

Study on the Separation and Purification of Bee Bread Flavonoids with Polyamide Resin

Shuai Li, Nurbiya Yalkun, Abdulla Abbas*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang
Email: 1078728458@qq.com, abdulla@xju.edu.cn

Received: Apr. 26th, 2015; accepted: May 15th, 2015; published: May 21st, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Bee bread flavonoids extract purified with macroporous resin was purified further with polyamide resin. The influence of different kinds of pH and sample concentration on the features of static absorption of crude flavonoids was compared and dynamic adsorption experiments were conducted. The results showed that the optimum experimental conditions were as follows: loading concentration of flavonoids was 0.522 mg/ml, pH 8.0, the height of column was 19 cm, and the most effective desorption was obtained with 90% of alcohol as eluent with a flowing rate of 1.00 ml/min. After purified under optimum conditions by polyamide resin adsorption chromatography for two times, the content of flavonoids reached 32.6% and the recovery reached 64.7%.

Keywords

Bee Bread, Total Flavonoids, Polyamides, Purification, Purity, Recovery

聚酰胺树脂层析纯化蜂粮总黄酮的研究

李 帅, 努尔比亚·亚力坤, 阿不都拉·阿巴斯*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐
Email: 1078728458@qq.com, abdulla@xju.edu.cn

收稿日期: 2015年4月26日; 录用日期: 2015年5月15日; 发布日期: 2015年5月21日

*通讯作者。

摘要

使用聚酰胺对经过大孔树脂层析的蜂粮总黄酮提取液进行进一步纯化。考察了pH值和样液浓度对聚酰胺静态吸附的影响,并进行了动态吸附试验,确定了蜂粮总黄酮分离纯化的最佳条件:上液浓度0.522 mg/ml, pH值8.0,柱高19 cm,洗脱剂为90%乙醇,洗脱流速1.0 ml/min。在最佳条件下,经过两次层析,蜂粮黄酮纯度达到32.6%,回收率达到64.7%。

关键词

蜂粮, 总黄酮, 聚酰胺, 纯化, 纯度, 回收率

1. 引言

蜂粮(bee bread)是蜂花粉在微生物作用下发酵后形成的酿制产物,富含蛋白质、油脂、维生素,并且含有人体所必需的全部氨基酸,具有极高的营养价值。另外,蜂粮还含有黄酮、多酚、生物碱、有机酸等生物活性物质[1][2]。现代药理研究表明黄酮具有多种生物活性,主要表现在对心血管系统的作用[3]、抗菌抗病毒[4]、免疫激活[5]和抗氧化作用等,适量摄入黄酮类化合物能减少癌症、肿瘤、心血管疾病、脂质过氧化以及骨质疏松等疾病的发病率[6][7]。由于黄酮类化合物具有多种生物活性,可广泛用于医药、保健、食品及化妆品等领域[7]。

聚酰胺树脂法具有方法简单、成本低、效率高、稳定性好和容易再生等特点[8],除此之外还有得到的产品安全,不存在重金属、有机溶剂毒性残留等问题的优点[9]。王成章、张伟等人的研究发现聚酰胺树脂对黄酮有良好的选择性,并且对黄酮优先吸附[10][11]。因此,聚酰胺可以用来对大孔树脂层析后的黄酮提取液进行进一步的纯化。王睿等利用聚酰胺对 hp-20 层析过的蜂粮黄酮提取液进行进一步纯化,使蜂粮黄酮的纯度由 53.46% 提高到 90.26% [12]。

2. 材料与方法

2.1. 材料

蜂粮由新疆伊犁拉合曼蜂业有限公司提供,芦丁购自中国药品生物制品检定所,聚酰胺为青岛海洋化工厂产品,亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸均为分析纯。

供试仪器:721 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);DF310A 型粉碎机(江苏省南通友邦机械有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市英峪峪华仪器厂);LAC164 电子分析天平(精确至 0.0001 g,上海特勒-托利多仪器有限公司);HH-S 型水浴锅(巩义市英峪峪华仪器厂);DHG-9141A 型电热恒温干燥箱(上海精宏试验设备有限公司)。

2.2. 蜂粮黄酮的提取与聚酰胺树脂的预处理

2.2.1. 蜂粮黄酮的提取

将蜂粮粉碎,过 80 目筛,在最佳提取条件下(固液比 1:5,乙醇体积分数 80%、回流时间 1 h、温度 60℃)进行提取试验,提取 2 次,合并滤液,过大孔树脂,浓缩至一定体积,备用。

2.2.2. 聚酰胺树脂的预处理

将聚酰胺树脂装柱用乙醇冲洗,直到加水无白色浑浊,用蒸馏水洗至无酒精味,再用 20 倍体积 4%

氢氧化钠冲洗，蒸馏水洗至中性后用 20 倍体积 4% 盐酸冲洗，再用蒸馏水洗至中性，浸泡备用。

2.3. 蜂粮总黄酮含量的测定

2.3.1. 标准曲线的绘制[13]

精确称取 120℃ 干燥恒重的芦丁对照品 5 mg，用 60% 乙醇溶解，摇匀，定容至 50 ml，制成浓度为 0.1 mg/ml 的芦丁标准品溶液，备用。精密量取芦丁标准品溶液 0、1、2、3、4、5 ml，分别加入 0.8 ml 5% 亚硝酸钠溶液，混匀后放置 6 min，加 10% 硝酸铝溶液 0.8 ml，混匀后放置 6 min，加入 4% 氢氧化钠溶液 10 ml，混匀，用 60% 乙醇定容至 25 ml，静置 15 min，于 510 nm 下测定吸光度。以对照品芦丁浓度(mg/ml) 为横坐标、吸光度值为纵坐标作图并进行线性回归，得回归方程 $C = 5.607A - 0.0003$ ， $R^2 = 0.9998$ 。

2.3.2. 蜂粮黄酮提取液浓度的测定

吸取蜂粮黄酮提取液 1 ml 置于 25 ml 容量瓶中，按照 1.31 的方法测定其吸光度，由回归方程求出总黄酮浓度。

2.4. 不同条件下聚酰胺树脂对蜂粮总黄酮静态吸附量的测定

2.4.1. pH 值对聚酰胺树脂吸附效果的影响

分别称取干聚酰胺树脂 0.2 g，置于 5 个容量为 100 ml 的三角瓶中，加少量蒸馏水浸泡 4 h，使其吸水饱和，滤掉多余水分，分别加入 pH 值为 5、6、7、8、9，浓度为 0.522 mg/ml 的样品液 40 ml，在室温下振荡吸附 24 h，使其充分平衡。根据回归方程测定平衡液中总黄酮的浓度，并计算相应吸附量(Q) [11]：

$$\text{吸附量}(Q) = (C_1 - C_2) \times V/W$$

式中，Q 为吸附量(mg/g)； C_1 为初始浓度(mg/ml)； C_2 为吸附后浓度(mg/ml)；V 为溶液体积(ml)；W 为树脂质量(g)。

2.4.2. 样液浓度对聚酰胺树脂吸附效果的影响

按照 2.4.1 的方法处理 5 份树脂。将 40 ml、pH8.0、浓度分别为 0.133、0.266、0.522、0.788、1.01 mg/ml 的样品液分别加入 5 份树脂中，操作同上，计算吸附量(Q)。

2.5. 不同条件下聚酰胺树脂柱对蜂粮黄酮分离纯化的测定

2.5.1. 洗脱剂浓度对聚酰胺树脂解吸效果的影响

洗脱剂一般选用甲醇或乙醇，相比甲醇，乙醇毒性低、易回收，因此选用乙醇作为洗脱剂。取经过预处理的聚酰胺树脂，装入内径为 1.5 cm 的层析柱，柱高为 16 cm。按静态吸附试验中确定的最佳条件(黄酮浓度 0.522 mg/ml，pH8.0)上样，上样流速 0.5 ml/min 进行吸附。分别用 60%、70%、80%、90%、100% 的乙醇进行动态洗脱，洗脱流速 1 ml/min，至洗脱液中黄酮含量达到最低。分别测定洗脱液黄酮含量，计算相应的解吸率(%)：

$$\text{解吸率}(\%) = (C \times V/M) \times 100$$

式中，C 为洗脱液黄酮浓度(mg/ml)；V 为洗脱液体积(ml)；M 为洗脱前黄酮含量(mg)。

2.5.2. 柱高对层析效果的影响

取经过预处理的聚酰胺树脂，分别填装 13、16、19、22 cm 的聚酰胺。按静态吸附试验中确定的最佳条件(黄酮浓度 0.522 mg/ml，pH8.0)上样，上样量为 20ml，上样流速 0.5 ml/min。用 90% 乙醇进行动态洗脱，洗脱流速 1 ml/min。收集洗脱液，测定浓度，计算黄酮含量和回收率；放入烘箱中干燥后称重，计算黄酮纯度。

2.5.3. 洗脱流速对层析效果的影响

取经过预处理的聚酰胺树脂装柱，柱高 19 cm，在已确定的最佳条件上样，上样流速 0.5 ml/min。用 90% 乙醇进行洗脱，调整层析柱下方的旋钮使洗脱流速分别为 0.5、1.00、1.5 ml/min，收集洗脱液，后续操作见 2.5.2。

2.5.4. 聚酰胺树脂层析精制级数对蜂粮黄酮纯度的影响

采用上述试验中确定的最佳条件进行聚酰胺树脂层析，收集洗脱液；采用确定的最佳条件对该洗脱液进行 2 次纯化。测定粗品、一次过柱所得物、二次过柱所得物中蜂粮黄酮含量，并计算回收率、纯度。

3. 结果与分析

3.1. 不同条件对聚酰胺树脂蜂粮黄酮静态吸附的影响

3.1.1. pH 值

从图 1 可以看出，在 pH 值为 8.0 时蜂粮黄酮吸附量最大，所以样液的最佳 pH 值为 8.0。这个结果表明，在 pH 为 8.0 时样液中黄酮类物质呈现分子状态的量最大，样液中的弱碱性黄酮类物质占大多数。

3.1.2. 样液浓度

吸附树脂的吸附容量一般以适中浓度进行较为有利，如果原液浓度偏低，则在吸附达到平衡时，大部分树脂都没有达到吸附饱和，使树脂使用效率低；如果原液浓度偏高，则容易发生絮凝，将树脂孔隙堵塞，降低吸附效率。由图 2 可知，当蜂粮黄酮溶液浓度对吸附效果影响理论还是比较符合的，随着浓度的增大，吸附量先增大后稍微减小，浓度到 0.522 mg/ml 时，吸附量达到最大。110 mg/g 的最大吸附量与杨少娟等在对甘草总黄酮研究时的 250 mg/g 相比有较大差距[14]，但王伟对山楂总黄酮研究时最佳浓度的吸附量是 120 mg/g [11]，这说明聚酰胺的最大吸附量随着纯化对象和出产厂家的不同有较大的差异。

3.2. 不同条件对分离纯化蜂粮黄酮效果的影响

3.2.1. 洗脱液浓度

从图 3 可以看出，随着乙醇浓度的增大，聚酰胺的解吸率逐渐增大，当乙醇浓度达到 90% 时，解吸率达到最大。王伟研究表明聚酰胺对总黄酮吸附量大，而吸附强度小[11]，易洗脱，所以各个浓度的乙醇都有较好的解吸率，至于最佳浓度则随纯化物质的不同而有所差异。

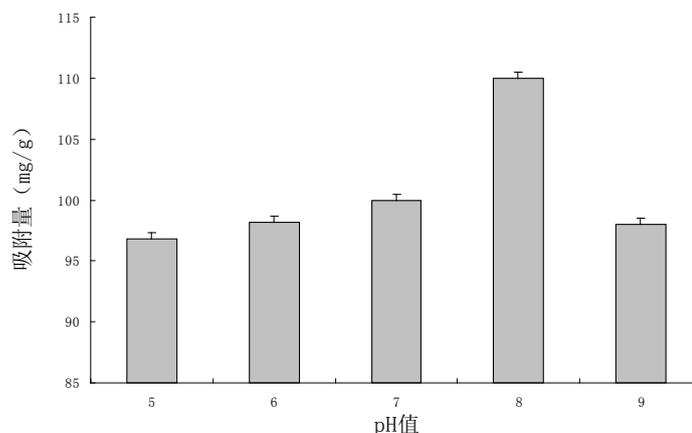


Figure 1. Effect of pH on adsorption of total flavonoids with polyamide resin

图 1. pH 值对聚酰胺吸附黄酮的影响

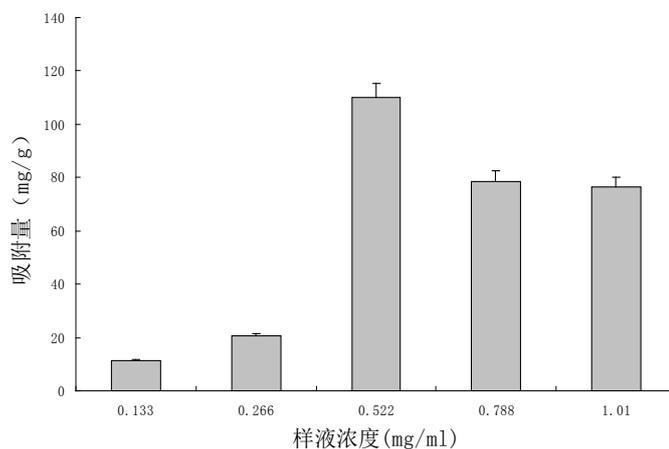


Figure 2. Effect of concentration on adsorption of total flavonoids with polyamide resin

图 2. 样液浓度对聚酰胺吸附黄酮的影响

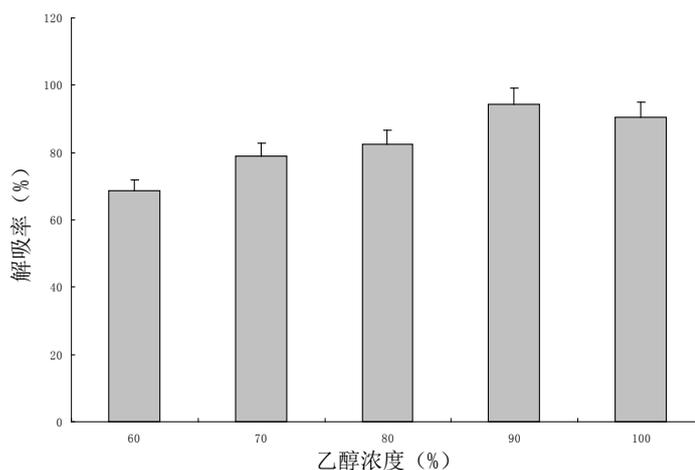


Figure 3. Effect of ethanol aqueous solution concentration on desorption of total flavonoids with polyamide resin

图 3. 洗脱液浓度对聚酰胺解吸效果的影响

3.2.2. 柱高

聚酰胺柱高对分离纯化黄酮效果有明显的影响，当柱高过低时，会导致吸附量过少，洗脱时间短，分离效果不好；当柱高过高时，会造成洗脱困难，增大洗脱体积，并且拖尾现象严重。由表 1 可知，当柱高为 19 cm 时，所得产品的纯度和回收率最大，同时吸附与洗脱的时间也较适宜。因此最佳柱高选择 19 cm。

3.2.3. 洗脱流速

从表 2 可以看出，当洗脱流速为 0.5 ml/min 时，洗脱液中的黄酮含量最多，回收率也最高，但是提取液中黄酮和杂质并没有很好的分离，导致纯度较低；当洗脱流速为 1.0 ml/min 时，洗脱液中的黄酮纯度最高，但是回收率却有所下降；当洗脱流速为 1.5 ml/min 时，由于洗脱流速过快，洗脱液与聚酰胺树脂吸附的黄酮类物质进行交换的效果较差，因而不能达到很好的洗脱效果，黄酮纯度和回收率都有所下降。综合考虑纯度、回收率，选择 1.0 ml/min 的流速为最佳洗脱流速。

3.2.4. 聚酰胺树脂层析精制级数

将经过大孔树脂层析的蜂粮黄酮提取液，采用已确定的最佳试验条件进行聚酰胺树脂层析。粗品、

Table 1. Effect of column height on purification of total flavonoids with polyamide resin**表 1.** 柱高对聚酰胺纯化黄酮效果的影响

柱高(cm)	纯度%	回收率%
13	15.1%	62.2%
16	16.7%	71.3%
19	20.2%	75.6%
22	18.8%	73.65%

Table 2. Effect of elution rate on purification of total flavonoids with polyamide resin**表 2.** 洗脱流速对聚酰胺纯化黄酮效果的影响

洗脱流速(ml/min)	纯度%	回收率%
0.5	16.7%	86.8%
1.0	20.3%	75.6%
1.5	19.7%	71.4%

Table 3. Effect of refined series on purification of total flavonoids with polyamide resin**表 3.** 精制级数对聚酰胺纯化黄酮效果的影响

精制级数	黄酮含量(mg)	纯度%	回收率%
粗品	10.4	10.4%	
1 级	7.9	20.3%	75.6%
2 级	6.8	32.6%	64.7%

一次过柱所得物(1 级)、二次过柱所得物(2 级)的黄酮含量、回收率和纯度如表 3 所示。结果表明, 草黄酮粗提物经过两次聚酰胺树脂柱层析后, 黄酮含量由粗品的 10.4% 升高到 32.6%, 纯度提高了 3.13 倍。

4. 结论

聚酰胺树脂层析纯化蜂粮黄酮的最佳条件为上样液浓度 0.522 mg/ml、pH 8.0、乙醇洗脱液浓度 90%、洗脱流速 1.0 ml/min。采用确定的最佳试验条件, 经两次上柱后可黄酮含量由粗品的 10.4% 升高到 32.6%, 纯度提高了 3.13 倍, 并没有取得较为理想的黄酮纯度。卫强等对对菊叶总黄酮纯化时, 聚酰胺-大孔树脂联用之前先用石油醚萃取提取液, 最终总黄酮纯度达到 87.48% [15]。大孔树脂层析时, 去除了水溶性杂质, 对脂溶性杂质却没有进行处理, 可能是因为脂溶性杂质过多, 导致的纯化效果不明显。使用石油醚对二次过柱所得物进行萃取, 可以得到回收率 50.2%, 纯度 52.4% 的蜂粮黄酮提取液。但是石油醚溶于乙醇, 在提取液中会产生残留, 干扰黄酮含量的测定, 使结果的重现性较差。因此, 提取液中的脂溶性杂质需要进一步研究, 通过其他方法解决。

参考文献 (References)

- [1] 刘祥伟, 王静, 高夫超, 吕云岭, 赵占鳌, 韩伟 (2012) 天然蜂粮的营养成分分析. *中国蜂业*, **24**, 31-33.
- [2] 努尔比亚·亚力坤, 阿依努尔·热西提, 李帅, 阿不都拉·阿巴斯 (2014) 新疆伊犁河谷伊犁黑蜂野花蜂粮初步研究. *食品工业*, **1**, 197-199.
- [3] Karvaj, M., Beno, P. and Fedor-Freybergh, P.G. (2007) Positive effect of flavonoids to cardiovascular and central nervous system. *Neuroendocrinology Letters*, **28**.
- [4] Young, K.S., Kang, J.-Y. and Myung-Joo, O. (2012) Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus*

- verniciflua* stokes against fish pathogenic viruses *in vitro*. *The Journal of Microbiology*, 502.
- [5] Emma, R., Angels, F., Cristina, C., Cristina, A.-L., Maria, I.-P. and Margarida, C. (2005) Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *The British Journal of Nutrition*, 936.
- [6] 周新, 李宏杰 (2007) 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展. *中国新药杂志*, **16**, 350.
- [7] 延玺, 刘会青, 邹永青, 任占华 (2012) 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展. *有机化学*, **9**, 1534-1544.
- [8] Gooch, G.T., Schwarz, S.I., Kiel, J.L. and Everse, J. (1982) Polyamide resin: A novel immunoadsorbent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 82.
- [9] 应雪, 陈文, 江发寿等 (2006) 大孔吸附树脂分离纯化蜂粮总黄酮工艺研究. *中国药房*, **17**, 1355-1356.
- [10] 王成章, 郁青, 陈祥 (1996) 超滤在纯化银杏叶黄酮甙中的应用. *科技简报*, **10**, 21-22.
- [11] 张伟 (2009) 聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物中总黄酮的研究. *中草药*, **40**, 63-66.
- [12] 张睿, 林强 (2006) 利用 HP-20 大孔树脂提取分离蜂粮黄酮的研究. *北京联合大学学报(自然科学版)*, **2**, 20-22.
- [13] Ruan, X., Zhan, L.-M., Gao, X.-X., Yan, L.-Y., Zhang, H., Zhu, Z.-Y., Wang, Q. and Jiang, D.A. (2013) Separation and purification of flavonoid from *Taxus* remainder extracts free of taxoids using polystyrene and polyamide resin. *Journal of Separation Science*, 3612.
- [14] 杨少娟, 赵海燕, 马永平, 陈娜 (2011) 聚酰胺树脂层析纯化甘草黄酮的研究. *广东农业科学*, **16**, 85-87.
- [15] 卫强, 戴一, 吴燕, 张文静 (2011) 聚酰胺-大孔树脂联用纯化菊叶总黄酮初步研究. *中药材*, **8**, 1285-1288.