

蟒蛇油 GC 指纹图谱研究

张仲敏¹, 黄国鑫¹, 易宇阳¹, 石书江¹, 冯学轩¹, 苏子仁¹, 曾惠芳^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究蟒蛇油 GC 指纹图谱,为蟒蛇油的行业质量控制提供依据。**方法:**采用气相色谱法,以油酸甲酯为内参照物,采用石英毛细管柱 007-225(0.25 $\mu\text{m} \times 30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$),进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$,检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$,载气流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分流比 20:1,进样量为 1 μL 。对 24 批蟒蛇油进行研究,采用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 对指纹图谱进行了分析;采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004B 对蟒蛇油与棕榈油、花生油、猪油、普通蛇油的指纹图谱进行比较。**结果:**24 批蟒蛇油样品有 9 个共有峰,与蟒蛇油 GC 对照指纹图谱的相似度对比均 >0.998 ,24 批蟒蛇油样品的参照峰的丰度范围在 0.454~0.493。并采用相似度及参照峰丰度区分了蟒蛇油与棕榈油、花生油、猪油、普通蛇油等油脂。**结论:**该方法简便、精密性、重复性、稳定性良好,可作为蟒蛇油的质量评价方法。

[关键词] 蟒蛇油; 气相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0118-05

[doi] 10.11653/syjf2013110118

GC Fingerprint of Python Oil

ZHANG Zhong-min¹, HUANG Guo-xin¹, YI Yu-yang¹, SHI Shu-jiang¹,
FENG Xue-xuan¹, SU Zi-ren¹, ZENG Hui-fang^{2*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510006, China;
2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the fingerprints of python oil by GC and establish the method of standard quality for python oil. **Method:** Methyl oleate was used as the internal standard substance. A Quartz capillary column was used (0.25 $\mu\text{m} \times 30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$). Injector temperature was set at 280 $^{\circ}\text{C}$. FID temperature was 280 $^{\circ}\text{C}$. The carrier gas flow rate is 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Distributory ratio was 20:1. Incoming sample amount was 1 μL . The obtained data was analyzed by computer aided similarity evaluation and cluster analysis software. **Result:** There were 9 common peaks in 24 groups of python oil. The similarity degree between 24 python oil groups and standard python oil was found to be higher than 0.998. The range of abundance of reference peaks in 24 python oil groups was 0.454-0.493. The similarity and reference to the peak abundance distinguish the Python oil and other oil such as palm oil, peanut oil, lard oil and average snake oil. **Conclusion:** The method is simple, accurate, repeatable and reliable, which can be used as a quality control method for Python oil.

[Key words] python oil; GC; fingerprint

蟒蛇油为蟒科动物蟒蛇的脂肪。《本草纲目拾

遗》又叫蟒油,《调疾饮食辨》称为蚺蛇油。蟒蛇油味甘,性平,祛风、解毒、清热润肤,主治风毒癩疾、漏疮、冻疮、烫火伤、皮肤皲裂等皮肤疾患^[1-2]。现代研究发现,蟒蛇油还有延缓皮肤衰老^[3]、抗炎、抗过敏、止痒等^[4]良好的药理作用。

1989 年蟒蛇被列为我国国家一级保护动物。蟒蛇全身是宝^[5],为应对市场的需求,我国先后在广西、云南等地对蟒蛇进行人工养殖^[6],均未成功。

[收稿日期] 20121025(004)

[第一作者] 张仲敏, 硕士研究生, 从事中药新药研究, Tel: 13760735517, E-mail: effidose@hotmail.com

[通讯作者] * 曾惠芳, 主任中药师, 从事中药制剂研究, Tel: 020-36586263, E-mail: zenghuifanggz@ yahoo.com.cn

直到发现海南省地理环境和气候更适合蟒蛇的养殖,并逐渐形成了规模化的蟒蛇人工养殖。因此,大量的蟒蛇油可为中药行业源源不断地提供较好的原料。

海南东盛弘公司是国家批准养殖蟒蛇的厂家之一。由于我国气候和环境等原因,海南东盛弘公司主要养殖物种为缅甸蟒 *Python molurus bivittatus*。目前蟒蛇油的应用越来越广泛,但至今蟒蛇油还没有准确的质量标准。本研究随机选取了缅甸蟒不同个体的油脂 24 批,采用 GC 指纹图谱法^[7-13],成功地将蟒蛇油与其他油脂区分开来,并且将掺杂蟒蛇油检出。本研究收集了该方法简便、准确、可靠,为全面控制蟒蛇油的质量提供了依据。

1 材料

Varian-3900 型气相色谱仪 (FID Detector), Varian Star Chromatography Workstation Version 6.0 数据处理系统, Sartorius BP110S 型分析天平, AB204-N 型电子分析天平 (海特勒-托利多仪器有限公司), HWS24 型电热恒温水浴锅, KQ5200A 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

对照品油酸甲酯 (批号 1360929 50208074), 亚油酸甲酯 (批号 1346150 41408270) 均购自 Fluka 公司。

氮气为高纯氮、氢气和空气均购自广东华明经营商行, 石油醚 (60 ~ 90 °C)、甲醇、氢氧化钠均为分析纯。

蟒蛇油 (编号 S1 ~ S24), 由海南东盛弘公司提供; 棕榈油、花生油、猪油、普通蛇油, 购自鸿泰油脂贸易公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性 采用石英毛细管柱 007-225 (0.25 μm \times 30 m \times 0.25 mm)。程序升温 (起始柱温 50 °C, 保持 1 min, 以每分钟 60 °C 升温至 175 °C, 保持 0.5 min, 再以每分钟 2 °C 升温至 180 °C, 保持 10 min, 最后以每分钟 30 °C 升温至 280 °C, 保持 3 min)。进样口温度 280 °C, 检测器温度 280 °C, 载气为高纯氮气, 流速 0.8 mL \cdot min⁻¹, 分流比 20:1, 进样量 1 μL 。理论塔板数以油酸甲酯计不低于 15 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密移取油酸甲酯、亚油酸甲酯各 0.1 mL, 至 2 mL 量瓶中, 用石油醚稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品 0.15 g, 置具塞试管中, 加 5 mL 石油醚, 摇匀后, 加入 0.5 mol \cdot L⁻¹ 的 CH₃OH-NaOH 溶液 2 mL, 摇匀, 置 50 °C 水浴

锅中, 恒温水浴 30 min, 取出, 静置 10 min。取上清液 0.2 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 至 2 mL 量瓶中, 用石油醚稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 1 号样品, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按 2.1 中所述色谱条件, 连续进样 6 次, 记录其色谱图。以 6 号峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 1 号样品, 精密称取 6 份, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按 2.1 中所述色谱条件进样分析, 以 6 号峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.3%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明该方法具有较好的重复性。

2.4.3 稳定性试验 取 1 号样品, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 中所述色谱条件进样分析, 以 6 号峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明该样品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 蟒蛇油 GC 特征图谱中的特征峰 以 24 批蟒蛇油为研究对象, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按 2.1 中所述色谱条件进样分析, 以油酸甲酯为内参照物, 对保留时间 5 ~ 18 min 的色谱峰进行分析。确定了 9 个共有峰, 指认了 2 个色谱峰, 分别是油酸甲酯 (6 号峰)、亚油酸甲酯 (8 号峰), 色谱图见图 1。

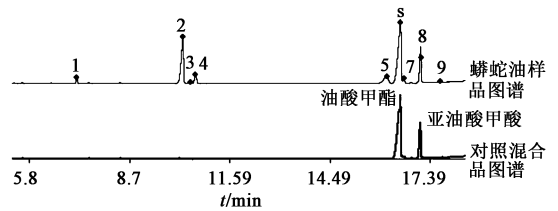


图 1 蟒蛇油 GC 特征图谱

确定油酸甲酯 (6 号峰) 为参照峰并标为 (S), 各特征峰的保留时间与参照峰相比较, 各特征峰的保留面积与参照峰相比较, 计算各特征峰的相对保留时间和相对保留面积, 结果见表 1, 2。

2.6 蟒蛇油特征图谱的分析 对 24 批蟒蛇油进行特征图谱测定, 采用国家药典委员会公布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版) 建立共有模式和生成对照图谱, 见图 2。利用该软件计算相似度^[14], 结果见表 3, 计算 24 批蟒蛇油参照峰丰度, 结果见表 4。

表 1 24 批蟒蛇油共有峰的相对保留时间

No.	峰号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.434	0.618	0.632	0.642	0.974	1.000	1.007	1.038	1.073
2	0.434	0.619	0.633	0.642	0.976	1.000	1.006	1.036	1.071
3	0.433	0.618	0.632	0.641	0.975	1.000	1.006	1.035	1.070
4	0.433	0.619	0.632	0.641	0.976	1.000	1.006	1.035	1.069
5	0.433	0.618	0.631	0.641	0.975	1.000	1.005	1.034	1.068
6	0.433	0.618	0.631	0.641	0.975	1.000	1.005	1.035	1.070
7	0.434	0.619	0.633	0.642	0.976	1.000	1.006	1.036	1.071
8	0.434	0.618	0.633	0.642	0.974	1.000	1.006	1.037	1.071
9	0.434	0.618	0.632	0.642	0.975	1.000	1.006	1.035	1.070
10	0.434	0.618	0.632	0.641	0.975	1.000	1.006	1.036	1.071
11	0.434	0.618	0.632	0.642	0.975	1.000	1.006	1.036	1.070
12	0.434	0.618	0.632	0.642	0.974	1.000	1.007	1.037	1.072
13	0.435	0.619	0.633	0.643	0.975	1.000	1.007	1.037	1.072
14	0.434	0.618	0.632	0.642	0.974	1.000	1.006	1.036	1.071
15	0.435	0.619	0.632	0.642	0.974	1.000	1.006	1.037	1.071
16	0.434	0.619	0.632	0.642	0.976	1.000	1.006	1.036	1.070
17	0.433	0.619	0.632	0.641	0.976	1.000	1.005	1.035	1.069
18	0.434	0.619	0.632	0.642	0.976	1.000	1.006	1.036	1.071
19	0.434	0.618	0.632	0.642	0.974	1.000	1.006	1.036	1.071
20	0.434	0.618	0.632	0.641	0.974	1.000	1.006	1.036	1.071
21	0.435	0.619	0.633	0.643	0.975	1.000	1.007	1.037	1.072
22	0.434	0.618	0.632	0.642	0.976	1.000	1.006	1.035	1.070
23	0.434	0.618	0.632	0.642	0.974	1.000	1.006	1.037	1.071
24	0.433	0.618	0.631	0.641	0.975	1.000	1.005	1.034	1.068
均值	0.434	0.618	0.632	0.642	0.975	1.000	1.006	1.036	1.071
RSD/%	0.123	0.080	0.092	0.095	0.083	0.000	0.059	0.098	0.114

表 2 24 批蟒蛇油共有峰的相对峰面积

No.	峰号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.030	0.500	0.017	0.084	0.158	1.000	0.038	0.280	0.009
2	0.026	0.499	0.010	0.084	0.144	1.000	0.027	0.246	0.004
3	0.025	0.489	0.012	0.086	0.142	1.000	0.023	0.248	0.010
4	0.030	0.547	0.013	0.089	0.158	1.000	0.033	0.278	0.009
5	0.027	0.492	0.010	0.084	0.143	1.000	0.025	0.247	0.010
6	0.026	0.499	0.010	0.084	0.144	1.000	0.027	0.246	0.004
7	0.024	0.478	0.010	0.082	0.142	1.000	0.027	0.248	0.005
8	0.030	0.547	0.013	0.089	0.158	1.000	0.033	0.278	0.009
9	0.023	0.468	0.009	0.080	0.143	1.000	0.026	0.247	0.006
10	0.027	0.467	0.010	0.082	0.142	1.000	0.024	0.248	0.010
11	0.026	0.476	0.010	0.082	0.143	1.000	0.026	0.250	0.010
12	0.027	0.510	0.011	0.086	0.159	1.000	0.035	0.283	0.009
13	0.026	0.504	0.013	0.084	0.156	1.000	0.037	0.282	0.009
14	0.023	0.470	0.010	0.081	0.144	1.000	0.026	0.249	0.010
15	0.026	0.510	0.013	0.085	0.157	1.000	0.036	0.282	0.009

续表 2

No.	峰号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16	0.028	0.511	0.013	0.085	0.156	1.000	0.035	0.282	0.009
17	0.029	0.536	0.014	0.089	0.155	1.000	0.034	0.280	0.009
18	0.025	0.495	0.011	0.081	0.167	1.000	0.035	0.293	0.009
19	0.026	0.516	0.013	0.084	0.161	1.000	0.036	0.282	0.009
20	0.025	0.502	0.012	0.083	0.157	1.000	0.035	0.283	0.009
21	0.027	0.510	0.013	0.084	0.166	1.000	0.036	0.284	0.008
22	0.023	0.471	0.009	0.080	0.143	1.000	0.026	0.249	0.010
23	0.023	0.476	0.010	0.081	0.145	1.000	0.027	0.248	0.010
24	0.025	0.479	0.009	0.082	0.143	1.000	0.024	0.249	0.010
均值	0.026	0.496	0.011	0.084	0.151	1.000	0.031	0.265	0.009
RSD/%	0.047	4.20	5.90	2.40	6.00	0.000	3.90	6.80	5.30

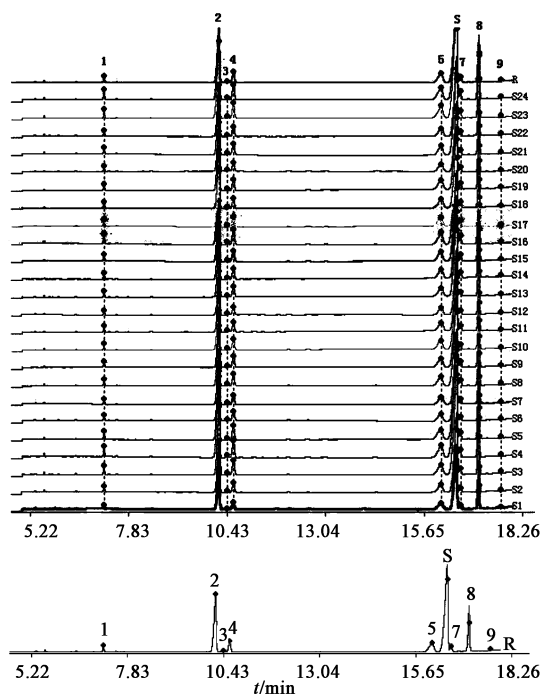


图 2 24 批蟒蛇油的叠加 GC 指纹图谱 (a) 和对照图谱 (b)

表 3 24 批蟒蛇油样品的相似度

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
S1	1.000	S7	1.000	S13	0.999	S19	1.000
S2	1.000	S8	1.000	S14	1.000	S20	1.000
S3	1.000	S9	1.000	S15	1.000	S21	0.999
S4	1.000	S10	1.000	S16	1.000	S22	1.000
S5	1.000	S11	1.000	S17	1.000	S23	1.000
S6	1.000	S12	1.000	S18	1.000	S24	0.999

实验结果显示:24 批蟒蛇油样品 GC 指纹图谱与蟒蛇油 GC 对照指纹图谱的相似度均 > 0.998 , 平

均为 0.999, RSD 0.06%; 24 批蟒蛇油样品的参照峰的丰度范围在 0.454 ~ 0.493。

表 4 24 批蟒蛇油参照峰的丰度

No.	参照峰丰度	No.	参照峰丰度	No.	参照峰丰度	No.	参照峰丰度
S1	0.462	S7	0.492	S13	0.470	S19	0.469
S2	0.482	S8	0.473	S14	0.492	S20	0.473
S3	0.477	S9	0.499	S15	0.470	S21	0.465
S4	0.454	S10	0.481	S16	0.468	S22	0.493
S5	0.484	S11	0.487	S17	0.461	S23	0.492
S6	0.486	S12	0.463	S18	0.469	S24	0.476

2.7 应用

2.7.1 蟒蛇油与其他油脂的区别 蟒蛇油属于油脂类,在生产销售过程中可能与花生油、棕榈油、猪油、普通蛇油等油脂混杂。为了与其他油脂区别,本研究对 4 种其他油脂——花生油、棕榈油、猪油、普通蛇油进行指纹图谱测定。采用国家药典委员会公布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004B 版)建立共有模式,见图 3。利用该软件计算其他油脂与蟒蛇油 GC 对照指纹图谱的相似度,结果见表 5;计算其他油脂参照峰的丰度,结果见表 6。

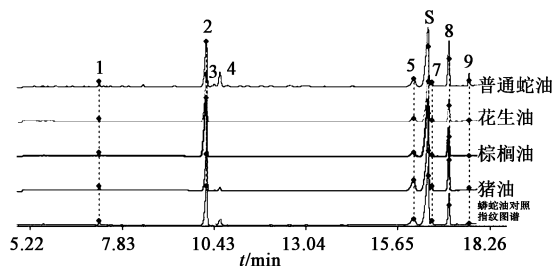


图 3 其他油脂 GC 指纹图谱

结果显示,其他油脂与蟒蛇油 GC 对照指纹图谱比较,花生油、棕榈油、猪油、普通蛇油的相似度在 0.954 ~ 0.977,均 < 0.980;参照峰的丰度也均 < 0.440,不在 0.454 ~ 0.493。因此,可以通过相似度和参照峰丰度,快速准确地将蟒蛇油与其他油脂加以区分。

表 5 其他油脂的相似度

样品	相似度	样品	相似度
花生油	0.960	猪油	0.978
棕榈油	0.957	普通蛇油	0.979

表 6 其他油脂参照峰的丰度

样品	参照峰丰度	样品	参照峰丰度
花生油	0.436	猪油	0.397
棕榈油	0.429	普通蛇油	0.360

3 讨论

蟒蛇油所含脂肪酸的种类繁多,主要包括棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸、花生四烯酸、二十碳三烯酸、二十碳二烯酸、二十二碳四烯酸等^[15-16],并且与其他动植物油脂组成极为相似。虽然各组分所占的比例稍有差别,但很难通过脂肪酸种类和各脂肪酸的含量将蟒蛇油与其他动植物油脂加以区别。因此,本研究采用 GC 特征图谱法鉴别蟒蛇油。

国家标准中规定了动植物油脂脂肪酸甲酯的气相色谱分析法^[17-18],因此,采用 GC 法可准确地反应蟒蛇油脂肪酸的种类与其相对比例,以便于寻找蟒蛇油指纹图谱的特征所在。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件对 24 批蟒蛇油样品指纹图谱进行整理分析,得到 9 个共有峰,蟒蛇油的相似度均 > 0.998,参照峰丰度在 0.454 ~ 0.493,获得了鉴别样品真伪的指标。

对 24 批蟒蛇油的指纹图谱进行分析时,发现蟒蛇油的油酸含量 > 40%,并且油酸甲酯峰稳定、重复性好,因此可将该峰作为参照峰,并计算了 24 批蟒蛇油参照峰丰度和 24 批蟒蛇油的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,其丰度和相似度分别在 0.454 ~ 0.493 和 0.999 ~ 1.000。花生油、棕榈油、猪油、普通蛇油的指纹图谱与蟒蛇油的对照指纹图谱比较,相似度均 < 0.998,参照峰丰度均不在 0.454 ~ 0.493。上述参照峰丰度和相似度可用于鉴别蟒蛇油真伪,包括与普通蛇油区别。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 26 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:408.

[2] 植飞,郑卫平. 蛇油的研究进展[J]. 蛇志,2004,16(1):67.

[3] 任薇,龙彦纲,黄国鑫,等. 精制蟒蛇油延缓皮肤衰老的实验研究[J]. 广州中医药大学学报,2011,28(3):253.

[4] 黄国鑫,任薇,武文,等. 精制蟒蛇油抗炎抗过敏止痒作用的实验研究[J]. 新中医,2010,42(12):119.

[5] 武文,陈志维,卢小凤,等. 蟒蛇的药用价值[J]. 蛇志,2010,22(2):145.

[6] 刘曼红,王木会,陈艳霞,等. 缅甸蟒的人工饲养与繁殖[J]. 野生动物,2010,31(6):319.

[7] 刘强,周莉玲,刘莉. 论“中药皮肤药动学”的构建[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):242.

[8] 周春玲,陈晓辉,毕开顺. GC 法测定鸦胆子中油酸与亚油酸的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(7):996.

[9] 于双慧,陈晓辉,毕开顺. GC 法测定萹澄茄中棕榈酸、油酸与亚油酸的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):1485.

[10] 蔡冰,陈钢,温露,等. 鸦胆子油微囊中油酸与亚油酸含量的气相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(5):1057.

[11] 卢淑君,杨燕云,许亮,等. 气相色谱法测定牛蒡子脂肪油中 3 种脂肪酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):56.

[12] 韩娜,赵建邦,宋平顺. 气相色谱法测定火麻仁中亚油酸及 α -亚麻酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):83.

[13] 张志锋,刘圆,吴春蕾. GC 法测定中药红曲中油酸和亚油酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):23.

[14] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.

[15] 孙陪东,马樱. 蛇油挥发性成分分析和脱星[J]. 分析实验室,2007,26(11):74.

[16] 赵静,陈琦,张立岭,等. 缅甸蟒脂肪酸分析[J]. 四川动物,2009,28(6):899.

[17] 何佩雯,赵海誉,杜钢. 气相色谱技术在中药农药残留检测中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):127.

[18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准委员会. 动植物油脂脂肪酸甲酯的气相色谱分析[S]. 1998:GB/T 17377-2008.

[责任编辑 顾雪竹]