

不同采收期金银花的产地加工方法考察

刘涛¹, 王鸿¹, 李青苗², 寇强¹, 朱红梅¹, 谢敏¹, 冯晶晶¹, 徐玉玲^{1*}

(1. 成都大学生物产业学院, 成都 610106; 2. 四川省中医药科学院 中药研究所, 成都 610106)

[摘要] **目的:**对不同采收时期金银花的最佳产地加工方法的研究。**方法:**以绿原酸、木犀草苷含量综合评分、指纹图谱为指标,对不同采收期、不同产地加工方式的样品进行测定和比较。**结果:**三青期、大白期采收样品梯度烘干法所得药材综合评分最高,二白期采收样品直接烘干法所得药材综合评分最高,三青期、大白期采收样品梯度烘干法所得药材与二白期采收样品直接烘干法所得药材指纹图谱相似度均>0.9,且相似度、主要特征峰峰面积无显著差异。**结论:**三青期、大白期采收的药材最佳产地加工方法为梯度烘干法,二白期采收的样品最佳产地加工方法为直接烘干法,各采收期采用最佳产地加工方法加工,所得金银花药材质量无显著性差异。

[关键词] 金银花; 绿原酸; 木犀草苷; 采收期; 产地加工方法; 指纹图谱

[中图分类号] R24.1;R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100028

Origin Processing Method for Lonicera Japonica Flos from Different Harvest Time

LIU Tao¹, WANG Hong¹, LI Qing-miao², KOU Qiang¹, ZHU Hong-mei¹,

XIE Min¹, FENG Jing-jing¹, XU Yu-lin^{1*}

(1. Chengdu University, School of Biotechnology Industry, Chengdu 610106, China;

2. Sichuan Academy of Medical Science, Institute of Chinese Medicine, Chengdu 610106, China)

[Abstract] **Objective:** To study the best origin processing method of Lonicera Japonica Flos from different harvest time. **Method:** The samples of different harvest time and different processing methods were determined and compared with comprehensive scores and fingerprints of chlorogenic acid and luteoloside contents as the indicators. **Result:** The samples harvested from the third green period and the first white period had highest comprehensive score by gradient drying method. The samples harvested from second white period obtained the highest comprehensive score by direct drying method. The similarity of samples obtained by gradient drying method from the third green period and the first white period as well as the samples obtained by direct drying method from second white period was greater than 0.9 in fingerprints, with no significant differences in similarity and main characteristic peak area. **Conclusion:** The best origin processing method for the samples harvested from the third green period and the first white period was gradient drying method, and the best origin processing for the samples from second white period was direct drying method. There was no significant difference in quality of Lonicera Japonica Flos harvested from the above periods by the best processing methods.

[Key words] Lonicera Japonica Flos; chlorogenic acid; luteoloside; harvest time; origin processing method; fingerprint

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开 放的花,具有清热解毒等功效^[1]。目前我国金银花

[收稿日期] 20150811(007)

[基金项目] 四川省千人计划支持项目(川特聘第332号)

[第一作者] 刘涛,博士,研究员级高级工程师,从事中成药新药开发及再评价工作, Tel:028-61302236, E-mail:liutao0578@sina.com

[通讯作者] *徐玉玲,硕士,高级工程师,从事中成药新药开发及再评价工作, Tel:028-61302236, E-mail:xuyuling@edu.edu.cn

药用植物资源丰富,品种多,供药用的品种达 47 种^[2]。金银花临床作用广泛,主要成分绿原酸对呼吸道病毒有抑制作用,有抗菌抑菌的功效,多用于治疗呼吸道感染^[3],木犀草苷具有肠道致病菌抑制作用、抗氧化作用^[4]。目前,综合考虑产量和质量,金银花二白期至大白期间采收最为适宜^[5],同时因产地采收习惯,三青期也大量被采收,最佳产地加工方法为杀青烘干干燥法^[6],同时其他加工方法也被使用。已有文献^[5-7]对金银花不同采收时期或不同产地加工方式进行研究,并得出最佳采收时期及最佳产地加工方式,但对不同采收期金银花的最佳产地加工方法研究较少,本文以绿原酸、木犀草苷的含量综合评分、金银花指纹图谱为指标,对不同采收期金银花的最佳产地加工方法进行了研究。

1 仪器及试剂

1.1 仪器 1206 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KQ-100E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DZF-6050A 型真空恒温干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司),FA2004 型分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

1.2 试剂 绿原酸(批号 110753-200413),木犀草苷(批号 130418,含量经归一法计算为 98%),均由中国食品药品检定研究院提供;金银花(采收自四川省成都市大邑县金银花药材种植地,经成都大学生物产业学院刘涛研究员高级工程师鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的花蕾);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法及结果

2.1 样品的采收期 金银花应在花开之前采收,通常的采收期为花蕾处于大白、二白及三青期,本试验所用样品采收于成都市大邑县金银花药材种植基地,采收期分别为三青期、二白期、大白期,样品颜色分别为青色、白青色、白色,样品批号分别为 15051201,15051202,15051203。样品采收时间均为 2015-05-12。

2.2 不同产地加工方式的研究

2.2.1 不同的药材加工方法^[5,7-8] (杀青后) 第一法:将金银花平铺于铁盘上置于 60 ℃ 烘箱中至干,铺放厚度为 3 cm,约 10 h。第二法:将金银花平铺于筛网上,铺放厚度为 3 cm,6 h 内温度控制在 30 ~ 35 ℃,后保持 40 ~ 45 ℃,9 h,中间不翻动,最后保持 70 ~ 75 ℃ 至烘干。第三法:将金银花平铺,铺放厚度为 3 cm,放置在阴凉处风干,约 5 d。分别取不同采收时间(分别为大白期、二白期、三青期)的金银

花,对金银花药材进行加工处理见表 1。

表 1 不同加工方法所得金银花样品

Table 1 Comparison of *Lonicera Japonica* Flos from different processing methods

颜色	加工方法	加工后颜色	编号
三青	第一	灰绿	S1
	第二	青	S2
	第三	青	S3
二白	第一	青	S4
	第二	青	S5
	第三	青	S6
大白	第一	黄褐	S7
	第二	黄	S8
	第三	黄	S9

2.2.2 绿原酸及木犀草苷含量测定 参照《中国药典》^[1]2010 年版一部中金银花含量测定项下绿原酸及木犀草苷含量测定方法,对表 1 中的药材 S1 ~ S9 分别进行含量测定;不同采收时间及不同加工方式对绿原酸及木犀草苷含量影响不同,金银花中有有机酸类成分及黄酮类成分对其药效的影响不同,需要用加权得分法对其含量进行评价,结果见表 2。

表 2 不同加工方法及不同采收时间所得样品检测

Table 2 Comparison of *Lonicera Japonica* Flos from different processing methods and different harvest time

编号	绿原酸/%	木犀草苷/%	加权得分
S1	1.52	0.072 12	64.28
S2	2.12	0.071 61	81.11
S3	1.58	0.084 32	69.57
S4	1.79	0.135 70	90.66
S5	1.87	0.118 10	87.74
S6	1.62	0.133 60	85.23
S7	1.33	0.011 20	40.94
S8	1.99	0.022 60	62.98
S9	1.25	0.021 80	41.80

加权得分法公式:

$$y^* = h_0 y_0 / y + h_1 y_1 / y'$$

其中 h_n 为所占权重,代表各成分含量对金银花品质的影响程度,绿原酸所占权重为 $h_0 = 60$,含量为 y_0 ,样品中绿原酸最大含量为 y ,木犀草苷所占权重为 $h_1 = 40$,含量为 y_1 ,样品中木犀草苷最大含量为 y' 。

有报道,金银花药材中绿原酸及绿原酸同分异构体对流感病毒和呼吸道病毒有较强的抑制作用^[9]。且绿原酸对多种细菌均有明显的抗菌和抑菌效果^[10]。目前,金银花中有机酸成分被认为是清热解毒的药理基础,常以绿原酸作为金银花的质量控制指标^[11]。然而用单一化学成分评价金银花质量比较片面,金银花提取物是以绿原酸为主并含有多种其他的黄酮类物质,黄酮类物质也具有抗菌消炎及显著的抗氧化特性^[3]。因此笔者将绿原酸权重定为 60%,木犀草苷权重 40% 来对工艺进行综合评价。

由加权得分综合评分得,相同采收时期的样品加权得分最高的分别为 S2, S4, S8, 即采收时期为三青期、大白期的金银花样品产地加工适宜采用梯度烘干法,采收时期为二白期的金银花样品产地加工应采用直接烘干法。

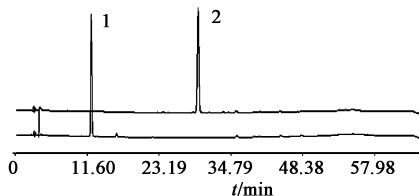
2.3 金银花药材指纹图谱检测^[12]

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序为 0 ~ 50 min, 20% ~ 60% A; 50 ~ 60 min, 60% A; 60 ~ 70 min, 60% ~ 20% A; 流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长 225 nm;柱温 35 °C;进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取不同干燥方式的金银花药材细粉约 0.2 g,精密称定,于具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,超声(功率 250 W,频率 35 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 金银花 HPLC 指纹图谱的建立 将对照品溶液按以上色谱条件分析,确定对照品位置,见图 1。将 9 批不同加工方法的样品,按上述条件进行分析,在“中药指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件中,进行时间窗的设定、谱峰匹配,其中有 18 个



1. 绿原酸; 2. 木犀草苷

图 1 对照品溶液 HPLC

Fig.1 HPLC of control solution

峰可作为金银花指纹图谱的共有特征峰,见图 2。

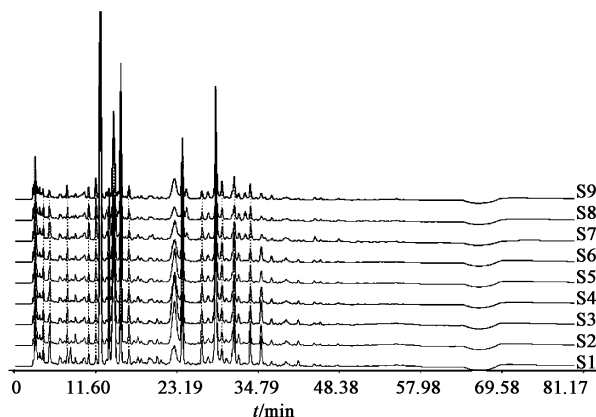


图 2 9 种不同采收时间及加工方法下金银花的 HPLC

Fig.2 HPLC atlas of Lonicera Japonica Flos from 9 different processing methods and different harvest time

2.3.5 不同采收期最佳产地加工方法所得药材的指纹图谱比较

2.3.5.1 相似度比较 计算不同采收时期最佳产地加工方式下的金银花样品 S2, S4, S8 的相对保留值指纹图谱数据、相似度,结果见表 3。

表 3 同一采收时期最佳加工方法下金银花的相似度

Table 3 Similarity of Lonicera Japonica Flos from best processing method at same harvest time

编号	S2	S4	S8	均值	T ₂	T ₄	T ₈
S2	1.000	0.976	0.916	0.964	0.832	0.277	1.109
S4	0.976	1.000	0.915	0.964	0.281	0.829	1.111
S8	0.916	0.915	1.000	0.944	0.567	0.588	1.155

根据判定“可疑值”能否舍弃的 Smirnov 法,判定同一采收时期最佳加工方法下的样品的相似度 T_i 是否为可疑值,应该舍弃不用。

$$T_i = | (X_i - \bar{X}) | S$$

式中 X_i 为可疑值, X 为包括可疑值在内的平均数, S 为标准差。

查询 Smirnov 法附表, n = 3 时, T_i > 1.412 表明有显著性差异,而表 3 中 T_i 值均 < 1.412, 且金银花样品指纹图谱相似度均 > 0.9, 说明不同采收时期的金银花内在质量的相对稳定, 且不同采收时期最佳产地加工方法下的样品差异较小。

2.3.5.2 主要峰峰面积比较 以峰面积适中的绿原酸峰面积为参照峰, 计算 S2, S4 及 S8 样品主要共有峰的相对峰面积, 结果见表 4。

按 2.3.5.1 项下 Smirnov 公式计算, 表 4 中 T_i' 均 < 1.412, 所以均不可舍弃不用, 即不同采收期最佳产地加工方法下的样品特征峰峰面积相差不

表 4 同一采收时期最佳加工方法下金银花的相对峰面积
Table 4 Relative peak area of *Lonicera Japonica* Flos from best processing method at same harvest time

No.	t_R /min	S2	S4	S8	均值	T_2'	T_4'	T_8'
1	3.034	0.079	0.089	0.111	0.093	0.857	0.242	1.099
2	12.294	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-
3	13.523	0.095	0.109	0.039	0.081	0.382	0.753	1.135
4	14.210	0.347	0.376	0.404	0.375	1.003	0.006	0.997
5	15.219	0.222	0.126	0.567	0.305	0.358	0.772	1.130
6	22.888	0.317	0.230	0.000	0.183	0.822	0.292	1.113
7	23.994	0.514	0.252	0.320	0.362	1.119	0.808	0.311
8	26.789	0.059	0.055	0.031	0.048	0.704	0.441	1.145
9	28.763	0.436	0.383	0.321	0.380	0.975	0.049	1.024
11	31.400	0.118	0.121	0.046	0.095	0.536	0.617	1.154

大,考虑产量和质量收益,因而采收时期不用刻意分开大白、二白、三青金银花,只注意对新鲜的药材采用相应的最佳产地加工方法即可。

3 讨论

目前金银花的产地加工方法研究中,多以某一采收期(大白或二白或三青期)采收的样品,对其产地加工方法进行了研究,从而得出金银花的最佳产地加工方法,而没有考虑到不同采收期的金银花药材的性质差异,而笔者认为不同采收时期的药材性质各异,其产地加工方法也应不同,本课题研究了不同采收期采收的药材的最佳产地加工方法应有不同产地加工方法,以绿原酸、木犀草苷含量为指标,以综合评分为依据得出三青期、大白期样品最适宜产地加工方法为梯度烘干法,二白期样品最佳产地加工方法为直接烘干法。

从研究结果中可以看出,不同采收期的药材中的次生代谢物绿原酸和木犀草苷含量并不一定同时达到峰值,因此,应根据金银花临床用途确定金银花的采收时间,一般认为,绿原酸具有呼吸道抑菌、呼吸道抗病毒、止血、利胆保肝等作用,因此,在临床治疗外感发热、呼吸道病毒感染、肝脏等疾病时应在三青期采收,木犀草苷具有肠道致病菌抑制作用、抗氧化作用,在临床治疗肠道疾病时,应在二白期采收,并采用最相应的产地加工方法。

加权综合评分是对多种因素综合影响进行处理的一种常用方法,其关键在于权重系数的确定,本研究根据金银花在临床的功能主治,结果文献报道

绿原酸及木犀草苷的药效综合进行评定,确定了其权重系数为 60:40,笔者曾经参考相关文献^[13]选择二者的权重比为 50:50,计算结果对论文结论无影响。

以指纹图谱相似度及主要峰的峰面积为指标,对不同采收期通过最佳产地加工方法所得到的药材进行评价,发现不同采收期的样品的相似度均 > 0.9,相似度及主要特征峰相对峰面积均无显著性差异,说明不同采收期的金银花经最佳产地加工后所得的药材品质差异较小,因此采收或购买时不必过分强调采收期对产品质量的影响。

[参考文献]

[1] 国药药典委员会. 中国人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:28,205.

[2] 张重义,李萍. 金银花药材的综合研究[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(3):58-62.

[3] 胡克杰,王跃红,王栋. 金银花中氯原酸在体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中医药信息,2010,27(3):27-28.

[4] 陈继明,洪超群. 金银花药理作用分析[J]. 亚太传统医药,2015,11(5):43-44.

[5] 彭菊艳. 采收时间和加工方法对金银花品质的影响[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2006.

[6] 宋健,张会敏,石俊英. 金银花最佳产地加工方法—杀青烘干干燥法[J]. 中药材,2008,31(4):489-491.

[7] 王淑美,崔永霞,吴明侠,等. GAP 基地金银花产地加工方法的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1061-1063.

[8] 司晓萍,宋辉. 浅析金银花质量的影响因素[J]. 时珍国医国药,2005,16(8):785-786.

[9] 宋健,张会敏,郭承军,等. 金银花抗流感病毒活性成分峰的化合物归属研究[J]. 中成药,2011,33(6):1017-1021.

[10] 王宏军,吴国娟,李焕荣,等. 金银花中绿原酸提取方法的筛选及其抑菌作用[J]. 北京农学院学报,2003,18(4):262-265.

[11] 张守平,辛宁,王柳萍. 金银花化学成分及质量控制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(3):84-86.

[12] 刘涛. 热毒宁注射液质量再评价研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007.

[13] 闵春艳,游本刚,许琼明,等. 正交试验比较金银花药材中绿原酸与木犀草苷的乙醇提取工艺[J]. 中成药,2011,33(10):1815-1818.

[责任编辑 邹晓翠]