

计划生育科研资料

棉酚作为男用节育药的发掘、 整理和提高

(内部资料)

汉 医 学 院

1978.4.

目 录

在毛主席革命路线指引下,积极开展男用节育药棉酚的研究(1971—1978).....	1
棉酚抗生育——发掘祖国医药学宝库的一个丰硕成果(1971—1978)	3

棉子抗生育有效成份的研究

棉籽抗生育有效成份的分离提取与棉酚的测定(1971—1972)	5
棉籽抗生育有效成份的筛选(1971—1972)	12

棉酚、醋酸棉酚作用与毒性的实验分析和临床应用

多种剂量棉酚抑制生精机能的作用(1971—1972)	15
棉酚抗生育作用环节的初步探讨(1972)	18
醋酸棉酚对猴慢性毒性观察(摘要)(1973—1974)	21
醋酸棉酚对猴慢性毒性的组织化学和电子显微镜观察(1974)	23
醋酸棉酚对神经肌肉及植物神经若干环节的可能影响(综述)(1977)	34
醋酸棉酚对神经肌肉标本的抑制作用(1974—1975)	41
醋酸棉酚对神经肌肉接头、横纹肌、心肌若干酶活性的组化观察(1977)	48
醋酸棉酚对植物神经若干环节的作用(1974—1975)	51
棉酚对大鼠钾代谢的影响和某些协同因子(低钾、低镁)的作用(1976)	55
醋酸棉酚作用下氯化钡毒性测定(1976)	69
醋酸棉酚与甲基睾丸酮合并用药的抗精子发生作用(1975)	71
棉酚和醋酸棉酚作为男用节育药临床试用(1974—1977)	73
口服男用节育片(醋酸棉酚)并发低血钾症一例报告(1975)	78

棉酚络合物及其它棉酚衍化物的研究

棉酚衍生物的制备(1971—1972)(1976—1977)	81
棉酚若干衍生物抗生育作用试验(1971—1972)(1976—1977)	86
棉酚金属络合物研究 I: 棉酚络合物及其理化性质(1976—1977)	87

棉酚镁络合物对雄性大鼠抑制精子生成效果和毒性分析 (1976—1977)	91
棉酚镁络合物对神经——肌肉的抑制作用 (1977)	97
棉酚的结构与抗生育效果关系的初步分析及棉酚结构修饰的初步设想(1978).....	99
棉酚镁络合物作为男用节育药的临床试用(摘要) (1977—1978)	101

附录：译 文

棉酚的生理作用及代谢 (1976)	102
-------------------------	-----

在毛主席革命路线指引下 积极开展男用节育药棉酚的研究

(1971—1978)

武汉医学院

计划生育是伟大领袖和导师毛主席、敬爱的周总理、英明领袖华主席非常重视的一件大事。毛主席在1965年明确指出“最好能制造一种简便的口服避孕药品”。

在毛主席革命路线指引下，多年来已研制成功各种类型的女用避孕药。研制比较满意的男用节育药的客观需要亦日益紧迫，周总理曾强调指出要加强这方面的工作。

根据烧热病防治队调研结果——食用粗制生棉油后遗男性不育症，我们抓住了这个苗头，于1971年开始着手棉酚作为男用节育药的研究。七年来，尽管受到“四人帮”反革命修正主义路线的干扰破坏，在各级党政组织领导下，分阶段地完成了一定工作，其中：

1971—1972年在调研工作的基础上分析和确定了棉仁及粗制生棉油中抗生育有效成分；

1973—1974年上半年进行安全性试验，为临床试用作准备工作；

1974—1975年进行棉酚、醋酸棉酚临床试用和实验观察，研究防治毒付作用措施；

1976年以来进行棉酚毒性分析和高效低毒衍化物寻找。

1972年3月曾就棉仁和粗制生棉油抗生育有效成份（棉酚）作为男用节育药的可能性问题在全国计划生育科研汇报会上提出报告。在国务院计划生育办公室和卫生部重视支持下，首先由医科院、湖北、上海、江苏、浙江等省市组成全国男用节育药科研协作组。其后山东陕西等地亦积极参加，终至扩大为医科院及十六省、市的大协作。在全国共同努力下工作取得进展，使得棉酚类化合物成为非甾体类男用节育药，即将填补这方面国内外空白点。

打倒“四人帮”，科技大解放，英明领袖华主席提出“树雄心，立壮志，向科学技术现代化进军”的伟大口号。形势大好，重任在肩。为了与兄弟单位交流经验，力求把棉酚类男用节育药的研究提高到一个新的水平，特将我院有关棉酚男用节育药研究资料选编如后，敬希同道批评指正。

有关科研资料

① 湖北省汉川烧热病防治队：烧热病资料汇编，1972.3.

② 武汉医学院、武汉医药工业研究所棉籽抗生育研究小组：关于食用粗制生棉油引起不孕症的调查报告，1972.3.（向1972年全国计划生育科研汇报会的工作汇报）。

③ 武汉医药工业研究所、武汉医学院棉籽抗生育研究小组：棉仁对大白鼠生殖机能影响的实验研究，1972.3.（同上）。

- ④ 武汉医药工业研究所、武汉医学院棉籽抗生育研究小组：棉籽抗生育研究工作汇报，1972.3.（同上）。
- ⑤ 湖北省棉仁抗生育研究协作小组（武汉制药厂、武汉医学院、武汉医药工业研究所）：棉仁中抗生育有效成分的探索，1972.9.（1972年全国男用节育药科研协作组武汉交流会议资料）。
- ⑥ 湖北省棉籽抗生育研究协作组（武汉医学院、安陆粮食科学研究所、武汉医药工业研究所）：棉酚对猴子的亚急性毒性观察（阶段小结），1973.7.（1973年全国男用节育药科研协作组青岛交流会议资料）。
- ⑦ 同上：棉酚对大白鼠生育力、付睾及睾丸的影响，1973.7.（同上）。
- ⑧ 同上：棉仁、棉酚对大白鼠睾丸、付睾精子的影响～停药后的恢复情况，1973.7.（同上）。
- ⑨ 同上：棉酚衍生物的合成及药理筛选，1973.7.（同上）。
- ⑩ 同上：食用粗制生棉油引致男性不育症临床追踪检查，1973.7.（同上）。
- ⑪ 同上：棉仁对雌性动物抗生育有效成份的初步筛选，1973.7.（同上）。
- ⑫ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚对猴的慢性毒性研究（一）醋酸棉酚慢性实验过程中主要毒性表现，1974，（1974年全国男用节育药科研协作组北京交流会议资料）。
- ⑬ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚对猴的慢性毒性研究（二）醋酸棉酚对猴的毒性病理形态观察，1974，（同上）
- ⑭ 武汉医学院计划生育研究室、医科院分院：醋酸棉酚对猴的慢性毒性研究（三）醋酸棉酚对猴的慢性毒性的组织化学和电子显微镜观察，1974，（同上）。
- ⑮ 湖北地区男用节育片临床科研协作组（武汉医学院第二、第一附属医院、武钢职工医院，武汉医学院计划生育研究室）：男用节育片的临床观察，1975年，（1975年全国男用节育药科研协作组苏州交流会议资料）。
- ⑯ 同上：口服男用节育片（醋酸棉酚）并发低血钾一例报告，1975，（同上）。
- ⑰ 武汉医学院计划生育研究室：食用粗制生棉油引致烧热病500例缓解恢复期追踪检查结果，1975，（同上）。
- ⑱ 武汉医学院计划生育研究室：食用粗制生棉油引致男性不育症的远期追踪观察，1975，（同上）。
- ⑲ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚对神经肌肉标本的抑制作用，1975，（同上）。
- ⑳ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚对植物神经节及节后纤维末梢传导的影响，1975，（同上）。
- ㉑ 棉酚低血钾肌无力会战组：棉酚对大白鼠钾代谢的影响和某些协同因子（低钾、低镁）的作用，1976.12.（1977年全国男用节育药第五次经验交流会议资料）。
- ㉒ 棉酚对神经肌肉和植物神经若干环节的可能影响《综合资料讨论稿》，1977，（武汉医学院计划生育研究室负责整理），（同上）。
- ㉓ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚对神经肌肉接头、横纹肌、心肌若干酶活性影响组化观察，1977.8.（同上）。

- ②④ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚作用下氯化钡毒性测定，1977.8.（同上）。
- ②⑤ 武汉医学院计划生育研究室：醋酸棉酚与甲基睾丸酮合并用药的抗精子发生作用，1977.8.（同上）。
- ②⑥ 武医二院男用节育片科研小组：男用节育片临床观察小结，1977.8.（同上）。
- ②⑦ 武汉医学院计划生育研究室：男用节育片（醋酸棉酚）服药对象心电图、肌电、脑电检查（摘要），1977.8.（同上）。
- ②⑧ 武汉医学院药化教研组，计划生育研究室：棉酚衍化物抑精作用的筛选，1977.8.（同上）。
- ②⑨ 武汉医学院药理学系避孕药研究组，棉酚金属络合物研究Ⅰ：棉酚镁的制备、理化性质及其质量控制，1977.8.（同上）
- ③⑩ 武汉医学院计划生育研究室：棉酚镁络合物对雄性大鼠抑制精子生成效果和毒性分析，1977.8.（同上）。
- ③⑪ 武汉医学院计划生育研究室：棉酚镁络合物对神经—肌肉的抑制作用，1977.8.（同上）。
- ③⑫ 武汉医学院第一、二附属医院泌尿外科：棉酚镁络合物临床应用小结，1977.8.（同上）

棉酚抗生育——发掘祖国医药学宝库的一个丰硕成果

(1971—1978)

武 汉 医 学 院

祖国医药学早有棉籽煮汤治疗“肾子大小偏坠”和“阴囊肾子肿大”等记载，提示可能有抑制睾丸的作用，民间亦有流传“紫花棉子可避孕”的说法。1957年曾有报导江苏某地食用粗棉油引致不育，但都未引起广泛注意。1965年湖北省汉川县发生大批烧热病患者，经防治队多年调查研究，证实与食用粗制生棉油有关。后发现男性烧热病患者后遗不育症，表现为无精子或少精子。据此，我院与湖北医药工业研究所于1971年开始协作，开展了棉仁抗生育的研究。

第一阶段（1971—1972）围绕社会调查和抗生育有效成份分析进行了工作。通过社会调查复证了烧热病防治队的调研结论。食用一定量的粗制生棉油后，男女皆发作烧热病。此时女性伴有月经不调、闭经、子宫萎缩等现象，但康复较为迅速。可是不育现象仍在持续。患病地区干部和群众反映“外地女婿上门，家里可以生小孩，外地娶来媳妇，家里不生小孩”。这提示不育原因在于男方，经调研结果表明这是由于食用油量较大，男性后遗无精子或少精子症康复甚慢之故。曾对男性不育患者进行一般体检，发现除生精机能受损外，健康情况良

好，劳动力甚强。根据社会调查结果设想有可能将这件坏事变成好事，从而发展男性节育药，随即着手有效成份分析工作。按棉仁和粗制生棉油中成份比较复杂，文献报导亦有过比较系统的研究，尤其围绕棉酚进行工作较多，但迄今未见从计划生育角度进行研究。我们首先从动物实验开始，检查了多种棉仁和棉油的抗精子发生作用，发现含棉酚量较高样品，作用明显，含棉酚量较低的样品作用较弱，去除棉酚的精制棉油则无此作用。继之利用层析法以粗制棉油为原料制备了几种去除棉酚的样品，实验结果亦皆无抗精子发生作用；另一方面利用浮选法制备富含棉酚等色素的腺体，抗精子发生作用明显；以丙酮从腺体中提出棉酚等色素，抗精子发生作用亦明显，最后以提纯棉酚进行实验，确证了棉酚是棉仁和粗制生棉油中抗精子发生主要有效成分。

第二阶段(1973—1974上半年)工作在分析棉酚的抗生育作用性能同时，着重检验有关安全性问题。因为文献中曾有报导，棉酚饲犬易致死亡。江苏省在初步开展棉酚抗生育临床试用同时，进行家犬实验中亦观察到心脏抑制突然死亡情况，这就使临床研究难于进行。为解决这个问题，我们进行了社会调查。根据食用粗制生棉油发生烧热病和后遗不孕症对象进行大量的调查和检查结果，并未发现心脏抑制突然死亡情况，提示可能棉酚对家犬呈现有特异的毒性作用。为了“向人民负责”，保证服药者的安全，我们又选用猴进行慢性实验，重点观察棉酚对心脏功能影响。除了进行心电图检查外并与医科分院协作，侧重从形态学角度以组化和电镜方法来观察分析。结果与家犬实验结果不同，并未见心脏抑制突然死亡情况，心肌超微结构正常，线粒体的形态、大小、数量及分布实验动物与对照动物并无差异。这两方面调查研究结果为临床研究提供了一个前提，在严密观察下恢复临床试用有了一定依据。

第三阶段(1974下半年—1975年)进行了棉酚、醋酸棉酚的临床试用，相应进行实验分析，以验证节育效果和探讨防治毒付作用为主要目的。我们临床试用的经验与协作组各地区所得结果是一致的，棉酚和醋酸棉酚都有肯定的抗精子生成作用，其中以醋酸棉酚效果较好。试用中主要的付作用是乏力、口干及其它胃肠道反应，少数对象反映性欲轻度减退。此外并发了一例低血钾肌无力症。针对这些付作用，我们进行了相应的实验。结果表明大剂量的棉酚呈现神经—肌肉抑制作用，可能与乏力症状有关；亦证实了棉酚具有一定抗胆碱作用，这可能与口干及其它胃肠道反应有关，并可据此来解释烧热病患者泌汗机能障碍。实验结果证明甲基睾丸酮并不减弱棉酚抗精子发生作用，亦为防治性欲减退，合并应用雄激素提供了依据。关于棉酚与低血钾的关系则是一个比较复杂的问题，我们虽然也进行了一定的工作，但明确的判断尚有待积累更多的论据。

第四阶段(1976年以来)的工作，除了继续进行醋酸棉酚毒理分析外，侧重研制棉酚高效低毒衍化物。我院与湖北医药工业研究所曾先后合成和筛选了廿多个棉酚类衍化物，对于化构与效果的关系积累了一定的资料。其中发现棉酚镁络合物在动物实验中毒性显著降低，仍保留较好的抗精子发生作用。初步临床试用结果表明毒付作用甚少，可惜抗精子发生效果亦差，为了进一步提高棉酚镁络合物的效果和寻求更满意的新衍化物，正在继续开展研究。

棉酚类作为男用节育药的研究，通过全国协作努力，已经取得重要进展，在非甾体类型男用节育药方面是发掘祖国医药学宝库填补国内外空白点的一项丰硕成果。在全国科学大会召开的大好形势鼓舞下，我们决心响应英明领袖华主席“树雄心、立壮志、向科学技术现代化进军”的号召，继续发展和扩大棉酚类男用节育药的科研成果，赶超世界先进水平，争取为人类作出更大的贡献。

棉籽抗生育有效成份的分离提取与棉酚的测定

(1971—1972)

湖北省棉仁抗生育研究协作小组
(武汉医学院、武汉医药工业研究所)

1969年,我院烧热病科研队从研究烧热病因过程中发现粗制生棉油可引起男性不育(1、2),并以一定比例的生棉仁喂养雄性大鼠,成功地复制了生殖系统损害的动物模型(2),从而证实生棉油中存在着抗生育的有效成分。1971年,武医计划生育研究室和烧热病科研队及湖北医药工业研究所共同组成湖北省棉仁抗生育研究协作小组,从计划生育的角度,对棉籽中化学成份开展了进一步研究:

一、棉籽色素腺体的分离③

棉籽色素腺体是一种小球状体,存在于棉仁中,比重小于1.378,而棉仁的其它部分的比重均大于1.378。据此,利用比重不同而采取浮选法进行分离。其操作方法如下:

1、原料加工:棉籽经脱壳后,取其棉仁加以粉碎,过80目筛(控制水分不超过3.5%)。

2、浮选剂的配制:在一直形园筒中(直径与高度之比为1:5),加入四氯化碳,再加入正己烷调整浮选剂的比重恰好为1.378。

3、浮选手续:用2000转/分搅拌机拌搅浮选剂,按每升浮选剂加入100克棉仁粉的量投到浮选剂中,搅拌30分钟后静置5—6小时,用纱布制成的捞箕捞取浮出的腺体(新棉籽的腺体为棕红色,陈棉籽的腺体为棕黑色),置于布氏漏斗上抽干,并用少量正己烷洗涤,抽干后的色素腺体置于真空干燥箱中干燥8—10小时,得棉籽色素腺体(含游离棉酚平均值为31.26%)。

4、非腺体和浮选液的处理:经浮选腺体后,大部分去除腺体的残渣(主要是棉籽蛋白)沉入园筒底部,把这一部分称为非腺体,置于布氏漏斗上抽滤,并以正己烷反复洗涤、抽干,进行真空干燥,测得其棉酚含量为0.25% (估计是由于腺体未能完全分离干净带来的)。非腺体呈白色粉状(像面粉)。滤液由于一部分棉酚被溶入其中以及可能有其它色素被溶入,因而呈现棕色。将此滤液在40℃减压回收四氯化碳和正己烷,直至无明显溶剂臭味为止,残留棕褐色油状液体,我们称此为“溶质”部分,经测定含棉酚0.45%。

以上述手续分离所得的三个样品(腺体、非腺体以及溶质部分),按得量比例混于饲料喂饲动物,实验结果见“棉籽抗生育有效成份的筛选”一文。实验结果表明,对睾丸的损害作用和毒性皆表现在棉仁的腺体中。

二、棉酚的提取

棉酚是腺体中的主要毒性成份。为了进一步找出抗生育的有效成份,我们进行了棉酚的分离提取,曾先后用过棉籽色素腺体、棉仁粉以及粗制生棉油作原料,采取冰醋酸沉淀法进行

提取，后来又改用苯胺沉淀法。这两法的操作手续如下：

1、冰醋酸沉淀法（4—6）：

（1）棉仁经粉碎后过40目筛，取其1公斤，置于有盖的大玻璃瓶中，加入1200~1500 ml 低沸点（30~60℃）石油醚，浸泡24小时（经常加以搅拌），抽干，滤液用少量石油醚洗涤，得脱脂棉仁粉。用1500ml 脱过氧化物的乙醚浸泡脱脂棉仁粉（浸泡不少于24小时），抽滤醚液，弃其滤渣。将醚液进行减压浓缩（50℃以下），浓缩至体积约为100毫升，加入等体积的冰醋酸，充分搅拌后置于冰箱中过夜，抽滤，漏斗上的沉淀物，用少量石油醚洗涤数次，得黄色的醋酸棉酚。将此醋酸棉酚粗品，用适量脱过氧化物的乙醚溶解，过滤除去不溶物，滤得的醚液经过适当减压浓缩后，加入等体积冰醋酸进行重结晶。

重结晶后的醋酸棉酚，以适量脱过氧化物的乙醚溶解，加入等体积的蒸馏水，再加入0.4%亚硫酸氢钠溶液约20ml，倾入蒸馏瓶中减压回收一半左右的乙醚，转移至烧杯中，待冷后加入2—3倍量的低沸点石油醚，马上析出鲜黄色沉淀，静置数小时后抽滤，以蒸馏水和石油醚分别洗涤2次，抽干，置于盛有 P_2O_5 的干燥器中让其干燥数天。

将上述基本干燥的棉酚，溶于适量的脱过氧化物的乙醚（若有不溶物应过滤除去之），加入低沸点石油醚，加至醚液略变浑为止，放置过夜，析出鲜黄色细针状结晶，抽滤，并以少量石油醚洗涤2次，抽干，进行真空干燥（100℃，4—6小时）。得棉酚精品2.5克， m 、 P 、183—184℃。

（2）以棉籽色素腺体作原料，称取前面手续分离的棉籽色素腺体25克，加入200ml 脱过氧化物的乙醚于密封瓶中浸泡24小时，滤取醚液，滤渣用少量乙醚洗涤，合并到原醚液中去，让其自然挥发一部分乙醚后，加入等体积冰醋酸，搅匀后置于冰箱中过夜，滤取醋酸沉淀，再按上述方法进行精制以及转化为棉酚。约得棉酚精品4克。

2、苯胺沉淀法（4—7）：

（1）以粗制生棉油为原料，用丙酮稀释，加苯胺沉淀，得二苯胺棉酚，再转化为醋酸棉酚或棉酚。具体操作如下：取粗制生棉油（用68型动力螺旋榨油机压榨生棉籽所得的油）1公斤，加入等重量的丙酮以及200ml 新蒸馏的苯胺，让其在室温下放置24小时，底部析出棕红色的二苯胺棉酚，倾出上清液，滤取二苯胺棉酚，依次用少量丙酮、石油醚洗涤，抽干，置于盛有 P_2O_5 的干燥器中干燥。

按每克二苯胺棉酚加入30ml 乙醚—冰醋酸（1:1）混合液，搅拌之，二苯胺棉酚悬浮于其中，缓慢滴入浓硫酸1.8ml（容器坐入冰浴中），溶液呈现红色，2分钟后加入蒸馏水4ml 继续搅拌5分钟，容器从冰浴中取出，在室温下放置10—15分钟后抽滤，用蒸馏水洗涤至pH约为4—5，再用低沸点石油醚洗涤一次，得黄色醋酸棉酚。真空干燥。

按每克醋酸棉酚约加6ml 乙醚溶解，滤去不溶物，向醚液中加入0.25%亚硫酸钠水溶液10ml，充分振荡。减压蒸去乙醚至原体积三分之一左右，向浓缩液中加入2倍量的石油醚（或更多一些），析出鲜黄色沉淀，抽滤、干燥。再按“冰醋酸沉淀法”中重结晶方法进行重结晶。总收率约0.6%。

（2）以生棉仁粉为原料，以70%丙酮萃取（按每1000克棉仁粉加入70%丙酮1500~1800ml计）。可采取渗滤法或浸泡方法。丙酮萃液经回收适量丙酮后，加入新蒸馏的苯胺（按每1000ml 萃液加入150克苯胺计），置于70℃水浴中温热30分钟（不断搅拌），冷却后2小时滤出沉淀物，为二苯胺棉酚，按上法转变为醋酸棉酚，最后转变为棉酚。

棉酚组的第一批动物实验的样品系用冰醋酸沉淀法制得的棉酚，以后各批动物实验的样品系用苯胺沉淀法制取的棉酚。动物实验结果表明，棉酚和醋酸棉酚均有明显的抗生育作用。

三、棉酚的分析鉴定（5）

用上述各种方法提取的棉酚，它的理化性状符合于文献记载。不溶于水，难溶于石油醚，溶于乙醚、氯仿等有机溶剂。它为鲜黄色的细针状结晶（石油醚中所得结晶），熔点在 $183\sim 184^{\circ}\text{C}$ 。

它能与下列试剂呈现颜色反应（符合文献记载）：

- ① 与三氯化锑氯仿溶液呈现红色；
- ② 与浓硫酸反应呈现血红色；
- ③ 与苯胺反应（在丙酮中）呈现棕黄色沉淀；
- ④ 与三氯化铁乙醇液反应呈现橄榄绿色；
- ⑤ 与氯化重氮苯（重氮盐）在低温下反应生成红色的偶氮化合物。

它的紫外和红外吸收光谱，符合文献报导。根据 Ramaswamy 等人最近的报告，棉酚的紫外吸收光谱的特征吸收峰（ λ_{max} ）为240，282，292，370 $\text{m}\mu$ （丙酮作溶剂），我们用 Shimadzu 紫外分光自动测绘仪获得下列数据：244，278，288，365（ $\text{m}\mu$ ）。结果基本一致。

棉酚的红外吸收光谱，据 Ramaswamy 等人的报告，主要吸收峰的数据为： (cm^{-1}) 3550（OH），3000（CH），1625（C=O），1440（—CH₃），1245（=C—O⁻）。我们用岛津 I R 400 红外分光光谱仪测得棉酚的主要吸收峰数据是： (cm^{-1}) 3500（OH），3000（CH），1625（C=O），1440（—CH₃），1250（=C—O⁻）。这也基本符合文献记载。

四、棉酚含量测定

根据文献记载，棉酚含量的测定方法甚多，其中较常用的有：三氯化锑分光光度法、苯胺分光光度法、三氯化铁— α ， α' 联吡啶分光光度法、紫外分光光度法、气相层析法等。结合我们实验室的条件，我们采用了三氯化锑分光光度法、苯胺分光光度法和三氯化铁— α ， α' 联吡啶分光光度法进行棉油、棉仁、腺体以及自制棉酚的含量测定。这三种方法的操作手续如下：

1、三氯化锑分光光度法（5，9）：

试剂及其配制：

①饱和的三氯化锑氯仿溶液：称取试剂级的无水三氯化锑30克，用少量氯仿洗涤一次，洗涤后的三氯化锑置于研钵中迅速研磨成粉状，加入100毫升氯仿配成饱和溶液，连同未溶解的三氯化锑一起倾入棕色瓶中保存，经过24小时后即可使用。使用时取其上层澄清液。

②醋酐：试剂级，无色。

标准曲线的制作：

精确称取20毫克纯棉酚，用少量化学纯的氯仿溶解，注入100毫升容量瓶中，加氯仿至刻度线，摇匀。此溶液每毫升相当于0.20毫克纯棉酚。此溶液即为纯棉酚标准液。准备6支带玻塞的比色管，按下表中指定的手续、顺序和数量配制：

比 色 管 编 号	0	1	2	3	4	5
棉酚标准液 (ml)	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00
氯 仿 (ml)	5.00	4.80	4.60	4.40	4.20	4.00
醋 酐 (滴数)	4	4	4	4	4	4
三氯化锑溶液 (ml)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

加完全部试剂后摇匀，放置15分钟，在72型分光光度计上选择 520 毫微米波长，用 1 厘米厚的比色杯装盛各号反应液，以 0 号管定零点测定它们光密度。以光密度为纵坐标，纯棉酚的毫克数作横坐标作图，得标准曲线。

· 样品棉酚含量的测定：

精确称取一定重量的样品（折合棉酚量约 3—4 毫克），用氯仿溶解（若样品为棉仁或棉籽饼粕，在称取前粉碎过筛，然后精确称取一定量，用氯仿浸泡（24 小时）或抽提）后，置于 25 毫升容量瓶中，再用氯仿稀释至刻度线。当混匀后，吸取一定量样品液配制下面两管：

样品管：准确吸取样品液 1 毫升于比色管中，加入氯仿 4.00 毫升，滴入醋酐 4 滴，加入三氯化锑溶液 5.00 毫升，摇匀，静置 15 分钟。

空白管：吸取样品液 5 毫升，置于小分液漏斗中，加入等体积的 0.25 N KOH 溶液，剧烈振荡 5 分钟，分离出氯仿层，让其通过铺有无水硫酸钠的漏斗，收集滤液，准确吸取该滤液 1 毫升，置于比色管中，加入氯仿 4 毫升，滴入醋酐 4 滴，再加入 5 毫升三氯化锑溶液，静置 15 分钟。

以空白管定 0 点，测定样品管内容物的光密度（选用波长 520 毫微米）。根据所测得的光密度值，在标准曲线上找出相应的纯棉酚毫克数，按下列公式计算样品所含棉酚的百分率：

$$\text{棉酚含量}\% = \frac{\text{样品液相当棉酚量 (mg)}}{\text{样品液所含样品量 (mg)}} \times 100$$

2、苯胺分光光度法 (10)：

标准曲线的制作：

精确称取 10 毫克纯棉酚，用 70% 丙酮溶解，在容量瓶中配成 100ml 溶液，摇匀。每 1ml 含 0.1 mg 棉酚的标准棉酚液。

精确吸取标准棉酚液 0, 0.40, 0.80, 1.20, 1.60, 2.00ml 置于 25ml 刻度比色管中，添加 70% 丙酮使每管的体积为 2.00ml，加入新蒸无色苯胺 2 ml，置于 55℃ 恒温水浴中反应 45 分钟（反应过程中摇动 2 次）。待冷至室温后，分别加入脱醛乙醇使各管的总体积达到 25 毫升，摇匀。用 72 型分光光度计，选择 445 毫微米波长，以 1 厘米厚度的比色杯装盛上述制备的反应液，以未加棉酚的 0 号管作空白对照，分别测定它们的光密度。按所得光密度与相应的棉酚毫克数作曲线，即得标准曲线（必要时加以校正，使曲线通过原点）。

样品测定：

取过 40 目筛的棉仁粉 0.5000 克，加 50 毫升 70% 丙酮，投入数十颗玻璃珠，置于振荡器上振荡

一小时。然后过滤，用少量70%丙酮洗涤漏斗上的滤渣，滤液和洗涤液合并于100毫升容量瓶中，用70%丙酮稀释至刻度线，摇匀后吸取三分（每分2.00毫升）于25ml刻度比色管中，其中两分各加新蒸馏的无色苯胺2.00ml，置于80℃恒温水浴中反应30分钟（振摇2次）。反应毕，取出冷却至室温，以脱醛乙醇稀释至25ml。按标准曲线制作的测定条件进行光密度测定（以未加苯胺的样品稀释液作空白对照），取其两分的光密度平均值在标准曲线上找出相应的棉酚毫克数，计算棉仁中的棉酚含量。

3、三氯化铁—联吡啶分光光度法（11）：

试剂配制：（1）三氯化铁—联吡啶试剂：0.5克三氯化铁和0.5克 α ， α' 联吡啶在100ml容量瓶中以乙醇配成100ml溶液。

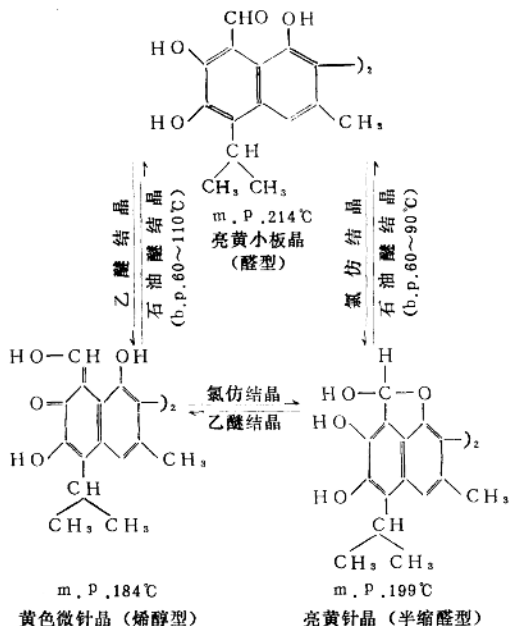
（2）标准棉酚液：称取20mg纯棉酚（m、p、184℃）以乙醇溶解，在容量瓶中配成100毫升溶液。此溶液每毫升相当于200微克棉酚。

标准曲线的制作：精确吸取0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90及1.00ml标准棉酚液，分别置于10ml容量瓶中，并在各瓶中加入1.00ml三氯化铁—联吡啶试剂，追加乙醇至刻度线，塞上玻塞，置于暗处放置15分钟后，在72型光度计上选择510毫微米波长处测定各瓶的透光率（以试剂作空白对照，即是以1毫升三氯化铁联吡啶试剂加乙醇配成10ml溶液作空白）。以所得的透光率数据和相应的棉酚微克数作图。得标准曲线。

样品棉酚含量测定：精确称取过60目筛的棉仁粉25毫克，与大约100毫克无水硫酸钠共研磨，加入5ml石油醚（b.p. 30°~60℃）振荡。离心，倾去上清液，再用石油醚重复处理（脱脂）两次，弃其上清液。向残渣中加入10ml乙醚，振荡5分钟后离心，小心吸取上层清液，再向残渣中加入10ml乙醚重复上述操作（共萃取三次），合并乙醚萃取液并在40℃水浴上小心蒸发之。得棕黄色残留物，将此用乙醇溶解，定量地转移到10ml容量瓶中，加乙醇至刻度线，摇匀。精确吸取此醇液2.00ml，置于10ml容量瓶中，加1.00ml三氯化铁联吡啶试剂，加乙醇至刻度线，摇匀，置于暗处放置15分钟后，在波长510毫微米处测定其透光率（以试剂作空白一同标准曲线制作）。由此，参照标准曲线相应透光率的棉酚微克数以计算样品的棉酚含量。

五、棉酚互变异构体的分离（12）

文献早有记载，棉酚有三种互变异构体，它们的熔点分别为184℃，199℃及214℃。据文献报告指出三者的互变关系是：



为了探讨这三种异构体的抗生育作用的强度，我们参照 Cadmpbell 方法进行纯化和分离。

烯醇型：粗制棉酚 1 克，加 25ml 脱过氧化物的乙醚，滤除不溶物，向滤液中加入 25ml 石油醚 (30~60°C)，减压蒸除溶剂至微浑，再加入二倍体积的石油醚，放一小时后过滤，得 0.71 克结晶性粉末，m. p. 183—184°C。

半缩醛型：取粗制棉酚 1 克，加氯仿 25ml 溶解，滤除不溶物，置于冰箱中过夜，得针晶 0.5 克，m. p. 199—201°C。

醛型：取熔点 183—184°C 的纯棉酚 1 克，加 450ml 石油醚 (b. p. 60~90°C) 回流，滤液浓缩至 350ml 左右，趁热过滤，放置一定时间后析出小块状结晶，约 0.15 克，m. p. 212—214°C。

棉酚的三种异构体，经动物实验表明：它们的抗生育作用的强度无明显差别，仅醛型的作用稍弱。

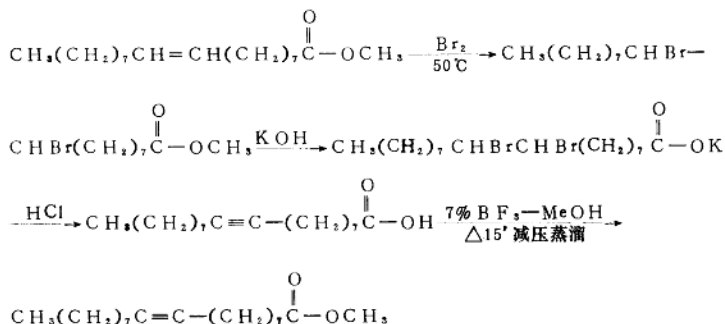
频婆酸甲酯的合成

据国外文献报导，棉籽中含有一类具有环丙烯结构的脂肪酸，其中以频婆酸和锦葵酸为主要代表。这些不饱和和环状脂肪酸能影响母鸡产卵率、鸡蛋质量、孵化率以及幼鸡性成熟。为了探讨这类脂肪酸是否有明显抗生育作用，我们试图从棉籽中分离出这些成分，但含量太

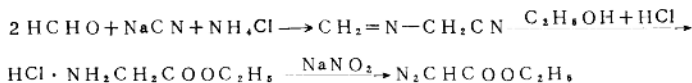
低，未获成功。于是，我们走合成的道路取得这类样品。

1、硬脂炔酸甲酯的合成：

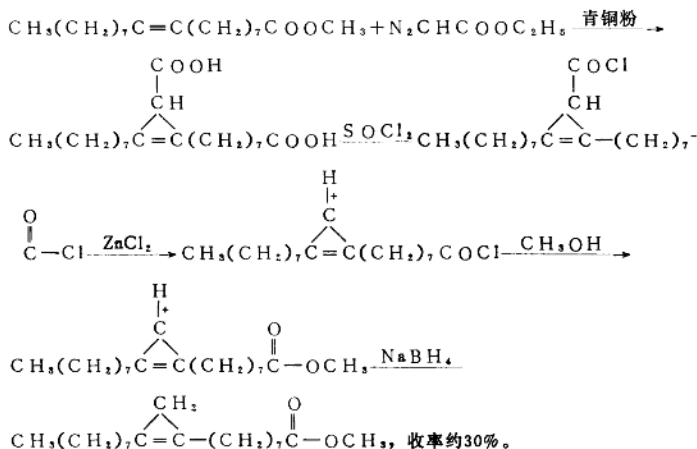
以油酸甲酯为原料，首先合成中间体“硬脂炔酸甲酯”，其合成路线如下：



2、重氮乙酸乙酯的制备：



3、频婆酸甲酯的合成：



收率约30%。

合成样品经红外测定，符合要求。药理实验见另文。

(本文由石朝周同志整理，吴照瑞同志复核)

参 考 文 献

- ① 卫生部、农林部、商业部联合批转：“汉川烧热病防治工作现场会议纪要”（1970年10月20日）。
- ② 湖北省汉川烧热病防治队编：《烧热病资料汇编》，1972年3月出版。
- ③ R. D. Westbrook, JAOCS, 24, 228—236 (1947)。
- ④ A. E. Bailey., 《Cottonseed and cottonseed products》, 216 (1948)。
- ⑤ А.Л.Маркман, В.П.Ржехин, 《Госсипол и его производные》 (1965)。
- ⑥ W. H. King, F. H. Thurber, JAOCS, 30, 70—74 (1953)。
- ⑦ F. H. Smith, JAOCS, 37, 286—288 (1960)。
- ⑧ M. N. Ramaswamy, R. T. O'Connor, JAOCS, 45, 841—844 (1968)。
- ⑨ Ch. H. Boatner, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 16, 566 (1944)。
- ⑩ F. H. Smith, JAOCS, 35, 261—256 (1958)。
- ⑪ J. M. S. Mathur, et. al., JFST, Ind. 9, 139—140 (1972)。
- ⑫ K. N. Campbell, JACS, 59, 1727 (1937)。

棉籽抗生育有效成分的筛选

(1971—1972)

湖北省棉仁抗生育协作组

(武汉医学院, 武汉医药工业研究所)

食用粗制生棉油引致烧热病后遗不育症的调研结果为发掘节育药物提供了一个苗头。为了整理提高, 去粗取精, 首先需要确定其中有效成分, 力求去除有毒成分。我们从1971年开始着手这方面工作。1972年初确定了棉酚是抑制雄性大白鼠生精机能的有效成分, 1972年底确定了频婆酸是抑制雌性大白鼠生育力的主要有效成分。关于抗精子发生有效成分的筛选, 实验及结果小结如下:

实验样品: 共选择了以下样品进行实验, 包括汉川老棉仁(已贮存一年), 汉川新棉仁、东西湖新棉仁、粗制生棉油, 精制棉油, 花生油, 此外选用上文报导的从粗制生棉油中制备的层析Ⅰ部、层析Ⅱ部、层析Ⅲ部以及从棉仁中利用浮选法制备的腺体, 腺体的丙酮萃取物以及提纯的棉酚, 对以上各种样品测定了其中棉酚含量。

实验方法: 选用成年雄性大白鼠, 以上列实验样品掺入饲料, 任其自由进食(掺入量棉仁为8—10%, 其它成分掺入量根据在棉仁内含量确定)。动物分别于实验1~4日后杀

死，取睾丸称重后，包因氏液固定，石蜡切片，苏木素—伊红染色，进行病检。

睾丸病变定级标准沿用烧热病防治队实验方法，首先对单个曲细精管病变进行定级，再根据200个曲细精管病变程度对整个睾丸损害进行定级（表1）、（表2）

表1 单个曲细精管病变的定级标准

分 级	形 态 变 化
正 常	上皮各层细胞丰富、层次分明。精子及精细胞较多。
轻 度 病 变	上皮各层细胞尚存、但精子及精细胞减少，部分精母细胞及精原细胞变性（核及原浆出现空泡）
中 度 病 变	上皮细胞明显减少。有多核巨细胞形成。有的细胞变性，坏死明显。次级精母细胞及精细胞数目极少或消失。
重 度 病 变	曲细精管显著变细，上皮细胞几乎全部消失，只剩下支持细胞或少数精原细胞。

表2 整个睾丸损害的定级标准

分 级	正常及各级病变曲细精管的百分比
正 常	基本无病变
轻 微 损 害	数个或十余个曲细精管出现病变
I 级 损 害	正常+轻度病变>66%。或正常+轻度病变>50%，同时，正常+轻度病变+中度病变>75%
II 级 损 害	介于I级III级损害之间
III 级 损 害	重度病变>66%。或重度病变>50%，而重度病变+中度病变>75%

首先，利用棉仁进行实验，结果见表3。

表3 不同贮存时间棉仁的作用比较

组 别	饲料内 掺入量	100克 饲料内棉 酚含量	实验 时间	实验 动物数	实验结束 存活动物数	平均体重(克)		睾丸平均 重(克)	睾丸损害 动物数				
						实验 前	实 验 结 束		正 常	轻 微	I 级	II 级	III 级
汉 川 老棉仁组	10%	50毫克	2月	6	6	363	348	3.3	6				
汉 川 新棉仁组	10%	100毫克	2月	6	5	403	279	2.8	1	4			
汉 川 老棉仁组	10%	50毫克	4月	6	5	302	302	2.3	0	1	2	1	1
汉 川 新棉仁组	10%	100毫克	4月	6	2	294	350	2.6		2			

经测定汉川老棉仁棉酚含量为0.5%左右（0.42—0.537%），汉川新棉仁棉酚含量1%

左右(0.904—1.167%), 饲料内棉仁掺入量为10%, 折合每100克饲料中分别含棉酚约50毫克及100毫克。实验结果表明皆引致睾丸损害, 其中老棉仁组损害较新棉仁组轻。

然后选择汉川和东西湖不同产地新棉仁进行实验, 结果见表4。

表4 不同产地棉仁的作用比较

组别	饲料内 掺入量	100克饲料内棉 酚含量	实验 时间	实验 动物数	实验结束 存活动物数	平均体重(克)		睾丸平均 重(克)	睾丸损害 动物数			
						实验前	实验结束		正常	轻度	中度	重度
汉川 新棉仁组	8%	80毫克	2月	14	10	256	212	2.1	1	3	3	2
	8%	80毫克	3月	16	14	263	282	1.8	1	2	7	2
	8%	80毫克	4月	8	4	265	309	1.6				1
东西湖 新棉仁组	8%	80毫克	2月	8	6	269	235	2.4	0	2	3	1
	8%	80毫克	4月	8	5	271	274	2.0	3	2		

两地所产棉仁棉酚含量相近, 对睾丸损害程度亦相近。

按前文所述, 利用层析法将粗制生棉油分成几个部分, 分别检验其抗精子发生作用。结果见表5。

表5 粗制棉油及其层析分离部分的作用比较

组别	饲料内 掺入量	100克饲料内棉 酚含量	实验 时间	实验 动物数	实验结束 存活动物数	平均体重(克)		睾丸平均 重(克)	睾丸损害 动物数			
						实验前	实验结束		正常	轻度	中度	重度
粗制 棉油组	3%	25毫克	98天 4月	8 8	8 7	249 231	302 343	3.1 2.8	4	1	2	1
层析I组	1.3%	—	98天 4月	8 8	8 8	247 233	353 373	3.3 3.4	8			
层析II组	0.4%	—	98天 4月	8 8	8 8	248 233	347 401	3.1 3.3	8	7	1	
层析III组	0.1%	—	98天 4月	8 8	8 8	245 232	345 369	3.2 3.3	8	8		
精制 棉油组	3%	微量	2月 4月	5 5	5* 5	273 260	413 382	3.3 3.6	4 5			
花生油组	3%	—	4月	16	16	259	380	3.17	13	3		

*其中一只大白鼠一个睾丸正常一个睾丸发育不正常, 结果未列入。

经测定粗制生棉油内棉酚含量为0.83%左右(0.8—0.859%)精制棉油只含微量棉酚, 其它各种饲料基本不含棉酚。实验结果含棉酚的粗制生棉油饲鼠, 可引致睾丸损害。

而后利用浮选法将富含棉酚等色素的腺体分离, 再用丙酮萃取其中所含棉酚等色素, 而