

文章编号: 1000-1573(2009)05-0106-03

## HPLC 法测定棉籽饼粕饲料中的游离棉酚

吴伟伟, 许赣荣

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 研究了高效液相色谱法(HPLC)测定棉籽饼粕中游离棉酚的方法。丙酮浸提提取游离棉酚,经微孔滤膜过滤,HPLC 检测含量。最佳色谱条件:色谱柱 Sepax sapphire C<sub>18</sub> 5 μm 120Å(250 mm×4.6 mm);检测器为紫外检测器;检测波长,238 nm;柱温 25 ℃;流动相为乙腈/水(含 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=80/20(V/V);流速 1 mL/min。棉酚的最低检出浓度为 0.94 mg/kg,平均回收率在 96.23%~99.36%之间,相对标准偏差在 3.24%~4.02%之间。与传统化学方法相比,高效液相色谱法,快速简便,结果准确,重现性好。

**关键词:** 高效液相色谱; 棉籽饼粕; 游离棉酚

**中图分类号:** S 519

**文献标识码:** A

## Determination of free gossypol in cottonseed cake feed by HPLC

WU Wei-wei, XU Gan-rong

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The free gossypol in cottonseed cake feed by HPLC Free gossypol was immersed and extracted through micropore filter, and then analyzed by HPLC. The optimal conditions of HPLC were as follows: the column of chromatogram Sepax sapphire C<sub>18</sub> 5 μm 120A(250 mm×4.6 mm), mobile phase acetonitrile/water(10mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=80/20, UV-238nm detector, column temperature 25 ℃, flow rate 1mL/min. The minimum detection limit of gossypol was determined to be 0.94 mg/kg, the average recoveries of the method were 96.23%~99.36%, and the RSD were 3.24%~4.02%. Compared with traditional chemical method, this method is reliable, simple, quick and accurate, an ideal method for determining the free gossypol in the cottonseed protein.

**Key words:** HPLC; cottonseed cake; free gossypol

我国是产棉大国,据国家统计局统计,2007 年全国棉花总产量达 710 万吨,棉籽产量达到 1 300 万吨<sup>[1]</sup>。棉籽提油后的棉籽饼粕中含有 33%~42%的粗蛋白质,是重要的优质蛋白饲料。但是,由于其中含有对畜禽有毒害作用的游离棉酚(free gossypol, FG)<sup>[2]</sup>,使得丰富的蛋白质资源未能得到充分利用。因此,准确测定棉籽饼粕中游离棉酚含

量对于开发利用棉籽饼具有重要的意义。

目前,饲料中棉酚的检测方法中应用较为普遍主要有:分光光度法,包括苯胺法<sup>[3]</sup>、间苯三酚法<sup>[4]</sup>;高效液相色谱法等<sup>[5-8]</sup>。其中分光光度法测定时毒性大、选择性不强,与棉酚有相似化学结构的物质均能被同时测定,使检测结果偏高;高效液相色谱法因有分离效率高、灵敏度高、简便快捷、准确等优点,更

收稿日期: 2009-03-06

作者简介: 吴伟伟(1984-),男,河北省石家庄人,在读硕士生,主要从事复合微生物固态发酵天然副产物生产菌体蛋白的研究。

通讯作者: 许赣荣(1957-),男,江西省赣州人,教授,主要从事固态发酵技术以及微生物发酵饲料添加剂的研究,  
E-mail: grxu123@126.com.

利于广泛的应用。目前, HPLC 法中由于提取溶剂的不同使得操作方法以及测定结果的稳定性大多数不太满意。本文主要研究了 HPLC 法中提取剂和流动相等因素, 从而优化了 HPLC 法测定棉籽饼粕饲料中游离棉酚的含量, 提高了测定的稳定性与准确性, 利于作为质量控制的手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 全波长扫描仪。

### 1.2 试剂及样品

棉酚对照品(购买于中国药品生物制品检定所), 棉籽粕及其发酵后样品粉碎并过 40 目筛, 试剂: 95% 乙醇、无水乙醚、冰乙酸、丙酮、磷酸均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯; 水经重蒸。

### 1.3 实验方法

1.3.1 棉酚标准溶液 准确称取 0.002 5 g 棉酚对照品, 用丙酮溶解, 并定容至 25 mL, 为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的棉酚标准溶液, 低温且避光存放。

1.3.2 游离棉酚的提取 准确称取 5 g 样品于 100 mL 具塞瓶中, 加丙酮 70 mL, 置于 20  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 的摇床中 1 h 后, 加入 5 mL 0.5 mol/L 的醋酸钡溶液, 静置, 抽滤至 100 mL 容量瓶中, 反复用丙酮洗涤数次, 并稀释至刻度, 临用前用微孔滤膜过滤。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取溶剂的选择

2.1.1 棉酚标准品溶剂的选择 比较了 Smith<sup>[9]</sup> 采用的混合溶剂(715 mL 95% 乙醇加 285 mL 水, 再加 200 mL 乙醚, 0.2 mL 冰乙酸)与唐辉<sup>[10]</sup> 等人采用的丙酮这两种溶剂对溶解棉酚标准品的影响, 经比较得采用丙酮作为溶剂时分离效果较好, 杂质峰影响小。如图 1 所示(图中 G 表示棉酚的峰)。

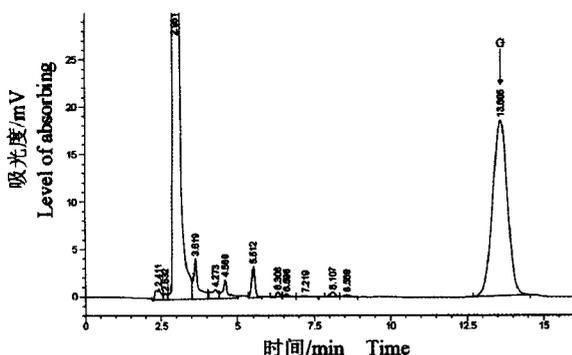


图 1 丙酮溶解棉酚标准品

Fig. 1 Acetone dissolution standard of gossypol

2.1.2 提取溶剂的选择 棉酚是一种不稳定的多酚羟基联萘醛类化合物, 能溶于大多数有机溶剂如丙酮、乙醚、氯仿、甲醇等, 较难溶于甘油、环己烷和苯, 不溶于低沸点石油醚和水。实验比较了国标法<sup>[11]</sup> 中采用的乙醚提取溶剂, 以及甲醇、乙醇、乙腈、丙酮不同溶剂对棉籽饼粕中棉酚的提取效果, 经比较采用丙酮提取时测得的峰面积最大, 即棉酚含量最高, 且简化了国标法中需将提取溶剂去除后再用流动相溶解的操作步骤, 减少了多次操作产生的误差, 故选择丙酮作为提取溶剂。

### 2.2 棉酚最大吸收波长的选择

由于溶剂丙酮在 279 nm 处具有最大吸收峰, 为了降低溶剂的影响, 故将丙酮溶解的标准棉酚溶液浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 经旋转蒸发仪除去丙酮溶剂后, 用流动相溶解棉酚, 得到流动相为溶剂的棉酚标准溶液。考察从 200~300 nm 的不同波长对棉酚标样的影响, 结果如图 2 所示。从图 2 可看出, 波长为 238 nm 时, 棉酚具有最大吸收峰, 由于波长越小干扰相对会越小, 故选择测定波长为 238 nm。

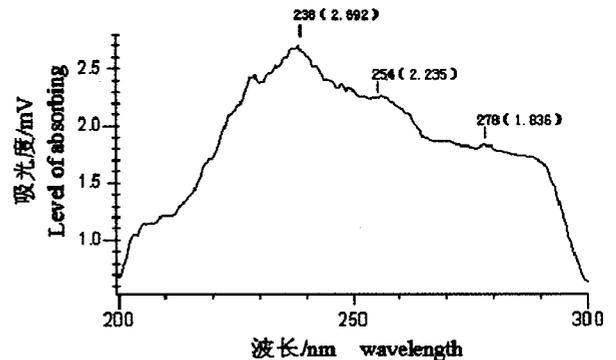


图 2 棉酚紫外光谱图

Fig. 2 Ultraviolet spectrogram of gossypol

### 2.3 流动相的选择

分别采用体积比为①甲醇/水/乙腈=80/15/5 (V/V)和②乙腈/水(含 10mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )=80/20(V/V)两种体系, 对棉籽粕经发酵后样品中棉酚含量进行测定。结果表明采用流动相①时样品中的目的峰与杂峰未达到分离, 而采用流动相②时可得到单峰。由此可知, 流动相②更利于分离棉酚, 可能由于乙腈更利于分离棉酚, 且乙腈的洗脱能力要高于甲醇, 故选择乙腈/水=80/20(V/V)作为测定棉酚的流动相。

### 2.4 棉酚目的峰的确定

将已知棉酚含量的溶液中添加一定量的棉酚标准溶液, 从而确定目的峰的位置, 结果如图 3 所示。图 3 表明, 采用 2.1~2.3 中的优化条件时, 棉酚目

的峰的出峰时间为 13.7~13.9 min。

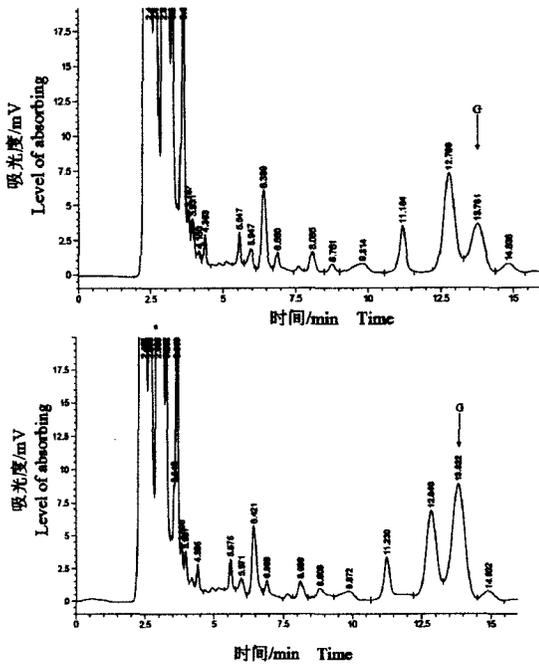


图 3 棉酚目的峰的确定

Fig. 3 Determination of the objective peak of gossypol

2.5 棉酚标准曲线的绘制

配制浓度分别为 0.8、2.0、4.0、6.0、10.0、16.0、54.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的棉酚标准系列溶液,在最佳色谱条件下进行 HPLC 分析,将峰面积 A 与浓度 C 进行线性回归(见图 4),得到回归方程为:  $A = 34.103C - 6.2337$ ,相关系数为 0.9996;线性范围:0.8~54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

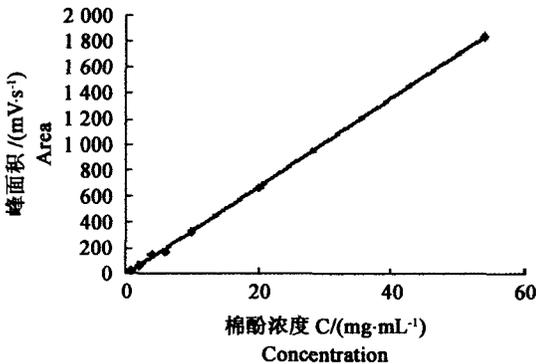


图 4 棉酚标准曲线

Fig. 4 The standard curve of gossypol

在优化的高效液相色谱条件下,即色谱柱为 Sepax sapphire C185  $\mu\text{m}$  120(250 mm  $\times$  4.6 mm),流动相为乙腈/水 = 80/20 (V/V),紫外检测器,检测波长为 238 nm,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,洗脱时间 16 min,流速 1.0 mL/min,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。在上述样品处理方法及色谱操作条件下,棉酚最低检出量按 3 倍噪声

计算为  $4.7 \times 10^{-10}$  g,最低检出浓度为 0.94 mg/kg。

2.6 回收率实验

准确移取 9 mL 棉籽饼粕饲料中提取的游离棉酚提取液于 10 mL 容量瓶中(其中棉酚含量为 9.84  $\mu\text{g}$ ),分别加入 1 mL 不同浓度棉酚标准溶液,混合均匀后,测定游离棉酚含量,结果见表 1 所示。由表 1 可见,此方法测定的平均回收率在 96.23%~99.36%之间,相对标准偏差在 3.24%~4.02%之间,准确性较好。

表 1 回收率及精密度结果  
Table 1 The result of recoveries and precision

添加棉酚量/ $\mu\text{g}$ Added content of gossypol	回收率/% Recoveries			平均回收率/% Average recoveries	相对标准 偏差/% RSD( $n=3$ )
	I	II	III		
10	103.07	97.28	97.73	99.36	3.24
16	94.38	95.66	101.71	97.25	4.02
30	94.05	94.30	100.33	96.23	3.69

3 结论

棉酚为多羟基酚化合物,其化学性质很活泼,遇光、热易被氧化,故采用丙酮低温浸提效果较好,与国标法<sup>[1]</sup>相比操作方法简便,稳定性好,利于广泛应用。本文优化了高效液相色谱法测定游离棉酚的条件,得出最佳色谱条件为:色谱柱 Sepax sapphire C185  $\mu\text{m}$  120(250 mm  $\times$  4.6 mm);检测器,紫外检测器检测波长,238 nm;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;流动相,乙腈/水(10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) = 80/20 (V/V);流速 1 mL/min。棉酚的最低检出浓度为 0.94 mg/kg,平均回收率在 96.23%~99.36%之间,相对标准偏差在 3.24%~4.02%之间。与传统化学方法相比,高效液相色谱法,快速简便,结果准确,重现性好。

参考文献:

[1] 顾金,薛永峰,章世元,等. 棉籽饼粕脱毒工艺的研究进展[J]. 饲料博览,2008,7:21-23.  
 [2] 倪鸣,袁慧. 棉酚对动物生殖毒性的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(4):144-145.  
 [3] 贺秀媛,李玉峰,张君涛,等. 棉籽饼粕饲料中游离棉酚测定方法的研究[J]. 中国畜牧杂志,2008,44(12):60-62.  
 [4] 敖维平,曲明悦. 饲料中游离棉酚快速测定适宜条件的筛选[J]. 中国饲料,2007,20:39-42.  
 [5] 蔡应繁,张宏,莫剑川,等. 棉花不同腺体类型的棉酚高效液相色谱测定及其生物特性表征[J]. 四川大学学报:自然科学版,2003,40(3):582-585.

$d^{-1}$ )时, COD去除率可达到93.2%, 反应器出水COD平均为375 mg/L。进一步的效能考察运行结果表明: 污泥颗粒化的厌氧反应器容积负荷可达到 $6 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1})$ , COD去除率为90%。

A/O池作为UASB反应器的后续处理设施, 使厌氧出水得到了进一步的净化, 整体处理系统出水COD浓度降至100 mg/L, COD去除率为98.2%, 且具有很好的除氮效果, 出水 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度最低达10 mg/L,  $\text{NH}_3 - \text{N}$ 去除率为92%。系统总体出水达到了《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)中的二级标准值。其中缺氧池作为中间设置, 充分考虑了厌氧、好氧生化处理单元间的生物特性差异, 顺利实现了两者之间的过渡和衔接。

## 5 结论

(1) UASB—A/O组合工艺对淀粉、淀粉制糖、 $\text{VB}_{12}$ 混合废水具有很好的处理效果, 当进水COD浓度为5 500 mg/L时, 系统出水COD浓度可达100 mg/L, COD去除率为98.2%, 主要污染指标也均达到了《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)中的二级标准值。

(2) 选择UASB反应器作为厌氧生物处理装置, 其具有占地面积小、处理能力强、处理效率高、操作简单, 并可产生沼气等优点。A/O池作为UASB反应器的后续处理设施, 使厌氧出水得到了进一步的净化, 其中A池作为中间设置, 充分考虑了厌氧、好氧生化处理单元间的生物特性差异, 顺利实现了

两者之间的过渡和衔接。

### 参考文献:

- [1] 王培京, 刘战, 葛平, 等. 厌氧—好氧两极生化法处理土霉素生产废水[J]. 环境工程, 2003, 21(1): 27-29.
- [2] 戴建强, 郑敏. 厌氧—好氧生物法处理玉米淀粉生产废水[J]. 中国资源综合利用, 2004(2): 6-7.
- [3] 黄芳, 王丹宇, 涂德贵. UASB—活性污泥工艺处理葡萄糖生产废水[J]. 中国给水排水, 2003, 19(3): 72-74.
- [4] 刘翠英, 张华涛, 刘锦. 厌氧—接触氧化工艺处理 $\text{VB}_{12}$ 、淀粉混合废水的研究[J]. 中国沼气, 2000, 18(3): 24-27, 34.
- [5] 王培京, 刘战, 葛平, 等. 厌氧—好氧两极生化法处理土霉素生产废水[J]. 环境工程, 2003, 21(1): 27-29.
- [6] 戴建强, 郑敏. 厌氧—好氧生物法处理玉米淀粉生产废水[J]. 中国资源综合利用, 2004(2): 6-7.
- [7] 黄芳, 王丹宇, 涂德贵. UASE—活性污泥工艺处理葡萄糖生产废水[J]. 中国给水排水, 2003, 19(3): 72-74.
- [8] Hivayogimath C B, Ramanujam T K. Treatment of distillery spentwash by hybrid UASB reactor[J]. Bio-process Engineering, 1999, 21: 255-259.
- [9] 杨景亮, 刘翠英, 刘三学. UASB反应器处理维生素 $\text{B}_{12}$ 混合废水的研究[J]. 环境科学, 1996, 17(6): 63-65.
- [10] 俞辉群, 译. 水环境净化及废水处理微生物学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985.

(编辑: 张月清)

(上接第107页)

- [6] 崔光红, 陈家春, 蔡大勇. 高效液相色谱法测定棉根皮中棉酚含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 173-175.
- [7] Hron R J, Kuk M S, Abraham G. Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography[J]. JAOCS, 1990, 67(3): 182-187.
- [8] 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: 719-724.
- [9] Smith F H. Estimation of free gossypol in cottonseed meal and cottonseed meats: Modified method[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1968, 45: 903.
- [10] 唐辉, 田晨煦, 姚新成, 等. 食用棉籽蛋白中总棉酚与游离棉酚含量测定[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(1): 53-55.
- [11] GB/T 17334-1998. 食品中游离棉酚的测定[S].

(编辑: 张月清)