

# HPLC 测定棉油皂脚中棉酚含量

张欢, 唐辉\*, 贾蔓菁, 杨四涛, 吴旭东(石河子大学药学院, 省部共建新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

**摘要:** 目的 建立高效液相色谱法测定棉油皂脚中总棉酚(TGP)与游离棉酚(FGP)含量的方法。方法 采用 Waters Bondapak C<sub>18</sub> Column(3.9 mm×150 mm, 4 μm); 流动相为乙腈-0.7%磷酸水溶液(80:20); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 238 nm; 柱温为 25 °C。结果 棉酚在 10~60 μg·mL<sup>-1</sup>(*r*=0.999 4)内线性关系良好, 平均加样回收率为 99.03%, RSD=1.72%(*n*=3)。结论 本法简便、快速、准确、重复性高, 可用于对棉油皂脚中棉酚的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 棉油皂脚; 棉酚

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)02-0162-03

## Determine of Gossypol in Cottonseed Soapstock by HPLC

ZHANG Huan, TANG Hui\*, JIA Manqing, YANG Sitao, WU Xudong(Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources, Pharmacy College of Shihezi University, Shihezi 832002, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the content of total gossypol and liberation gossypol by HPLC. **METHODS** The analysis was performed on a Waters Bondapak C<sub>18</sub> Column(3.9 mm×150 mm, 4 μm) at 25 °C with acetonitrile-0.7% phosphoric acid water solution(80:20) as the mobile phase and the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 238 nm. **RESULTS** Gossypol have good linearity in the range of 10~60 μg·mL<sup>-1</sup>(*r*=0.999 4). The average recovery was 99.03%, RSD=1.72%(*n*=3). **CONCLUSION** The developed method is convenient, rapid and accurate with high repeatability, which is suitable to assay the quality of gossypol.

**KEY WORDS:** HPLC; cottonseed soapstock; gossypol

棉油皂脚是棉籽油碱炼过程中去除黏液质、色素、金属离子以及棉酚生成的产物。棉油皂脚中较高含量的棉酚是近年来发现的具有抗肿瘤、抗病毒及抗菌作用的一种颇有前途的抗癌药物<sup>[1-2]</sup>。目前国内已有国药准字醋酸棉酚制剂上市, 美国FDA也批准醋酸棉酚进入临床 I、II 期试验<sup>[3]</sup>, 俄罗斯、乌兹别克斯坦等地也将棉酚作为抗病毒药物用于临床治疗<sup>[4]</sup>。

棉油皂脚中棉酚以游离态和结合态2种形式存在<sup>[5]</sup>, 结合棉酚是游离棉酚与棉仁中的蛋白、糖类化合而成的。按棉酚的存在形式可分为游离棉酚(free gossypol, FGP)和结合棉酚(united gossypol, UGP), 两者之和称之为总棉酚(total gossypol,

TGP)。若能从棉油皂脚中提取棉酚将大大提高其经济价值, 因此, 需要更为准确便捷的方法确定棉油皂脚中棉酚的含量。检测棉酚的方法很多, 有紫外分光光度法、高效液相色谱法、原子吸收分光光谱法、比色法等。目前, 国内外文献多对存在于棉仁、棉籽粕、棉籽油等中的棉酚测定进行研究, 但对于棉油皂脚中棉酚含量测定未见报道。本试验综合多种文献方法<sup>[6-7]</sup>, 用HPLC测定棉油皂脚中FGP及TGP的含量, 该方法简便、快速、准确易行。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

美国惠普 Agilent 1100 高效液相色谱仪; 德国

基金项目: 新疆建设兵团博士基金项目(2009JC14); 国家教育部科学技术研究重点项目(205185)

作者简介: 张欢, 女, 硕士生 Tel: 15981701439 E-mail: zhanghuan0923@chinaren.com \*通信作者: 唐辉, 女, 博士, 教授 Tel: (0993)2057162 E-mail: Th\_pha@shzu.edu.cn

Sartorius BP211D 电子天平; 上海安亭 Anke TDL-408 低速大容量离心机; 北京光明 DKZW 型电子恒温水浴锅; 山东菏泽 HJ-6A 多头磁力搅拌器。

## 1.2 试剂

棉酚对照品(美国 Sigma 公司, 含量 95%, 批号: 20k4057); 棉油皂脚样品(新疆天鹰生物科技有限公司, 批号: 090615, 091204); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Bondapak C<sub>18</sub> Column(3.9 mm×150 mm, 4 μm); 流动相为乙腈-0.7%磷酸水(80:20), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 238 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取棉酚对照品 12.50 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 再精密吸取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 供试品 TGP 溶液的制备** 精密称取棉油皂脚 10 g 置圆底烧瓶中, 以 50 mL 的 1.4 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸及 84% 的丁酮水溶液溶解, 80 °C 水浴回流 2 h 后移至分液漏斗中静置分层, 萃取丁酮层, 水层分 2 次以少许丁酮萃取, 合并丁酮液于 50 mL 量瓶, 丁酮稀释至刻度, 移取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶, 乙腈稀释至刻度, 再移取 1 mL 置 10 mL 量瓶, 乙腈稀释至刻度, 即得。

**2.3.2 供试品 FGP 溶液的制备** 精密称取棉油皂脚 10 g 置锥形瓶中, 以 50 mL 丙酮(用盐酸调节 pH 至 2.0)溶解, 45 °C 搅拌 1 h 后移至离心管中(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min)离心, 将上清液转移至 50 mL 量瓶, 丙酮稀释至刻度, 移取 2 mL 置 10 mL 量瓶, 乙腈稀释至刻度, 再移取 1 mL 置 10 mL 量瓶, 乙腈稀释至刻度, 即得。

### 2.4 线性关系考察

精密量取棉酚对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得含棉酚 10, 20, 30, 40, 50, 60 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以对照品浓度作为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $Y=140.51X+35.033(r=0.9994)$ , 线性范围为 10~60 μg·mL<sup>-1</sup>。对照品及样品的色谱图见图 1。

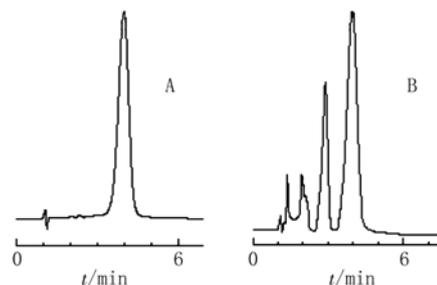


图 1 棉酚 HPLC 色谱图

A-对照品; B-样品

Fig 1 HPLC chromatograms of gossypol

A-reference; B-sample

### 2.5 耐用性试验

选用了 3 种流动相组成和 pH 值进行试验, 分别为乙腈-0.7%磷酸水(85:15), 乙腈-0.7%磷酸水(75:25), 乙腈-0.7%磷酸水(70:30)。结果表明流动相比比例在 85:15~75:25 之间时色谱峰的分度在 0.95~1.04 之间, 且理论板数>2 000。

### 2.6 专属性试验

取对照品溶液及供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定。结果棉酚的保留时间约为 4 min, 对称因子为 1.05, 与其他有关物质色谱峰的分度>1.7, 说明该方法的专属性较好。

### 2.7 仪器精密度试验

取浓度为 30 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.5%, 表明仪器精密度良好。

### 2.8 重复性试验

精密称取同批样品 6 份, 按“2.3.1”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件, 分别测定各份样品中总棉酚的含量, 结果平均含量为 2.83%, RSD 为 1.3%, 表明重复性良好。

### 2.9 稳定性试验

取供试品溶液 1 份, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 进样测定, 结果 RSD 为 1.2%, 表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

### 2.10 加样回收率试验

精密称取 9 份已知含量的棉油皂脚样品(批号: 090615, FGP 含量: 0.83%)55.3 g, 分别加入浓度为 40 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液 4, 5, 6 mL, 按“2.3.2”项下的溶液配制方法制备, 进样测定, 计算回收率。结果见表 1。

### 2.11 样品含量测定

取 2 个批次的棉油皂脚样品, 按“2.3.1”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项

下色谱条件测定, 计算含量。并考察了存放时间对棉酚含量的影响, 结果见表 2。

表 1 加样回收率测定结果( $n=3$ )

Tab 1 Results of recovery rate experiment( $n=3$ )

样品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
183.61	160	345.91	101.3		
183.55	160	343.32	99.87		
183.56	160	341.21	98.72		
183.60	200	381.64	98.93		
183.59	200	387.15	101.90	99.03	1.72
183.62	200	379.88	97.96		
183.55	240	418.01	96.98		
183.58	240	420.54	98.34		
183.61	240	418.61	97.28		

表 2 棉油皂脚不同存放期棉酚含量测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Content of gossypol in cottonseed soapstock in different storing period( $n=3$ )

样品 批号	存放 时间/月	TGP 含量/%	RSD/%	FGP 含量/%	RSD/%
090615	0	2.83±0.04	1.4	0.83±0.02	1.8
	6	2.21±0.03	1.1	0.48±0.01	1.2
091204	0	6.57±0.08	1.2	0.98±0.02	1.6
	6	4.01±0.06	1.4	0.36±0.01	1.6

### 3 讨论

棉油皂脚常被当做废弃物被抛弃, 没有得到很好的利用, 若准确检测出其中的棉酚含量, 并以合适的方法提取棉酚, 一方面可以解决环境污染问题, 另一方面也可以创造高的经济效益。本试验选用 HPLC 检测棉油皂脚中棉酚的含量, 试验证明该方法简便、快速、准确易行。

经比较, 以 84%的丁酮提取比丁酮提取测定结果高, 且证明 UGP 在丁酮溶液中水解不完全, 故选用 84%的丁酮。

棉籽中棉酚含量与棉花品种、栽培条件等密切相关, 因此, 两批棉油皂脚棉酚含量差异较大。另外, 091204 批号的棉油皂脚在生产中经水稀释, 而 090615 批号棉油皂脚未经稀释, 二者冷冻 6 个月, 总棉酚含量分别下降了 39%和 22%, 可见经水稀释的棉油皂脚棉酚氧化速度快, 更不易存放, 建议生产过程中对棉油皂脚不进行稀释, 并尽快提取。

### REFERENCES

- [1] WANG X, WANG J, WONG S C, et al. Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells [J]. *Life Sci(生命科学)*, 2000, 67(22): 2663-2671.
- [2] TURCO E, VIZZUSO C, FRANCESCHINI A, et al. The *in vitro* effect of gossypol and its interaction with salts on conidial germination and viability of *Fusarium oxysporum* sp.vasinfected isolates [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(6): 2370-2381.
- [3] CATHERINE V P, ANDREW D S, MARCUS M R, et al. Oral gossypol in the treatment of patient with refractory metastatic breast cancer: A phase I/II clinical trial [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66(3): 239-248.
- [4] BARAM N I, ISMAILOV A I, ZIYAEV K L, et al. Biological activity of gossypol and its derivatives [J]. *Chem Nat Compd*, 2004, 40(3): 199-205.
- [5] QIAO G P, WANG X G, WANG Y. Preparation of gossypol and its use [J]. *China Oil(中国油脂)*, 2002, 27(3): 58-59.
- [6] MEYER R, VORSTER S, DUBERY I A. Identification and quantification of gossypol in cotton by using packed micro-tips columns in combination with HPLC [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 380(4): 719-724.
- [7] TANG H, TIAN C X, YAO X C. Determination of total gossypol and free gossypol in edible cottonseed protein by phloroglucinol colorimetry [J]. *J Shihezi Univ(石河子大学学报)*, 2004, 22(1): 53-55.

收稿日期: 2010-07-22