研究,及通过对蜂王浆的认识,探索从发酵液中提取 10-HDA 的方法,由于 10-HDA 在菌体中的存在方式不能确定,因此在提取过程中,还需要不断的改进和创新提取方法。例如,如果 10-HDA 作为一种游离脂肪酸存在,是能够分泌到细胞外的;如果 10-HDA 作为一种结合状态存在,其是否能够分泌到细胞外,又以何种模式存在,如何破坏结合状态等,尚属未知,因此这就给

收稿日期:2005-08-29

实验带来了难度。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

材料:乙醇、乙醚、甲基异丁基酮、盐酸和活性炭。
 仪器:SHB-111 循环水真空泵、M P200-1 电子天平、TDL-5-A 低速离心机、RE-52A 旋转蒸发仪、HZQ-Q 振荡器和微滤膜。

1.2 蜂王浆中 10-HDA 的提取方法研究

1.2.1 乙醇提取法

称取一定量蜂王浆于三角瓶中按 1 3 的比例加入 95% 的乙醇,充分振荡,静置 1~2 h,以 5000 r/min 的转速离心 20 min,弃沉淀取上清液。向上清液中加入 3 倍体积的去离子水,进行反萃取,摇匀后将其置于-18℃ 冰箱中结晶 4~6 h。结晶后趁冷微滤,滤饼置室内风干,然后将其移至真空干燥器中干燥 40~60 min,得成品。

1.2.2 乙醚萃取法

定量称取蜂王浆,溶解于乙醇中,离心弃去沉淀,按 1 1 的体积比例加乙醚萃取,充分振荡,静置 10 min 分层,用分液漏斗分液,乙醚层用旋转蒸发器于 40℃ 常压蒸出,然后用少许乙醇(大约 2 mL)溶解烧瓶残留物,静置低温结晶。

1.2.3 溶液沉淀结晶法

称取一定量的蜂王浆溶于定量的 95% 的乙醇中,用 6 mol/L 的盐酸酸化至 pH2.0,抽滤,滤饼溶于甲基异丁基酮,加活性炭脱色后,压滤除去王浆渣和活性炭,滤液放置冷却结晶。

1.2.4 醇中沉淀结晶法

称取一定量的蜂王浆溶于乙醇溶液,离心除去王浆渣,上清液用 6 mol/L 的盐酸酸化,得结晶沉淀,过滤,并溶解于沸乙醇中,加活性炭抽滤,滤液放置冷却结晶,得白色晶体。

1.2.5 从发酵液中提取 10-HDA

在对发酵液处理的过程中,考虑到发酵液的实际情况,以及与蜂王浆的不同,综合各种方法,确定从发酵液中提取 10-HDA。具体方法为:先将发酵液 5000 r/min 离心 20 min,取上清液,洗涤菌体 1~2 次,分离菌体,将上清液加入同体积的乙醚或者氯仿(较少用、毒性大),充分振荡,然后静置 30 min,置于分液漏斗中,再次静置 20 min,分液,将乙醚层置于旋转蒸发器中 40℃ 旋转蒸发,用 2~5 mL 95% 的乙醇溶解剩余物,于小试剂瓶中低温保存,待检;将菌体置于少量乙醚中静置过夜,分液,液层除去乙醚,用 2~5 mL 95% 的乙醇溶解剩余物,低温保存,待检。

2 结果分析与讨论

根据不同方法最后所得结晶的质量与结晶中 10-HDA 含量,通过比较,以乙醇提取法为最好,并对该方法的影响因素作了进一步的研究。

2.1 不同浓度的乙醇对产率及外观的影响

分别向 4 个盛有 10 g 左右的蜂王浆的三角瓶中加入相同体积但浓度不同的乙醇溶液对其进行萃取,再依照工艺操作,得 10-HDA 结晶,结果见表 1。

表 1 不同乙醇浓度对产率的影响

乙醇浓度 (%)	蜂王浆 (g)	乙醇体积 (mL)	结晶 (g)	产率 (%)	现象
100	10.5	50	0.20	1.9	结晶中带有黄色
95	10.4	50	0.21	2	黄色杂质很少
70	10.0	50	0.18	1.8	过滤速度极慢
50	9.9	50	/	/	萃取液粘稠无法过滤

虽然不同浓度的乙醇对 10-HDA 结晶产率影响不大,但对结晶质量、结晶速率却有很大影响,综合各种因素,采用 95% 的乙醇作萃取剂。

2.2 不同体积乙醇对产率及质量的影响

向蜂王浆中加入不同体积的 95% 的乙醇,按实验方法操作,确定不同体积乙醇对产率及质量的影响,结果见表 2。

表 2 不同体积的 95% 的乙醇对产率及质量的影响

95%乙醇体积 (mL)	蜂王浆 (g)	结晶 (g)	产率 (%)	现象
15	10.0	0.17	1.7	黄色杂质较多
20	10.0	0.18	1.8	黄色杂质
30	10.0	0.2	2	观察不到黄色杂质
40	10.0	0.19	1.9	观察不到黄色杂质

综合各项实验结果,在实际操作中,可以采用 1 g 蜂王浆加 3 mL 的 95% 的乙醇作萃取剂,这样萃取效果更佳。

2.3 不同体积的反萃取剂对产率的影响

取 10 g 左右的蜂王浆按实验步骤进行萃取、过滤、量取滤液体积,然后分别向滤液中加入不同体积比的反萃取剂——纯净水,其结果见表 3。

表 3 不同体积水对产率及质量的影响

蜂王浆 (g)	V _{滤液} :V _水	结晶 (g)	产率 (%)	现象
10.0	1:1	无	/	基本无结晶
10.0	1:2	0.19	1.9	有少量黄色杂质
10.0	1:3	0.2	2	基本无黄色杂质
10.0	1:4	0.18	1.8	基本无黄色杂质
10.0	1:5	0.19	1.9	基本无黄色杂质

试验表明,过滤液与水的最佳比例是 1 3。

2.4 不同温度对结晶的影响

在实验过程中又做平行实验,在后期结晶过程中,分别进行了不同温度对结晶的影响研究,结果见表 4。

表 4 不同结晶温度对结晶速率和结晶质量的影响

温度 (℃)	结晶时间 (h)	结晶状况
5	24	结晶不明显,不易过滤,絮状
0	16	结晶不明显,不易过滤,絮状
-18	2~3	结晶明显,颗粒大,易分离

3 结论

通过与各种方法的比较,所设计的方法简单易行、纯度高、杂质少,达到了提取要求,并且在分析过程中对仪器没有什么影响和破坏,达到了需要的分析纯度。

参考文献:

- [1] 王龙杰,卢泽勤.蜂王酸的制备及应用[J].广西化工,1996,25(1):7.
- [2] Seva B J et al. Organic acids influence on the microbiological quality and bacteriostatic activity of royal jelly[J]. Lebensmittel-Rundschau, 1991, 87(8): 9-256.
- [3] Yatsunami K et al. Antibacterial action of royal jelly[J].
- [4] Isoda Y et al. Antitumor activity of lipids. Antitumor or activity of free fatty acid in mice with transplants tumors[J]. Y ukagaku. 1993 42(11): 923-928.
- [5] 戴静芝,等.蜂王浆及 10-羟基-2-癸烯酸药理活性实验[J].医药工业,1985,(16):219.
- [6] Wang G Y, Lin Z B. Effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on T lymphocyte and its subtypes and interleukin 2 production in mice[J]. Zhongguo Yaoxue Y u D uixue Zazhi, 1996, 10(1): 53.
- [7] Wang G Y, Lin Z B. Effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on phagocytosis and cytokines production of peritoneal macrophages[J].
- [8] 周凤梧,等.蜂王浆的医疗作用及服用剂量[J].山东中医杂志,1994,13(3):126-127.
- [9] 石憬林,等.蜂产品在防治脱发和美发上的应用[J].蜜蜂杂志,1990,(1):11-12.
- [10] 刘力生,等.王浆对小鼠辐射损伤治疗作用的实验研究[J].中华放射医学与防护杂志,1984,4(3):25-26.
- [11] 杨晓琳,等.人参总甙及蜂王浆抗化学物质所致 DNA 损伤作用初探[J].北京医科大学学报,1990,22(1):75.
- [12] M c k k a w i, S h e r i f S a b r y, R a g a b (E g y p t). U s e o f a n i r o n - b i n d - i n g g l u c o p r o t e i n a n d / o r 10 - h y d r o x y - 2 - d e c e n o i c a c i d i n c o m b i n a t i o n w i t h t h y m q u i n o n e f o r t h e t r e a t m e n t o f A I D S a n d o t h e r i m m u n o d e f i c i e n c y d i s e a s e s [J]. G e r D E 198 - 14022 C I 25 M a y 2000 4 (G e r m a n y)

1990~2004 年日本清酒出口额

(×1000 日元)

(据日本财务省贸易统计)

出口地	1990 年	1991 年	1992 年	1993 年	1994 年	1995 年	1996 年	1997 年
总计	2680421	2832924	2663682	2708828	3042846	2966637	3886339	3583643
中国台湾	649216	887349	797039	952068	1311757	1208371	1819703	1495774
中国香港	158522	190544	219182	252559	285082	306948	393273	315352
中国大陆	19586	22703	26426	39147	18082	20878	47128	40581
美 国	922449	745887	584666	541507	530364	588170	682492	831311
加拿大	121337	142409	117555	94358	88924	77532	99787	86668
英 国	186916	145755	156572	153224	118206	104246	135914	133645
德 国	114356	144483	152043	129481	92170	45518	42931	44006
法 国	55442	67676	61142	58952	80376	61001	69731	51444
出口地	1998 年	1999 年	2000 年	2001 年	2002 年	2003 年	2004 年	
总计	3374862	2843397	3009188	3192147	3521013	3921501	4090592	
中国台湾	1299025	796262	586618	465850	598475	597588	484179	
中国香港	334950	289559	336888	408455	389581	485243	476162	
中国大陆	26796	35658	33944	41902	83074	93593	82514	
美 国	889967	920526	1105678	1262231	1466959	1681522	1935734	
加拿大	66074	75038	102622	105431	118112	148552	147619	
英 国	132829	100411	118137	121638	115456	131185	132333	
德 国	30833	43977	66855	97501	65889	76031	87815	
法 国	44177	55503	77397	58606	54352	44173	53642	

晓摘自日本酿造协会志, 2005, (9): 600.