

游离棉酚（FG）含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

测定意义：

棉酚（Gossypol）是一种多酚羟基联萘醛类化合物，分子式为 $C_{30}H_{30}O_8$ ，相对分子质量为 518.56，化学名为 2, 2'-双-8-甲基酸-1, 6, 7-三羟基-5-异丙基-3-甲基萘，主要存在于锦葵科植物棉花的根、茎和种子中，对很多棉花病、害虫具有一定的抗性。存在于腺体内的棉酚，主要是游离棉酚(Free Gossypol)。

测定原理：

棉酚在 235nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

需自备的实验用品：

高效液相色谱仪、低速离心机、涡旋振荡器、氮吹仪、溶剂抽滤装置、超声仪、针头式过滤器（有机系，50 个，0.22 μ m）、滤膜（水系 1 个，0.45 μ m）、C18（4.6 \times 250 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2mL）、内衬管（50 个，放置在样品瓶内用于微量样品进样）、超纯水和丙酮。

试剂的组成和配制：

试剂一：提取液：70%丙酮（49mL 丙酮+21mL 水）；

试剂二： H_3PO_4 ；

试剂三：棉酚标准品 0.5mg \times 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 600 mL 和甲醇分别用 0.45 μ m 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。
- 2、流动相的配制：A：1%磷酸水溶液。取过滤后的超纯水 150mL，加入 1.5mL H_3PO_4 ，混匀；B：甲醇。A:B=15：85。
- 3、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

棉酚的提取：

称取约 0.1g 样本，加入 1mL 的试剂一，冰浴匀浆。水浴超声 30min，8000g 离心 10min，取上清液，用提取液定容，涡旋混匀，针头式过滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂三中加入 1mL 丙酮，配成 500 μ g /mL 母液，将母液用超纯水分别稀释成 400 μ g/mL、200 μ g/mL、100 μ g /mL 和 50 μ g /mL 的棉酚标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

棉酚含量测定操作步骤：

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 10 μ L，流

速 1.0 mL/min，柱温 30℃，保留时间 14 min，设置完毕保存方法组。

2. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 加入标准品 10 μ L，在 15min 内可分离棉酚，棉酚的保留时间在 13.5 min 左右（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的棉酚标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μ L，在相应保留时间处检测棉酚的峰面积。

棉酚含量的计算：

以标准品浓度（ μ g/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标计算棉酚标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品棉酚含量。

注意事项：

- 1、棉酚化学性质活泼，易氧化变质，注意标准品和上清液不要存放过久。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 3、使用完毕时，先用 90 %的甲醇洗色谱柱 30min，再用 100%的甲醇冲洗色谱柱 30min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中棉酚浓度确定，样品中棉酚的峰面积必须落在不同浓度的棉酚标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。