

柳宗元牌蛇鞭酒 HPLC 指纹图谱研究

庞立,刘素纯,夏波

(湖南农业大学食品科技学院,湖南 长沙 410128)

摘要: 利用高效液相色谱建立了柳宗元牌蛇鞭酒的石油醚-乙醚提取物的指纹图谱,并检验了该产品的质量稳定性。实验条件为:反相 C_{18} 柱,流速为 1.0 mL/min,UV 检测器($\lambda=350$ nm),流动相为甲醇,梯度洗脱,并利用 Drylab 软件进行色谱条件优化。分析和比较了不同批次的产品的统计指纹图谱的相对保留时间和积分面积,结果表明,12 个批次的蛇鞭酒之间有 15 个共有指纹峰,各样品色谱图之间的相似度相差不大,均在 0.951 以上,说明 12 个批次样品的质量都很稳定,该方法易于操作,对产品质量的控制有明显的效果。

关键词: 蛇鞭酒; HPLC; 指纹图谱; Drylab

中图分类号:TS262.91;TS261.7

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)03-0040-03

Study on Fingerprints of LIU Zong-yuanTM Snake Wine by HPLC

PANG Li, LIU Su-shun and XIA Bo

(Food Science & Technology College of Hu'nan Agricultural University, Changsha, Hu'nan 410128, China)

Abstract: The fingerprint of petroleum ether-ether extract of LIU Zong-yuanTM snake wine was established by use of HPLC and the quality stability of the fingerprint was verified. The experimental conditions were as follows: RP- C_{18} column, flow rate was 1.0 mL/min, UV detector ($\lambda = 350$ nm), mobile phase was methanol, gradient elution, and optimization of chromatographic conditions by Drylab software. The relative retention time and integration area of the statistics fingerprint of wine of different production batch were analyzed and compared. The results showed that there were 15 fingerprint peaks in common for snake wine of 12 production batches and there was little difference in the similarity between the sample chromatograms (similarity above 0.951), which proved that snake wine quality of 12 production batches was stable. Such method was easy to operate and useful for wine quality control.

Key words: snake wine; HPLC; fingerprint; Drylab

蛇酒,就是将蛇与酒合理配伍的一种可用于保健、治病的酒剂。以蛇泡酒在我国已有悠久的历史。柳宗元牌异蛇王酒系列产品,采用永州特产、被医学界视为珍品的五步蛇、银环蛇、眼镜蛇等多种珍贵蛇类,配以多种名贵中草药及陈酿 45 %vol 粮食酒,利用现代高科技工艺精制而成。异蛇王酒的临床使用证明,饮后可提高机体免疫力,消除肌肉疲劳,并有增食、提神的作用,有利于身体健康^[1]。蛇鞭酒更是其中特别推崇的产品之一。

指纹图谱是随着现代分析技术发展而诞生的一种从整体上研究复杂物质体系的手段^[2-3],属于质量分析和控制技术,其目的在于通过简便易行的方法,而不是复杂而昂贵的程序,在短时间内达到企业对于产品质量分析和控制的目的^[4]。该技术基本属性是整体性和模糊性,即不需要了解复杂物质中每一组分的具体情况,而是从整体上对物质进行评价。目前该技术广泛应用于中草药及其相关产品的质量控制方面^[5-6]。因为蛇鞭酒属于保健酒的一种,含有多种中草药成分,所以借鉴该技术建立蛇鞭酒的指纹图谱研究方法,并利用该方法对产品进行质量控

制,意义非常重要。本文利用高效液相色谱仪对柳宗元牌蛇鞭酒的石油醚-乙醚提取物进行了指纹图谱分析,并对该产品的稳定性做了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

柳宗元牌蛇鞭酒,选择 12 个不同生产批次。

1.2 试验方法

1.2.1 仪器

美国瓦立安公司高效液相色谱仪,450 型高压泵,922 型可调紫外检测器,Star6.0 色谱工作站,Drylab2.0 色谱条件优化软件,旋转蒸发仪,柱温箱,4256 型分光光度计,恒温水浴锅,500 mL 砂型过滤器,真空抽滤机,纯水机,分液漏斗。

1.2.2 试剂

石油醚,乙醚为分析纯,甲醇为色谱纯。

1.2.3 样品前处理^[7-9]

取酒样 25 mL,用 50 mL 石油醚进行第一次萃取,又

收稿日期:2009-11-20

作者简介:庞立(1980-),女,湖南长沙人,本科,在读硕士研究生。

用 50 mL 乙醚进行第二次萃取,然后再用 50 mL 石油醚和 50 mL 乙醚分别萃取 1 次。合并萃取液后,于 45 °C 旋转蒸发器中挥发干溶剂,以甲醇定容至 10 mL,经 0.45 μ m 的滤膜过滤后供分析用。

1.2.4 色谱条件

流动相:甲醇(A)+纯水溶液(B);梯度洗脱:0~30 min,40%~100%;色谱柱:ODS C₁₈(美国杰夫公司,5 mm i.d.×250 mm,5 μ m);流速:1.0 mL/min;柱温:32 °C;进样量:20 μ L;检测波长:350 nm。

2 结果与分析

2.1 前处理分析

对于含中草药成分产品的分析,目前大部分采用石油醚-乙醚提取法进行前处理。本试验对于石油醚和乙醚的使用量和次数进行了研究和比较。通过试验验证 2 次提取能够得到最佳效率,而石油醚和乙醚用量的多少对提取效率影响不大。故采用石油醚和乙醚用量为 50 mL,采用 2 次提取对蛇鞭酒进行前处理。

2.2 吸收波长的确定

采用 4256 型分光光度计对经过前处理的样品进行全波长扫描,结果见图 1。图 1 结果表明,样品在 300 nm、320 nm 和 370 nm 处都有较大吸光度,而在 350 nm 处的吸光度达到最大。故采用 350 nm 作为检测波长。

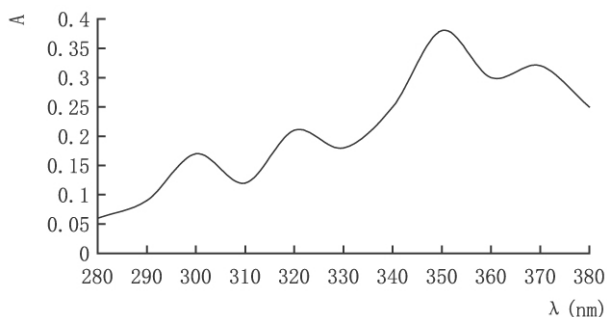


图1 蛇鞭酒石油醚-乙醚提取物全波长吸光度

2.3 梯度条件的确定

采用 Drylab2.0 色谱模拟软件对色谱梯度条件进行优化。先随机采用两套梯度条件对同一样品进行色谱分析,将数据结果输入 Drylab2.0,运算得到最佳梯度条件为 0~30 min,甲醇浓度由 40%逐步上升至 100%。由该优化条件对样品进行色谱分析。结果表明,运用该条件所得样品的色谱图分离度 R 值最小为 1.68,达到基线分离的目的。

2.4 方法学考察^[10]

2.4.1 稳定性试验

取同一份处理后的样品溶液,按照优化后的色谱条件,分别在 0、2 h、4 h、6 h、8 h、16 h 和 32 h 7 个时间点进行检测。结果表明,各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积没有明显变化,其 RSD 值均<4%,没有统计学意义,说明利用该色谱条件可以获得稳定的 HPLC 指

纹图谱。

2.4.2 精密度试验

取同一份处理后的样品溶液,按照优化后的色谱条件连续进样 6 次。结果表明,各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积无明显变化,其 RSD 值均<2%,说明该试验的精密度较高。

2.4.3 重复性试验

取同一处理后的样品,分成 6 份分别进样。结果表明,各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积较一致, RSD 值均<2%,说明该试验的重复性较好。

2.5 样品指纹图谱的建立

12 个不同生产批次的异蛇王蛇鞭酒经过前处理后,按照试验条件分别进行进样分析,得到 12 个指纹图谱,结果见图 2。

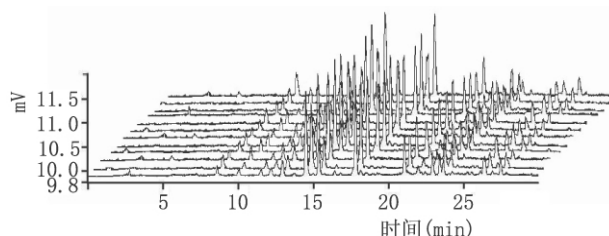


图2 12个不同批次柳宗元牌蛇鞭酒 HPLC 色谱图

2.6 指纹图谱特征分析

2.6.1 相对保留时间和相对面积计算

柳宗元牌蛇鞭酒在用经过 Dry2.0 软件优化后的试验条件下,各个峰之间区分明显,分离度 R 值的最小值为 1.68,属于基线分离。在色谱图中选择一峰面积最大且在各样品中所共有的峰为参照峰^[11]。本文选择指纹图谱中保留时间由小到大排第 6 的,即保留时间在 14.45 min 左右的色谱峰为参照峰,计算其他峰的相对保留时间和相对面积。

相对保留时间计算公式为: $\alpha=t_r/t_{rs}$,其中 t_{ri} 为待测峰的绝对保留时间, t_{rs} 为参照峰的绝对保留时间。

相对峰面积计算公式为: $A_r=(A_i/A)\times 100\%$,其中 A_i 为待测峰的峰面积,A 为样品色谱峰的总面积。

2.6.2 特征峰的选择

共有峰为在不同样品间具有的相同 α 值的峰。从图 2 中可以看出,图谱中有 15 个峰为全部样品所共有。表 1 列出了 12 个不同批次蛇鞭酒样品的 15 个色谱峰的相对保留时间以及相对面积。由于 12 个图谱对应峰的相对保留时间的最大 RSD 值<1%,所以用其均值表示。这 15 个峰即是指纹图谱的特征峰,可作为鉴别产品质量稳定的必要条件之一。

2.6.3 相似度评价

色谱峰代表样品中所含成分的种类,而峰面积代表成分的含量。所以,通过对共有峰相对面积 A_r 的相似度比较,可以进一步判断所测样品之间产品质量的稳定性。

表1 柳宗元牌蛇鞭酒共有峰的相对保留时间和相对峰面积

α	A_r (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.59	1.79	2.25	1.89	1.90	1.48	1.92	1.58	2.16	2.34	2.01	2.16	2.68
0.74	1.61	1.78	2.12	1.97	2.30	1.58	2.25	1.67	1.76	2.05	2.14	1.86
0.82	1.64	2.18	1.81	1.85	1.54	2.08	2.13	1.59	2.25	1.85	2.00	2.17
0.86	1.89	1.94	2.43	2.26	2.46	2.22	2.11	2.31	2.03	3.06	1.96	2.30
0.89	4.43	4.16	3.19	2.98	2.83	4.73	3.87	3.19	3.93	3.70	3.24	4.84
1	22.23	18.22	23.77	23.30	23.28	24.27	22.27	22.01	22.60	25.64	22.61	22.20
1.06	8.98	8.78	4.87	7.20	4.59	6.87	7.05	5.09	7.96	5.99	8.24	6.45
1.23	21.88	24.74	20.90	23.50	22.63	23.20	22.15	22.48	20.95	21.96	21.68	24.09
1.45	10.37	8.65	11.42	7.20	5.82	7.86	9.05	11.03	7.94	7.29	6.15	7.95
1.51	1.75	1.54	1.98	1.82	2.80	2.04	1.77	1.75	2.24	2.72	2.11	1.68
1.58	5.35	9.86	6.45	5.90	7.53	8.64	6.35	6.70	7.73	5.76	6.55	7.21
1.61	4.46	5.23	3.17	4.40	5.76	3.08	4.69	3.14	5.80	4.23	4.50	7.77
1.63	3.33	2.58	4.11	3.11	4.71	3.94	6.52	4.11	4.84	3.79	3.22	1.89
1.82	6.63	3.49	9.57	8.37	7.69	5.28	4.92	9.55	5.69	6.32	7.95	3.36
1.89	3.68	4.61	2.30	4.24	4.56	2.29	2.83	2.31	1.94	3.63	5.21	3.56

表2 指纹图谱相似度分析结果

样品	样品												对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
S1	1.000	0.977	0.986	0.992	0.978	0.988	0.992	0.987	0.991	0.987	0.987	0.983	0.995
S2	0.977	1.000	0.951	0.973	0.966	0.978	0.977	0.962	0.978	0.962	0.972	0.986	0.980
S3	0.986	0.951	1.000	0.986	0.980	0.983	0.983	0.998	0.982	0.986	0.979	0.964	0.988
S4	0.992	0.973	0.986	1.000	0.993	0.990	0.987	0.988	0.989	0.994	0.998	0.982	0.996
S5	0.978	0.966	0.980	0.993	1.000	0.987	0.986	0.982	0.987	0.992	0.991	0.981	0.993
S6	0.988	0.978	0.983	0.990	0.987	1.000	0.992	0.984	0.994	0.993	0.988	0.985	0.996
S7	0.992	0.977	0.983	0.987	0.986	0.992	1.000	0.985	0.995	0.990	0.986	0.984	0.995
S8	0.987	0.962	0.998	0.988	0.982	0.984	0.985	1.000	0.982	0.983	0.981	0.969	0.991
S9	0.991	0.978	0.982	0.989	0.987	0.994	0.995	0.982	1.000	0.991	0.989	0.987	0.996
S10	0.987	0.962	0.986	0.994	0.992	0.993	0.990	0.983	0.991	1.000	0.992	0.982	0.995
S11	0.990	0.972	0.979	0.998	0.991	0.988	0.986	0.981	0.989	0.992	1.000	0.980	0.994
S12	0.983	0.986	0.964	0.982	0.981	0.985	0.984	0.969	0.987	0.982	0.980	1.000	0.989
对照	0.995	0.980	0.988	0.996	0.993	0.996	0.995	0.991	0.996	0.995	0.994	0.989	1.000

似度在 0.951 以上, 所以可以判断, 本文所采用的 12 个柳宗元牌蛇鞭酒的质量较稳定, 都具有较好的一致性, 且所建立的标准指纹图谱, 即对照指纹图谱比较方法也是有效的。

3 结论

利用优化的色谱条件建立了柳宗元牌蛇鞭酒的石油醚-乙醚提取物的 HPLC 指纹图谱, 通过方法学考察, 该方法稳定可靠, 简便易行。通过对共有指纹峰及其相对保留值和相对峰面积的研究, 比较了 12 个不同批次蛇鞭酒的产品品质差异。结果表明, 12 个批次的蛇鞭酒之间有 15 个共有指纹峰, 各样品色谱图之间的相似度相差不大, 均在 0.951 以上。由于该方法所获得的指纹图谱反映了样品的整体化学组成及其含量分布情况, 可以说明此次研究所采用的 12 个批次的样品质量都很稳定。

参考文献:

[1] Jianwen Zhao, Wenbin Yan, Gaopeng Dai. Development of a validated HPLC method for analysis of astragaloside II, paeonol, and osthole in snake wine[J]. Chromatographia, 2005, 62: 543-546.

- 田润涛, 谢培山. 色谱指纹图谱相似度评价方法的规范化研究(一)[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 40-42.
- Janos Harangi. Chromatographic index-intensity fingerprint: identification of multicomponent samples[J]. Chromatographia, 2008, 68: 77-83.
- M. Urbano Cuadrado, M. D. Luque de Castro, M. A. Gomez-Nieto. Study of spectral analytical data using fingerprints and scaled similarity measurements[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381: 953-963.
- 刘荣霞, 周婷婷, 董婷霞, 等. 建立评价当归质量的 HPLC 指纹图谱分析方法[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(10): 757-760.
- 周建良, 齐炼文, 李萍. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 色谱, 2008, 26(2): 153-159.
- 魏新军, 牛再功, 张浩, 等. HPLC 指纹图谱用于参茸保健酒质量评价的研究[J]. 酿酒科技, 2007, 158(3): 33-35.
- 秦志荣, 许荣年, 余小斌, 等. 色谱指纹图谱在五加皮保健酒质量控制中的应用[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 146-148.
- 魏新军, 孙勋强, 魏倩倩. 保健酒的高效液相色谱指纹图谱分析

(下转第 45 页)

指纹图谱的相似度是指图谱的整体相关性, 把色谱指纹图谱的重叠率和共有峰的峰强度结合起来, 综合了样品的定性信息和定量数据。计算方法有多种, 包括相关系数法和向量夹角余弦法等^[12]。

本文先根据均值法计算出 15 个指纹图谱的共有模式, 并以此作为对照图谱, 再采用夹角余弦法^[13-14]计算所有样品之间的相似度。公式如下, 其中 X_i 表示一个样品各峰的相对峰面积, Y_i 表示另一个样品各峰的相对峰面积, n 为共有峰的数量。

$$\text{夹角余弦} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2 \sum_{i=1}^n Y_i^2}}$$

12 个蛇鞭酒样品的指纹图谱相似度计算结果见表 2。一般情况下, 相似度大于 0.90 即认为相似度良好。从表 2 可知, 12 个不同批次样品的指纹图谱与对照图谱之间的相似度均在 0.980 以上, 各样品指纹图谱之间的相

从表1中可以看出,满足本试验条件的菌株为1号、2号、3号、5号、12号、16号、19号、20号菌株,对这些菌株进行下一步的筛选试验。

2.2.5 生长温度试验

按照1.2.2.5的方法做生长温度试验,结果见表2。

表2 生长温度试验结果

温度 (℃)	菌号							
	1	2	3	5	12	16	19	20
25	+	+	+	+	+	+	+	+
30	++	+	+	++	++	+	++	++
35	++	++	++	++	++	++	++	++
40	+	++	++	++	+	++	++	++

注:“+”表示菌株生长培养基浑浊度低,“++”表示菌株生长培养基浑浊度高。

从表2结果可以看出,1号、5号、12号、19号、20号菌株在30℃条件下生长较好,2号、3号、5号、16号、19号、20号菌株在40℃条件下生长良好,其中5号、19号、20号菌株在30℃、40℃两个温度下均能生长旺盛。因此,选择以上菌株进行下一步的筛选试验。

2.2.6 pH初发酵试验结果

按照1.2.2.5的方法做pH初发酵试验,结果见表3。

表3 pH初始发酵试验结果

pH	菌号							
	1	2	3	5	12	16	19	20
3.5	++	+	+	+	++	++	+	++
4.0	++	++	+	+	++	++	+	++
5.0	+++	++	++	++	+++	+++	+	+++
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
6.5	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++

注:“+”表示菌株生长培养基浑浊度低,“++”表示菌株生长培养基浑浊度高,“+++”表示菌株生长培养基浑浊度较高。

从表3结果可以看出,1号、12号、16号、20号菌株在pH值为3.5~6.0的范围内生长良好,所以选择这4株菌进行下一步的筛选试验。

2.2.7 发酵类型试验

按照1.2.2.6的方法做发酵形式试验,结果见表4。

从表4结果可以看出,符合试验要求的菌株为1号、20号菌株,对这两株菌进行下一步的筛选试验。

2.2.8 糖发酵试验

表4 发酵形式试验结果

项目	试验菌号			
	1	12	16	20
发酵形式	同型发酵	异型发酵	异型发酵	同型发酵

按照1.2.2.7的方法做糖发酵试验,结果见表5。

表5 糖类的发酵试验结果

糖类	菌号	
	1	20
蔗糖	+	+
乳糖	+	+
葡萄糖	+	+
麦芽糖	-	+

注:“+”表示发酵,“-”表示不发酵。

从表5可以看出,1号、20号菌均能发酵蔗糖和乳糖,所以选择这两株作为发酵奶酒的试验菌株。

3 结论

从自然富集菌种发酵的新鲜奶酒发酵醪中分离到乳酸菌20株,以生产需要的实际性能为指标,经过8次筛选试验,最终筛选出2株作为第一次发酵的试验菌株。通过乳酸发酵试验,蛋白质凝固能力明显提高,产酸能力也达到了二次发酵的要求,蛋白质与乳清分离效果良好,乳清的风味及口感均优。说明所选菌种性能达到了预期效果。通过中试生产,生产结果显示,奶酒质量得到了明显的提高。

参考文献:

- [1] 李少英,乌尼.马奶酒中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究[J].内蒙古农业大学学报,2002,(12):59-66.
- [2] A. Butenandt; H. Rembold; Hoppe-Seylers, Z. f. J. Physiol. Chem. 1957, (308): 285-289.
- [3] 沈萍.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [4] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,???
- [5] 王立平,徐杰,云月英,等.蒙古国传统发酵酸马奶中乳杆菌潜在益生特性的研究[J].中国乳品工业,2005,(4):4-5.
- [6] 内村泰,冈田早苗.乳酸菌实验手册(日文版)[M].朝仓书店,1992.

(上接第42页)

- [J].酿酒科技,2005,138(12):80-82.
- [10] 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等.GC-MS法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J].中国酿造,2008,(9):74-76.
- [11] 徐抗震,宋纪蓉,任莹辉,等.色谱指纹图谱在苹果酒质量评价中的应用[J].色谱,2007,25(1):93-95.
- [12] 王玺,王文宇,张克荣.中药HPLC指纹图谱相似性研究的探

- 讨[J].沈阳药科大学学报,2003,20(5):360-362.
- [13] 孙庆雷,林云良,祝贺.HPLC指纹图谱相似度研究[J].化学分析计量,2006,15(6):54-55.
- [14] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等.一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法:向量夹角法[J].药学报,2002,37(9):713-717.