

李文孝,贾光锋,徐升运,等.棉油皂脚中棉酚的提取分析及鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(24):186-188.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.050

棉油皂脚中棉酚的提取分析及鉴定

李文孝^{1,3}, 贾光锋², 徐升运^{1,3}, 陈卫锋³, 张红艳³, 李忠玲³

(1. 陕西省科学院酶工程研究所,陕西西安 710600; 2. 西安工业大学生物医学工程系,陕西西安 710032;
3. 中科院西北生物农业中心,陕西西安 710600)

摘要:采用有机溶剂法研究超声波辅助下,从棉油皂脚中提取、重结晶制备药用醋酸棉酚过程。结果显示,当超声萃取时间为 40 min、酸浓度为 1.4 mol/L、超声结晶时间为 20~30 min 时,可以得到含量为 89.6% 的 0.63 g 醋酸棉酚粗品,重结晶纯化后,经熔点、元素分析、紫外光谱、红外光谱、氢核磁共振光谱验证结果与标准品相同,其重结晶品纯度可达 99.5%,具有药用功能。说明这种超声波辅助溶剂法提取、制备醋酸棉酚的工艺可行。

关键词:醋酸棉酚;棉油皂脚;提取;分析鉴定;有机溶剂法;超声波辅助;重结晶;纯化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0186-03

棉酚(gossypol)别称棉籽醇或棉花毒素,是一种广泛存在于锦葵科棉属植物棉花的种子、叶茎及根部等器官中的多酚类化合物。棉酚按其存在的形式可分为游离棉酚和结合棉酚,两者之和称为总棉酚^[1]。一般认为,结合棉酚不能被消化道吸收,游离棉酚能被消化道吸收,所以通常说的棉酚指的是游离棉酚。20 世纪 60 年代,前苏联科学家发现棉酚具有抑制动物肿瘤细胞的作用^[2]。现代医学研究证明,棉酚除了具有抗肿瘤的生理功能,还具有抗生育^[3]、抗疟疾^[4]、抗病毒^[5]等多种生物学活性。由于棉酚的多个羟基极易被氧化变质,因此研究获得高纯度、性质相对稳定的棉酚已成为医药工业的热点问题。本研究尝试在超声波的辅助下,采用有机溶剂法从棉油加工废弃物—皂脚中提取、制备出纯度较高,性质稳定,具有高附加值医药用的醋酸棉酚。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 材料 棉油泥(陕西大荔伟恒生物科技有限公司)收集后冷冻保藏;醋酸棉酚标准品(纯度≥99.8%,美国 Sigma 公司);人前列腺癌细胞系 PC-3,由美国密西根大学医学院动物实验中心提供。

1.1.2 试验仪器 KQ3200DE 超声波清洗机;DU640 紫外-可见分光光度计;AL104 电子分析天平;RE-5002 旋转蒸发器;PE2400 元素分析仪;X-4 数字显微熔点测试仪;EQUINX55 红外光谱仪;AVANCE 300 超导傅里叶数字核磁共振波谱仪;NUAIRE CO₂ 细胞培养箱;美国 BIO-RAD550 酶标仪。

1.2 试验方法

1.2.1 棉酚的提取与测定

收稿日期:2016-07-19

基金项目:陕西省科学院应用基础研究项目(编号:2012K-05);陕西省自然科学基金(编号:2011JM2015)。

作者简介:李文孝(1977—),男,陕西宝鸡人,硕士,助理研究员,从事生物技术应用研究。E-mail:liwenxiao@ms.xab.ac.cn。

1.2.1.1 标准曲线 用三氯甲烷配制成浓度分别为 5、10、15、20、25 μg/mL 的醋酸棉酚标准品溶液,并以三氯甲烷为空白对照,在 365 nm 的紫外光下分别测定其吸光度。最后,以标准溶液浓度(C)为纵坐标,对应的吸光度(D)为横坐标,绘制出标准曲线,得到的线性回归方程为

$$C = 27.715 OD + 0.6826;$$

式中: $P < 0.0001$, $r^2 = 0.9972$ 。

1.2.1.2 样品中醋酸棉酚含量的测定 用三氯甲烷溶解醋酸棉酚粗品,配制成浓度为 15 μg/mL 的溶液,在 365 nm 处以三氯甲烷为空白测定吸光度,通过标准物质回归方程计算样品中的棉酚质量。以方程测算值与样品质量的比值作为样品中的醋酸棉酚含量。

1.2.1.3 棉油皂脚中棉酚的提取 称量 100 g 棉油皂脚搅拌均匀分散于 100 mL 盐酸酸化的甲醇中,置于超声波清洗机中常温辐射一段时间;再加热、离心分离、减压浓缩,向浓缩液中加入其 1/3 体积的冰醋酸;再在超声波清洗机中处理一段时间;然后,于阴暗处静置 3 h 或更久一些时间,待出现黄绿色沉淀;最后,经减压抽滤、石油醚洗涤、真空干燥得到醋酸棉酚粗品,称其质量即为制备的醋酸棉酚粗品质量。再经过酸化丙酮溶液重结晶可以制备出高纯度醋酸棉酚。

1.2.2 醋酸棉酚的分析鉴定

1.2.2.1 熔点测试^[6] 调整好显微熔点测试仪,用毛细管取微量醋酸棉酚的重结晶品置于载玻片上,用盖玻片压实,于电炉上控温加热,在显微镜下仔细观察晶体变化,并记录晶体开始熔化和完全熔化时的温度。

1.2.2.2 元素分析^[7] 利用 PE2400 元素分析仪测定醋酸棉酚重结晶品的碳(C)、氢(H)、氧(O)3 种元素含量。

1.2.2.3 紫外光谱扫描^[8] 将醋酸棉酚的重结晶品和标准品溶于新蒸馏的三氯甲烷中,配制成浓度为 15 μg/mL 的溶液。以三氯甲烷为空白对照,在 200~500 nm 波长范围内进行扫描。

1.2.2.4 红外光谱分析^[9] 按照常规的溴化钾压片法测定醋酸棉酚重结晶品的红外光谱图。

1.2.2.5 核磁共振光谱分析^[10] 利用超导傅里叶数字核磁

共振波谱仪测定醋酸棉酚重结晶品的核磁共振光谱图。

1.2.4.6 抗肿瘤性能 根据 Xu 等的方法,用醋酸棉酚的重结晶品处理前列腺癌细胞系 PC-3 进行抗肿瘤试验^[11]。最终数据采用 Prims 5.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 超声萃取时间对醋酸棉酚产量和含量的影响

超声波辅助萃取对提取物中醋酸棉酚的含量和产量随着时间延长影响明显。从图 1 可见,从 10~40 min 棉酚的产量迅速增加达到最大值 0.52 g,且提取物中醋酸棉酚含量逐渐提高至 83.3%。可见,超声波辅助下的最佳萃取时间为 40 min。

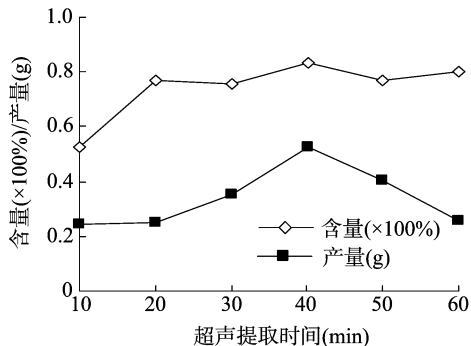


图1 超声萃取时间对产量和含量的影响

2.2 酸浓度对醋酸棉酚产量和含量的影响

棉油碱炼时,棉酚和磷脂、多肽以及氨基酸等会发生化学反应形成性质相对稳定的 Schiff's 化合物并随皂脚一起沉降下来而被脱除。在酸性条件下,棉酚可以被重新释放出来。由图 2 可知,随着酸浓度的提高,直到酸度达到 1.4 mol/L 时醋酸棉酚的产量和含量均迅速增加达到最大值 0.54 g 和 87.8%,继续增加酸度棉酚产量和含量又出现缓慢下降。因此,1.4 mol/L 是最佳的酸度控制点。

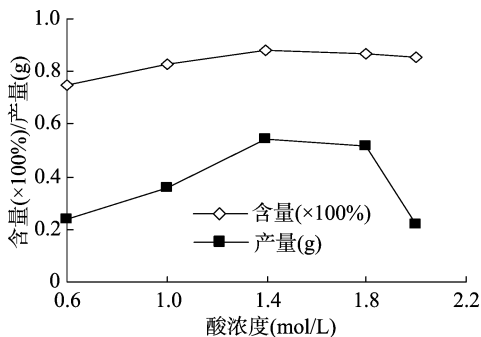


图2 酸浓度对产量和含量的影响

2.3 超声结晶时间对棉酚产量和含量的影响

超声结晶技术主要通过超声波的空化效应,使已形成的晶体、固体颗粒及时分散,获得较小的晶体颗粒,推动晶体生长,缩短结晶时间,控制晶体粒径的分布,提高设备的生产能力和产品质量^[12]。

由图 3 可知,随着超声结晶时间延长,制备的醋酸棉酚产品质量、含量不断增加。30 min 时产品含量达最高值 89.6% 时,获得 0.63 g 醋酸棉酚粗品,随后随时间延长,产品质量虽有小幅增加但含量却下降明显。通过试验发现,超过 30 min

后产品中杂质含量增大对重结晶制备高纯度产品会形成较大影响,所以选择合适的超声诱导结晶时间为 20~30 min。

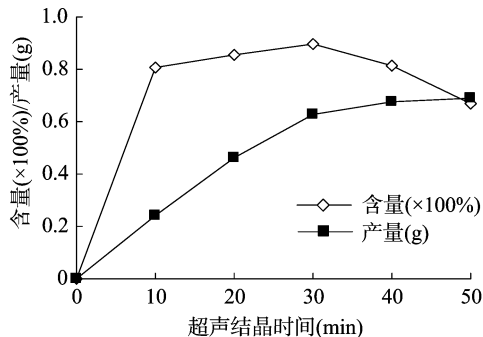


图3 超声结晶时间对产量和含量的影响

2.4 醋酸棉酚的结构与性能

2.4.1 熔点测试 通过本工艺生产的醋酸棉酚重结晶品经显微熔点测定仪测定,其熔点为 178~180℃,熔程窄、纯度高,符合 2015 版《中国药典》规定的药用醋酸棉酚熔点为 175~180℃ 的要求,可以满足药物原料技术要求。

2.4.2 化学元素分析 将制取的重结晶醋酸棉酚样品置于 PE2400 元素分析仪中进行测定,得到样品中 C、H、O 等 3 种元素的含量(表 1)。醋酸棉酚样品中 3 种元素的测量值几乎均与理论值一致,因此可以判断提取的醋酸棉酚符合醋酸棉酚的分子式。

表 1 醋酸棉酚 C₃₂H₃₄O₁₀ 元素分析结果

元素	C 含量 (%)	H 含量 (%)	O 含量 (%)
理论值	66.43	5.92	27.65
实测值	66.40	5.91	27.69

2.4.3 紫外光谱鉴定 使用紫外-可见吸收光谱法对有机化合物进行鉴别,主要依据有机化合物吸收光谱的形状,吸收峰的数目,各吸收峰的波长位置、强度及相应的吸光度等。从图 4 可知,醋酸棉酚样品与标准品均在 243、278、289、365 nm 波长处有最大吸收度。另外,从紫外扫描图谱中可以发现,365 nm 处波形呈正态分布,与醋酸棉酚定量测定试验中选择 365 nm 作为最大吸收波一致,说明样品与醋酸棉酚标准品可能为同一物质。

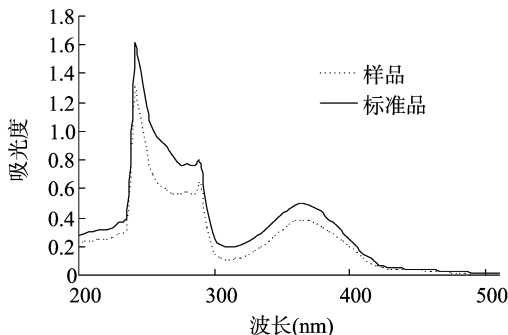


图4 醋酸棉酚紫外扫描图谱

2.4.4 红外光谱分析 从红外光谱扫描图(图 5)可知,醋酸棉酚标准品和醋酸棉酚重结晶品的红外光谱非常相似,重要的功能团特征吸收峰明显。FT-IR (cm⁻¹): 样品, 3 428ν_{O-H} (羟基 O-H 键的伸缩振动), 2 610ν_{C-H} (醛基 C-H 键的伸

缩振动), $1\ 711\nu_{\text{O}=\text{C}}$ (醋酸中的 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩), $1\ 611$, $1\ 508\nu_{\text{C}=\text{C}}$ (芳核的骨架 $\text{C}=\text{C}$ 键振动), $1\ 616\nu_{\text{C}=\text{O}}$ (醛基中的 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩振动), $1\ 576\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ($\text{C}=\text{C}$ 键伸缩振动), $1\ 284\nu_{\text{O}-\text{H}}$ (酚羟基 $\text{O}-\text{H}$ 键的伸缩振动), $1\ 176\nu_{\text{C}-\text{C}}$ (异丙基 $\text{C}-\text{C}$ 键的骨架振动); 标准品, $3\ 426\nu_{\text{O}-\text{H}}$ (羟基 $\text{O}-\text{H}$ 键的伸缩振动), $2\ 607\nu_{\text{O}=\text{C}-\text{H}}$ (醛基 $\text{C}-\text{H}$ 键的伸缩振动), $1\ 709\nu_{\text{O}=\text{C}}$ (醋酸中的 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩), $1\ 611$, $1\ 506\nu_{\text{C}=\text{C}}$ (芳核的骨架 $\text{C}=\text{C}$ 键振动), $1\ 616\nu_{\text{C}=\text{O}}$ (醛基中的 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩振动), $1\ 577\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ($\text{C}=\text{C}$ 键伸缩振动), $1\ 286\nu_{\text{O}-\text{H}}$ (酚羟基 $\text{O}-\text{H}$ 键的伸缩振动), $1\ 177\nu_{\text{C}-\text{C}}$ (异丙基 $\text{C}-\text{C}$ 键的骨架振动)。可见, 醋酸棉酚重结晶品与标准品基本相同。

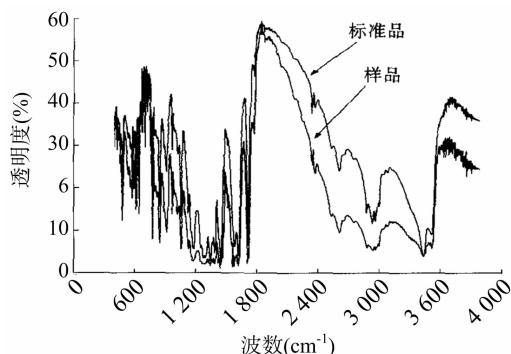


图5 醋酸棉酚红外光谱图

2.4.5 ^1H NMR 结构分析 用三氯甲烷作溶剂, 以四甲基硅烷为内标, 获得醋酸棉酚的核磁共振氢谱 (图 6)。化学位移依次为标准品, $1.56(\text{d}, 12, J = 6.56\text{ Hz}, 12-\text{CH}_3, 12'-\text{CH}_3, 13-\text{CH}_3, 13'-\text{CH}_3)$, $2.13(\text{s}, 6, 14-\text{CH}_3, 14'-\text{CH}_3)$, $2.34(\text{s}, 3, 13-\text{CH}_3)$, $3.58(\text{m}, 2, 11-\text{CH})$, $5.79(\text{s}, 2, 1-\text{C}-\text{OH}, 1'-\text{C}-\text{OH})$, $6.44(\text{s}, 2, 6-\text{C}-\text{OH}, 6'-\text{C}-\text{OH})$, $7.73(\text{s}, 2, 4-\text{C}-\text{H}, 4'-\text{C}-\text{H})$, $8.45(\text{s}, 1, 17-\text{COOH})$, $11.15(\text{s}, 2, 15-\text{CHO}, 15'-\text{CHO})$, $15.21(\text{s}, 2, 7-\text{C}-\text{OH}, 7'-\text{C}-\text{OH})$; 样品, $1.56(\text{d}, 12, J = 6.56\text{ Hz}, 12-\text{CH}_3, 12'-\text{CH}_3, 13-\text{CH}_3, 13'-\text{CH}_3)$, $2.13(\text{s}, 6, 14-\text{CH}_3, 14'-\text{CH}_3)$, $2.34(\text{s}, 3, 13-\text{CH}_3)$, $3.57(\text{m}, 2, 11-\text{CH})$, $5.73(\text{s}, 2, 1-\text{C}-\text{OH}, 1'-\text{C}-\text{OH})$, $6.44(\text{s}, 2, 6-\text{C}-\text{OH}, 6'-\text{C}-\text{OH})$, $7.76(\text{s}, 2, 4-\text{C}-\text{H}, 4'-\text{C}-\text{H})$, $8.46(\text{s}, 1, 17-\text{COOH})$, $11.15(\text{s}, 2, 15-\text{CHO}, 15'-\text{CHO})$, $15.22(\text{s}, 2, 7-\text{C}-\text{OH}, 7'-\text{C}-\text{OH})$ 。醋酸棉酚标准品和醋酸棉酚重结晶品产生相同的磁响应信号, 可以证明重结晶品具有标准品相近的纯度, 同时也证明了两者为同一种物质。

2.4.6 抗肿瘤性能 为检验超声波辅助溶剂法提取醋酸棉酚的生物活性, 用重结晶醋酸棉酚品和标准品进行体外前列腺癌细胞 PC-3 培养试验。在抑制肿瘤细胞时, 醋酸棉酚重结晶品的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值略小于标准品, 可以达到 $8.01\ \mu\text{mol/L}$, 说明该工艺提取的醋酸棉酚具有抗肿瘤生物活性。

3 结论与讨论

利用超声波辅助有机溶剂提取法从棉油加工废弃物——

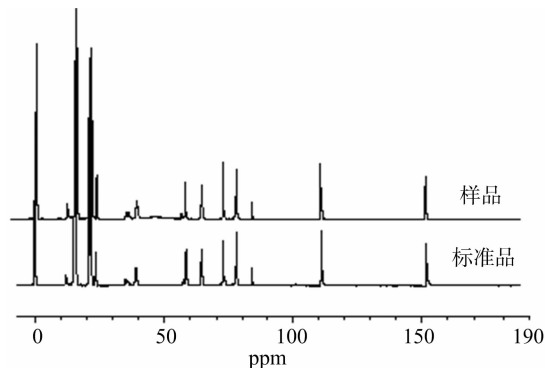


图6 醋酸棉酚核磁共振氢谱

皂脚中提取、制备出纯度较高、性质稳定, 具有药用价值的醋酸棉酚, 一方面可以实现变废为宝, 另一方面可有效提高棉籽加工业的附加值。利用熔点测定、元素分析、紫外扫描、红外光谱分析、核磁共振光谱分析及抗肿瘤试验, 证明本工艺制备的醋酸棉酚重结晶品与标准品是同一物质, 说明超声波辅助下的有机溶剂提取醋酸棉酚工艺是可行的。

参考文献:

- [1] 王继明. 棉酚及分析方法综述[J]. 中国卫生检验杂志, 1999, 9(4): 319-321.
- [2] 唐文皓. 棉酚的抗肿瘤研究进展[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 2000, 27(3): 154-156.
- [3] Gu Z P, Mao B Y, Wang Y X, et al. Low dose gossypol for male contraception[J]. Asian Journal of Andrology, 2000, 2(4): 283-287.
- [4] Razakantoanina V, Phung N K P, Jaureguiberry G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives[J]. Parasitol Res, 2000, 86(8): 665-668.
- [5] Keller P A, Birch C, Leach S P, et al. Novel pharmacophore-based methods reveal gossypol as a reverse transcriptase inhibitor[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2003, 21(5): 365-373.
- [6] 宋乐平. 化学品熔点的测定[J]. 中国化工贸易, 2013, 5(12): 288-289.
- [7] 龚迎莉, 杨锐明, 糕玉群. CE-440 型元素分析仪测定有机样品中的碳氢氮[J]. 分析仪器, 2012(1): 31-34.
- [8] 堵年生, 王晓梅, 王新玲. 天然药物化学实验及学习指导[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [9] 杨南林, 程翼宇, 瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报, 2003, 61(5): 742-747.
- [10] 于德泉, 杨俊山. 化学分析手册——核磁共振波谱分析[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [11] Xu L, Yang D J, Wang S M, et al. (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(2): 197-206.
- [12] 宋国胜, 胡松青, 李琳. 功率超声在结晶过程中应用的进展[J]. 应用声学, 2008, 27(1): 74-79.