

不同干燥方法对番红花去柱头花朵化学成分及抗氧化活性的影响

李雪¹, 谭瑾², 张定堃¹, 李芳琼², 杨惟敬¹, 杨婷¹, 吴京³, 裴瑾^{1*}, 马鸿雁^{1*}

1. 成都中医药大学 药学院西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 好医生药业集团有限公司, 四川 绵阳 622651

3. 贵阳新奇微波工业有限责任公司, 贵州 贵阳 550018

摘要: 目的 研究热风 40、50、60 °C 干燥, 微波和冷冻 5 种不同干燥方法对番红花 *Crocus sativus* 去柱头花朵品质和成分的影响, 以期开发出干燥效果好、效率高、成本低的产地加工方式。方法 采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 对不同干燥方法番红花去柱头花朵物质基础进行对比, 并结合主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares method-discriminant analysis, OPLS-DA) 进行差异分析; 采用 UHPLC-MS/MS 法同时测定 4 种差异黄酮类化合物含量; 利用抗氧化试剂以评价不同干燥方法番红花去柱头花朵体外抗氧化活性。结果 利用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 从 5 种干燥方法番红花去柱头花朵中共鉴定出 59 个共有化合物, 包括 1 种生物碱、6 种有机酸、11 种氨基酸、2 种核苷、33 种黄酮、5 种萜类、1 种香豆素类成分。PCA 表明, 不同干燥方法番红花去柱头花朵中化学成分存在差异; OPLS-DA 筛选出 14 个共有差异化合物, 以黄酮类和氨基酸类化合物为主。UHPLC-MS/MS 定量分析结果表明, 不同干燥方法番红花去柱头花朵中的山柰酚、山柰酚 3-O-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素 3-O-葡萄糖苷含量存在差异, 以微波干燥样品中槲皮素含量最高, 为 (63.07±2.69) μg/g。不同干燥方法样品均表现出抗氧化活性, 以微波干燥效果最为显著。结论 不同干燥方法明显影响番红花去柱头花朵的品质。热风干燥和冷冻干燥存在不同程度破坏番红花去柱头花朵内部结构的问题, 且热风干燥过程有效成分易被氧化, 其自身的抗氧化活性降低。微波干燥番红花去柱头花朵的色泽、总黄酮含量、体外抗氧化能力都具有显著优势, 可考虑作为番红花去柱头花朵的产地加工的首选干燥方法, 以支撑番红花去柱头花朵进一步的综合利用。

关键词: 番红花; 花朵; 干燥工艺; 抗氧化; 热风干燥; 微波干燥; 冷冻干燥; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 香豆素; 山柰酚; 槲皮素; 色泽

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4386-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.011

Effects of different drying methods on chemical composition and antioxidant activity of *Crocus sativus* flowers without stigma

LI Xue¹, TAN Jin², ZHANG Dingkun¹, LI Fangqiong², YANG Weijing¹, YANG Ting¹, WU Jing³, PEI Jin¹, MA Hongyan¹

1. State Key Laboratory of Characteristic Chinese Drug Resources in Southwest China, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Good Doctor Pharmaceutical Group Co., Ltd., Mianyang 622651, China

3. Guiyang Xinqi Microwave Industry Co., Ltd., Guiyang 550018, China

Abstract: Objective The effects of five drying methods of hot air drying at 40, 50, 60 °C, microwave drying and vacuum freeze-drying on the quality and composition of Fanhonghua (*Crocus sativus*) flowers without stigma were studied in order to develop a production and processing method of flowers with good drying effect, high efficiency and low cost. **Methods** UPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to compare the material basis of flower samples by different drying methods. At the same time, principal component

收稿日期: 2023-12-06

基金项目: 四川省科技支撑项目 (2020YFN0082)

作者简介: 李雪, 女, 硕士, 从事中药质量与评价研究。E-mail: 2436388323@qq.com

*通信作者: 马鸿雁, 女, 博士, 副教授, 主要从事中药化学与分析研究。E-mail: microelements@sina.com

裴瑾, 女, 博士, 教授, 主要从事中药品质评价与资源研究。E-mail: peixjin@163.com

analysis (PCA) and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) were combined to evaluate the quality of flowers with different drying methods and screen and identify the differential compounds. The contents of four different flavonoids were determined by UHPLC-MS/MS method. The antioxidant activity of flowers of *C. sativus* without stigma *in vitro* was evaluated by using antioxidant kits. **Results** A total of 59 common compounds, including one alkaloid, six organic acids, 11 amino acids, two nucleosides, 33 flavonoids, five terpenoids and one coumarin, were identified from dried flower samples by five drying methods using UPLC-Q-Orbitrap HRMS. PCA showed that there were differences in the chemical composition of flowers under different drying methods. A total of 14 differential compounds were identified by OPLS-DA, mainly flavonoids and amino acid compounds. UHPLC-MS/MS quantitative analysis showed that the contents of kaempferol, kaempferol 3-*O*-glucoside, quercetin and quercetin 3-*O*-glucoside in flower samples by different drying methods were different to some extent. The content of quercetin by microwave drying samples was the highest (63.07 ± 2.69) $\mu\text{g/g}$. The samples by different drying methods showed antioxidant activity, among which microwave drying was the most significant. **Conclusion** Different drying methods significantly affected the quality of flowers of *C. sativus* without stigma. Hot air drying and freeze drying have the problem of destroying the internal structure of flowers to varying degrees, and the active ingredients are easy to be oxidized during the hot air drying process, and the antioxidant capacity of the flowers is reduced. Microwave dried flowers have significant advantages in color, total flavonoid content, and *in vitro* antioxidant capacity, which can be considered as the preferred drying method for the processing of flowers in the production area to support the further comprehensive development and utilization of flowers without stigma.

Key words: *Crocus sativus* L.; flowers; drying process; antioxidant; hot air drying; microwave drying; freeze drying; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; coumarin; kaempferol; quercetin; colour and lustre

番红花 *Crocus sativus* L. 为鸢尾科番红花属球根类草本植物, 又名藏红花, 原产于伊朗、西班牙、印度等国家, 经西藏传入中国^[1], 是名贵中药材的典型代表。番红花入药部位特殊, 在实际使用过程中是指每朵番红花中雌蕊顶端的 3 根深红色柱头, 具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神的功效^[2]。然而, 柱头完全靠人工采收, 产量极低, 约 90 朵花能得到 1 g 左右的干燥柱头^[3], 剩余 93% 的番红花去柱头花朵副产物常作为肥料、饲料或被丢弃, 造成极大的资源浪费。番红花去柱头花朵中的化学成分复杂, 包括黄酮类、酚酸类、苷类、多糖、萜类等, 其中以黄酮类为主^[4]。

现代研究表明, 番红花花朵具有抗氧化作用^[5]、抗真菌作用^[4]、缺血-再灌注损伤保护作用^[6]以及肝肾保护作用^[7]等。前期研究发现, 番红花去柱头花朵提取物具有较好的抗氧化作用, 是优异的天然抗氧化剂, 可在食品、日化品中应用, 极具开发价值。然而, 花朵在综合开发过程中面临着“难干燥、难保存、易变质”等关键技术问题。另一方面, 花朵的物质基础研究薄弱, 不利于花朵的综合开发利用^[8]。因此, 本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-orbitrap HRMS) 技术结合多变量模式识别方法主成分分析 (principal component analysis, PCA) 与正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal projections to latent structures-

discriminant analysis, OPLS-DA) 以及三重四极杆液质联用技术 (UHPLC-MS/MS) 对花朵在不同干燥方法下进行系统评价, 为阐明不同干燥方法花朵物质基础种类、含量和抗氧化活性的差异提供参考, 也为建立规范的花朵干燥方法提供数据支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Vanquish 型超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 液相: 日本岛津公司; 质谱: 美国 AB Sciex 公司; Thermo Scientific Accucore™ C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 3 mm, 2.6 μm , 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SpectraMaxiD3 型多功能酶标仪, 美谷分子仪器上海有限公司; KQ-500DE 型超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; BT25S 型十万分之一分析天平, 德国 Sartorius 公司; CR-400 型色彩色差计, 日本柯尼卡美能达株式会社; MB25 型水分测定仪, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; WBZ-25TXL 型微波干燥机, 贵阳新奇微波工业有限责任公司; Scientz-30N 型冷冻干燥机, 成都壹科医疗器械有限公司; JC-9030A 型热风干燥机, 青岛精诚仪器仪表有限公司。

1.2 材料

番红花去柱头花朵于 2022 年 10 月由好医生集团提供, 经成都中医药大学药学院西南特色中药资

源国家重点实验室的裴瑾教授鉴定为鸢尾科番红花属植物番红花 *Crocus sativus* L.的去柱头花朵。

对照品芦丁(批号 AZ21080201)、槲皮素(批号 AF20032451)、山柰酚(批号 AF20051712)、异鼠李素(批号 AF20111816)、西红花苷 I(批号 AF22021502)、西红花苷 II(批号 AF21021056)、山柰酚 3-O-葡萄糖苷(批号 AFCC0703)、槲皮素 3-O-葡萄糖苷(批号 AZ21080601)、槲皮素 3-O-槐糖苷(批号 AFCC1405)、山柰酚 7-O-葡萄糖苷(批号 AFCC1407), 均购自成都埃法生物科技有限公司; 对照品苦番红花素(批号 DSTDK001401)、山柰酚 3-O-芸香糖苷(批号 DSTD007501) 均购自乐美天医药/德思特生物技术有限公司; 所有对照品质量分数均 > 98%。羟基自由基清除试剂盒(批号 BC1320)、DPPH 自由基清除试剂盒(批号 BC4755)、

ABTS 自由基清除试剂盒(批号 BC4775) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 水为超纯水, 甲醇、甲酸、乙腈、乙醇为色谱级。

2 方法与结果

2.1 样品干燥

将鲜花朵分成 5 份, 每份 500 g, 分别进行热风干燥(40、50、60 °C)、微波干燥和冷冻干燥, 以花朵含水量低于 13%为干燥标准^[2]。热风干燥组: 将花朵分别置于 40、50、60 °C 的鼓风式恒温干燥箱中干燥 4 h; 真空冷冻干燥组: 先在 -20 °C 冰箱中预冻 2 h, 于真空冷冻干燥机(真空度 6.0 Pa; 冷阱温度 -60 °C)干燥 10 h; 微波干燥组: 于微波干燥机(60 °C, 真空度 -0.080 ~ -0.095 MPa, 冷却水温度 40 °C)干燥 54 min。干燥后, 外观形状见图 1。将样品用打粉机打碎成细粉, 过 50 目筛后室温保存于干燥器中。



图 1 不同干燥方法番红花去柱头花朵外观性状

Fig. 1 Appearance characters of *C. sativus* flowers without stigma by different drying methods

2.2 含水量测定

分别精密称取 5 种干燥方法下的花朵粉末 2 g 于水分测定仪的样品盘中, 均匀平铺, 水分测定仪自动测定不同干燥方法样品粉末样品的含水率。不同干燥方法的花朵样品的含水率有所不同。从高到低, 5 种干燥方法的花朵粉末含水率依次为热风 40 °C 干燥 (10.83 ± 0.12) %、热风 50 °C 干燥 (9.56 ± 0.21) %、微波干燥 (9.40 ± 0.14) %、热风 60 °C 干燥 (5.88 ± 0.17) %、冷冻干燥 (4.46 ± 0.11) %。5 种干燥方法均满足《中国药典》2020 年版中花类药材干燥含水量要求。冷冻干燥样品含水量较低, 但存在干燥耗时长、效率低、易吸潮等问题, 且干燥后的样品质地易碎, 不利于保存花朵完整形态。

2.3 色泽测定

以 $L^*=100$ 、 $a^*=0$ 、 $b^*=0$ 为参照校正色, 经校准后, 分别取 5 种不同干燥方法处理的去柱头花朵干燥品(图 1)测得各样品的 L^* 、 a^* 、 b^* 、 ΔE^* 。 a^* 值的正、负代表红色、绿色, b^* 值的正、负代表黄色、蓝色, ΔE^* 代表着总色差, 数值越大表示与白板

相比色差越大^[9]。鲜品色泽测定结果分别为 $L_0^*=27.03 \pm 0.06$ 、 $a_0^*=22.10 \pm 0.02$ 、 $b_0^*=-21.48 \pm 0.01$, 不同干燥方法的去柱头花朵样品颜色测定结果见表 1, 总色差 (ΔE^*) 按照公式计算。

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]$$

使用 SPSS 26.0 中“单因素 ANOVA 检验”进行

表 1 不同干燥方法下番红花去柱头花朵颜色测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Color determination results of *C. sativus* flowers without stigma under different drying methods ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

干燥方法	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
热风 40 °C	9.47 ± 0.02	12.19 ± 0.03	-15.17 ± 0.05	21.13 ± 0.07 ^a
热风 50 °C	5.82 ± 0.08	16.05 ± 0.46	-19.04 ± 0.77	22.19 ± 0.11 ^a
热风 60 °C	1.96 ± 0.18	17.17 ± 0.24	-18.27 ± 0.06	25.75 ± 0.17 ^c
微波干燥	11.95 ± 0.13	15.58 ± 0.44	-18.46 ± 0.27	16.71 ± 0.28 ^b
冷冻干燥	14.75 ± 0.15	15.37 ± 0.55	-18.17 ± 0.11	14.39 ± 0.45 ^b

同列字母不同代表具有显著差异 ($P < 0.05$); 表 5、6 同。

Different letters in the same column mean significant differences ($P < 0.05$); same as tables 5 and 6.

组间分析,方差不齐,再采用“非参数检验”进行成对比较。由表1可知,热风60℃干燥样品的 ΔE^* 值最大为 25.75 ± 0.17 ,与其他4种方式存在显著差异($P < 0.05$),与同等温度下的微波干燥($\Delta E^* = 16.71 \pm 0.28$)相比,样品颜色加深明显,这一结果可能说明高温长时间干燥有加重去柱头花朵的褐变的趋势。微波干燥($\Delta E^* = 16.71 \pm 0.28$)和冷冻干燥($\Delta E^* = 14.39 \pm 0.45$)样品色泽不存在显著差异,但冷冻干燥效率低、成本高、样品不易保存,不适用于大规模生产使用。

2.4 基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS的化学成分分析

2.4.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品苦番红花素、槲皮素3-O-槐糖苷、芦丁、槲皮素3-O-葡萄糖苷、山柰酚3-O-芸香糖苷、山柰酚3-O-葡萄糖苷、山柰酚7-O-葡萄糖苷、西红花苷I、山柰酚、槲皮素和异鼠李素适量于10 mL量瓶中,加入适量50%乙醇,超声(300 W、50 kHz)溶解后并定容,过0.22 μm 微孔滤膜,供UPLC-Q-Orbitrap HRMS检测分析。

2.4.2 供试品溶液的制备 参考《中国药典》2020年版一部西红花含量测定制备方法。精密称取5种干燥方法下的去柱头花朵粉末2 g,置于具塞三角瓶中,加入50%乙醇100 mL,冰浴中超声(300 W、50 kHz)提取20 min,静置,补足缺失的质量,摇匀,过0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 使用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱对样品进行分析。流动相为0.1%甲酸水溶液-甲醇,梯度洗脱程序:0~11 min,5%~35%甲醇;11~18 min,35%~55%甲醇;18~22 min,55%~75%甲醇;22~24 min,75%~90%甲醇;24~25 min,90%~100%甲醇;25~30 min,100%甲醇;柱温50℃;体积流量0.3 mL/min,进样量5 μL 。

2.4.4 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,喷雾电压+3.5 kV/-3.0 kV,辅助气加热温度350℃,鞘气流速35 arb,辅助气流速10 arb,离子传输管温度320℃。扫描模式为一级质谱全扫描结合自动触发二级质谱扫描模式(full MS/dd-MS²),一级分辨率35 000,二级分辨率17 500,离子扫描范围 m/z 50~1 500,碰撞能量梯度为20、40、60 eV。

2.4.5 化学成分鉴定 将采集得到的原始数据导入Compound Discoverer 3.0软件进行峰对齐和峰提

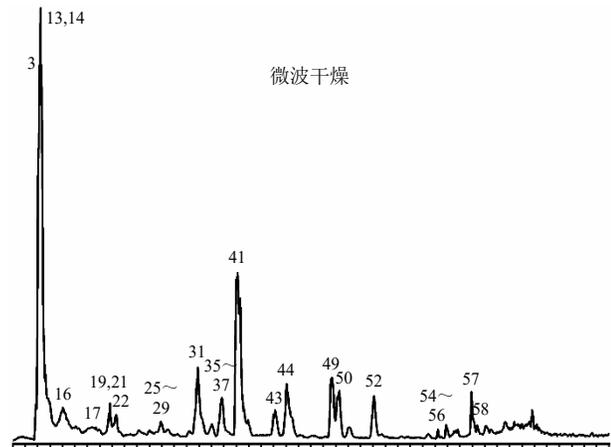
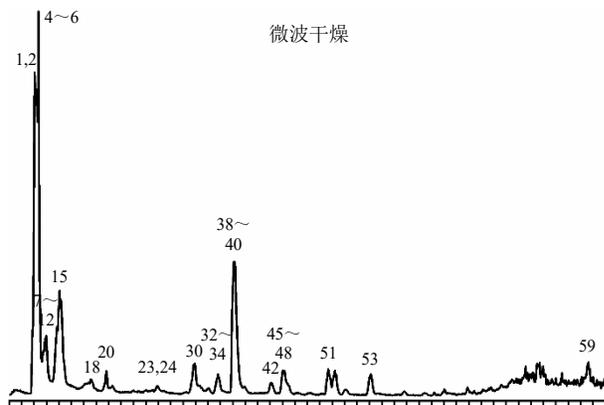
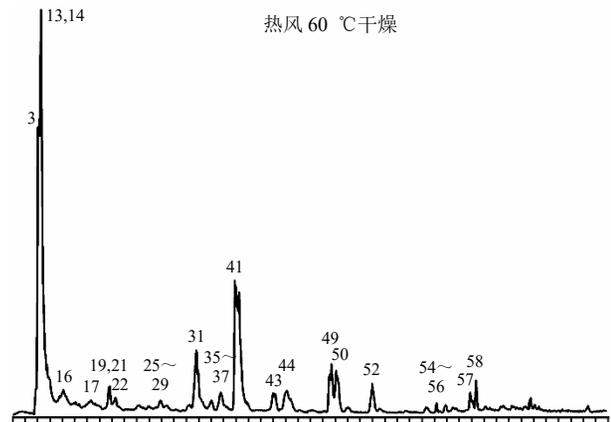
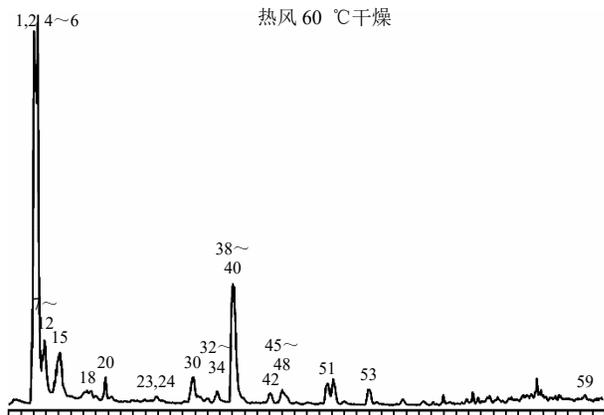
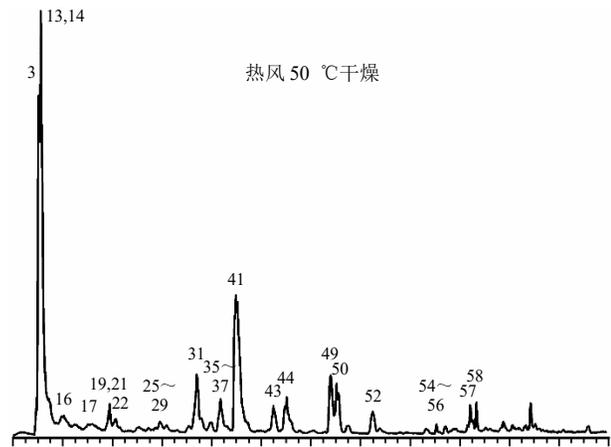
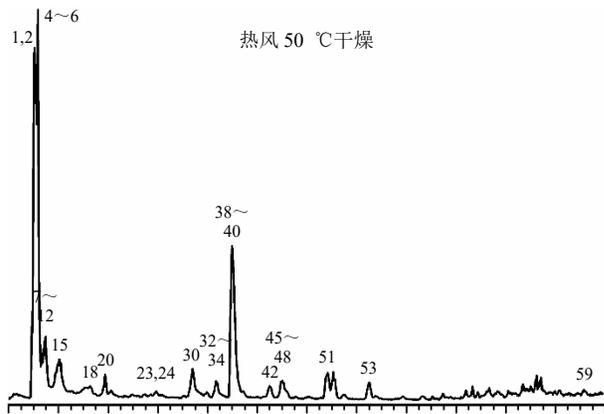
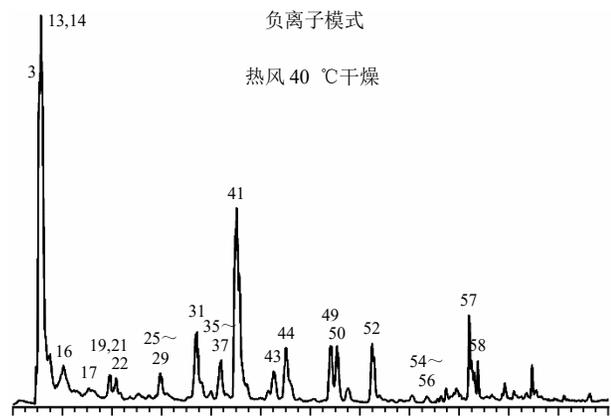
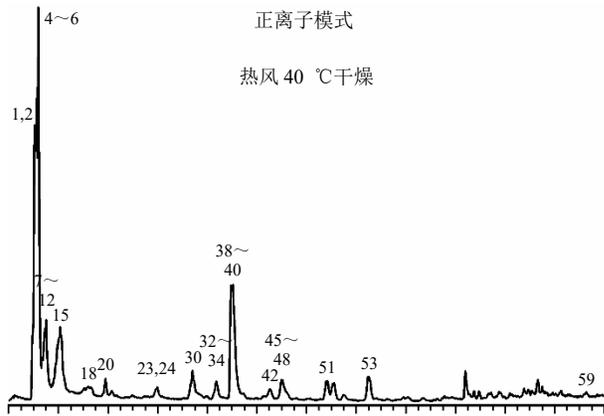
取。利用提取得到的分子离子色谱峰、同位素峰拟合出可能的分子式,并将二级碎片实测谱图与mzCloud网络数据库及mzVault数据库进行匹配。设置匹配结果过滤参数为一级及二级质量偏差 1×10^{-5} ,匹配度分值高于80。

对滤过后的离子与数据库中的化合物信息及对照品进行比对,结合相关文献和在线数据库(PubChem、Human Metabolome Database、CNKI)对化学成分进一步分析鉴定。在正、负离子模式下,对照品溶液和供试品溶液的总离子流图如图2所示。从5种不同干燥方法的样品中共鉴定出59个共有化合物,包括1种生物碱、6种有机酸、11种氨基酸、2种核苷、33种黄酮、5种萜类、1种香豆素类成分。各成分的保留时间、质谱信息和结构鉴定见表2。

2.4.6 差异化合物分析 以共有峰的峰面积为变量,利用SIMCA-P 14.1进行PCA、OPLS-DS,结果如图3。PCA结果表明,不同干燥方法被分为4组,其中热风60℃干燥和冷冻干燥样品为1组,热风40℃干燥、热风50℃干燥、微波干燥样品各为1组。热风50℃干燥和微波干燥在PC2方向上的间距较大,说明这2组样品的成分含量存在差异。4组组内样本间的离散均较小,表明组内均一性良好。不同干燥方法对番红花去柱头花朵化学成分的含量具有影响。

利用SIMCA-P 14.1将热风40℃干燥、热风50℃干燥、热风60℃干燥、冷冻干燥组分别与冷冻干燥组进行OPLS-DA和S-plot分析,并以 $VIP > 1$ 和 $|p_{\text{corr}}| > 0.58$ 为标准筛选出显著差异化合物^[23],结果见图4。由OPLS-DA得分图可知,各组OPLS-DA模型均表现出更明显的分离趋势。OPLS-DA模型验证结果中各组参数指标均大于0.85且 $Q^2 > 0.9$,说明模型构建良好,预测性可靠。

散点得分图(S-plot)可以表示组间的差异成分,数据点离原点越远,则该变量对样本分组差异的贡献越大。由S-plot图可知,共筛选出个14个差异化合物(表3)。热风40℃干燥-冷冻干燥筛选出8种差异化合物,其中上升的化合物只有山柰酚;下降的化合物有7种,其中黄酮类化合物有2种,分别是山柰酚3-O-葡萄糖苷和槲皮素,其余以氨基酸类化合物为主。热风50℃干燥-冷冻干燥筛选出9种差异化合物,其中上升的化合物有2种,分别是脯氨酸和苯丙氨酸;下降的化合物有7种,其中山柰



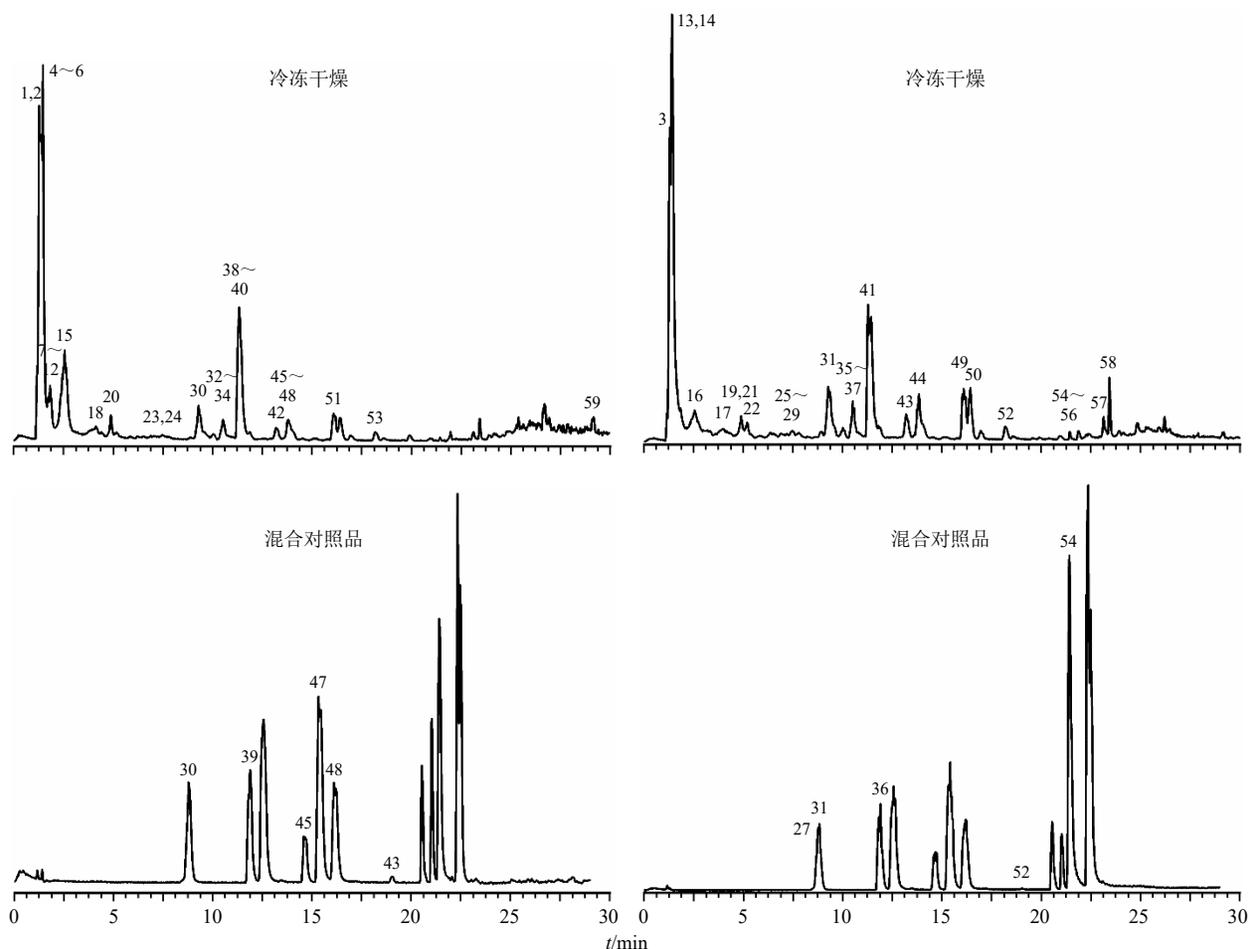


图2 混合对照品和5种不同干燥方法去柱头花朵粉末UPLC-Q-Exactive MS正、负离子模式的总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagram of UPLC-Q-Exactive MS of mixed reference powder and *C. sativus* flowers powder without stigma by five different drying methods in positive and negative ion

酚 3-*O*-葡萄糖苷和槲皮素包含其中。热风 60 °C 干燥-冷冻干燥筛选出 10 种差异化合物，其中上升的化合物有 5 种，山柰酚包含其中；下降的化合物有 5 种，包括山柰酚 3-*O*-葡萄糖苷和槲皮素。冷冻干燥-微波干燥筛选出 8 种差异化合物，其中上升的化合物有 4 种，以氨基酸类化合物为主；下降的化合物有 4 种，包括山柰酚、山柰酚 3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素和精氨酸。5 种不同干燥方法的共有差异化合物由黄酮类和氨基酸类化合物组成。研究表明^[4]，黄酮类化合物是的花朵的主要物质基础及药效成分，而氨基酸类化合物的功效作用未有明确报道。因此，山柰酚、山柰酚 3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素 3-*O*-葡萄糖苷等黄酮类化合物可进行进一步定量分析。

2.5 4种黄酮类化合物含量测定

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷对

照品适量于 5 mL 量瓶中，加入 50%乙醇适量，超声（300 W、50 kHz）溶解后定容，配置成质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品储备溶液，用稀乙醇连续稀释对照品储备溶液，制得一系列质量浓度的工作标准溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 参考《中国药典》2020 年版西红花含量测定制备方法。精密称取 5 种干燥方法下的去柱头花朵粉末 0.1 g，置于具塞三角瓶中，加入 50%乙醇 100 mL，冰浴中超声（300 W、50 kHz）提取 20 min，静置，补足减失的质量，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.5.3 UHPLC-MS/MS 仪器及分析条件 UHPLC-MS/MS 分析采用 Nexera UHPLC LC-30A/QTRAP 5500+ MS/MS 系统，配备电喷雾电离（ESI）源（AB Sciex）。温度为 40 °C，流动相为 0.2%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0.01~2 min，5%~25%乙腈；2~9 min，25%~50%乙腈；9~14 min，50%~80%乙

表2 花朵与柱头中的共有化学成分

Table 2 Common compounds of flowers and stigmas identified

编号	<i>t</i> _R / min	化合物名称	分子式	离子类型	准分子 离子	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	成分分类
1	1.230	组氨酸 ^[10]	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	156.076 63	-1.19	156.076 75, 110.071 56, 95.060 84, 83.060 93	氨基酸类
2	1.295	赖氨酸 ^[10]	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	147.112 53	-1.84	130.086 41, 84.081 35, 56.050 21	氨基酸类
3	1.301	蔗糖酸 ^[10]	C ₄ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	135.028 85	-3.70	135.029 17, 117.018 56, 89.023 48, 75.007 79	氨基酸类
4	1.303	精氨酸 ^[10]	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	175.118 64	-1.09	175.119 08, 116.070 96, 70.065 83, 60.056 38	氨基酸类
5	1.336	脯氨酸 ^[10]	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116.070 65	0.40	116.070 83, 70.065 78, 68.050 03	氨基酸类
6	1.352	谷氨酸 ^[10]	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	148.060 09	-2.96	148.060 42, 130.050 00, 102.055 36, 84.044 94	氨基酸类
7	1.435	缬氨酸 ^[10]	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118.086 26	0.03	118.086 53, 100.076 23, 72.081 45, 55.054 98	氨基酸类
8	1.441	烟酰胺 ^[11]	C ₆ H ₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	123.055 22	-0.56	123.055 51, 106.029 37, 96.044 85, 78.034 41	生物碱类
9	1.485	酪氨酸 ^[10]	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	182.081 01	-0.91	165.054 60, 136.075 71, 123.044 22, 91.054 73	氨基酸类
10	1.489	亮氨酸 ^[10]	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	229.154 34	2.33	229.154 79, 116.070 86, 86.096 99, 70.065 12	氨基酸类
11	1.491	尿嘧啶 ^[11]	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	113.034 68	1.11	113.034 53, 96.008 19, 95.024 15, 70.029 21	核苷类
12	1.499	异亮氨酸 ^[10]	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	132.101 77	-1.06	132.101 82, 86.096 97, 69.070 55, 58.065 83	氨基酸类
13	2.093	没食子酸 ^[11]	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.013 46	-4.61	169.013 63, 125.023 57, 107.012 95, 83.012 84	有机酸类
14	2.101	苯丙氨酸 ^[10]	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M-H] ⁻	164.070 78	-2.28	166.086 29, 149.059 81, 118.065 78, 103.054 66	有机酸类
15	2.473	胸腺嘧啶 ^[11]	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	127.049 93	-2.20	127.050 05, 110.023 88, 109.028 47, 84.044 73	核苷类
16	3.826	色氨酸 ^[10]	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	203.081 97	-3.10	203.082 29, 159.092 33, 116.049 77, 74.023 79	氨基酸类
17	4.013	杨梅素-3,3'-二丙乳糖苷 ^[12]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	641.133 37	-3.99	481.096 10, 319.044 68, 301.032 18, 85.028 96	黄酮类
18	4.025	异鼠李素-3- <i>O</i> -槐糖苷 ^[13]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	641.170 23	-1.55	479.116 18, 359.074 68, 317.065 52, 274.047 15	黄酮类
19	5.060	4-羟基苯甲酸 ^[14]	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 46	-2.99	137.023 74, 93.033 65, 65.038 64	有机酸类
20	5.341	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷-7- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[13]	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	[M+H] ⁺	757.216 49	-1.79	345.062 99, 303.049 80, 129.054 66, 85.028 95	黄酮类
21	5.364	二氢阿魏酸 ^[15]	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	195.065 60	-3.46	195.066 06, 151.075 90, 136.052 28	有机酸类
22	6.905	苯甲酸 ^[15]	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	121.028 47	-4.01	121.028 69, 108.020 81, 93.033 73, 91.017 59	有机酸类
23	7.467	杨梅素 ^[12]	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M+H] ⁺	273.031 80	-1.68	319.044 71, 271.039 28, 217.049 39, 153.018 30	黄酮类
24	7.476	杨梅素-3- <i>O</i> -吡喃半乳糖苷 ^[12]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	[M+H] ⁺	481.096 72	-1.80	319.044 65, 245.044 11, 153.018 30, 85.028 98	黄酮类
25	7.761	二氢山柰酚-3- <i>O</i> -己糖苷 ^[13]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.108 62	-0.65	421.113 62, 287.056 27, 259.061 34, 125.023 63	黄酮类
26	8.056	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷-7- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	[M-H] ⁻	755.207 93	4.93	449.107 73, 287.054 81, 153.018 37, 85.028 98	黄酮类
27	8.067	槲皮素-3- <i>O</i> -槐糖苷 ^[13,16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	625.139 63	-1.96	303.049 68, 300.030 00, 271.023 70	黄酮类
28	8.257	二氢槲皮素 ^[13,16]	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.050 92	-0.38	259.060 15, 231.065 26, 153.018 33, 149.023 50	黄酮类
29	8.270	二氢槲皮素-7-葡萄糖苷 ^[16]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	465.103 34	-1.16	465.103 03, 285.040 47, 303.051 27, 151.003 07	黄酮类
30	8.996	苦番红花素 ^[17-18]	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	[M+H] ⁺	331.174 34	-2.44	169.122 38, 151.118 20, 123.117 07, 109.101 59	萜类
31	9.296	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[16]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.087 85	-2.59	303.049 77, 229.049 48, 153.018 37, 85.028 98	黄酮类
32	9.538	山柰酚-3,7-二- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.158 82	-1.39	449.107 64, 329.065 89, 287.054 87, 153.018 05	黄酮类
33	10.124	异鼠李素-3,7-二- <i>O</i> -吡喃葡萄糖苷 ^[13,19]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	663.151 90	0.05	479.118 99, 317.065 40, 285.039 06, 153.018 31	黄酮类
34	10.484	异鼠李素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 ^[13,19]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	479.117 46	-1.59	317.065 40, 302.041 75, 285.038 70, 85.028 95	黄酮类
35	10.820	二氢槲皮素-3- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[13,16]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.108 73	-0.46	449.109 47, 152.010 89, 151.003 08, 107.013 05	黄酮类
36	11.218	芦丁 ^[20]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.145 39	-1.21	633.142 46, 303.049 71, 85.028 88, 71.049 80	黄酮类
37	11.284	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.071 71	-1.81	287.054 75, 269.049 63, 153.018 14, 67.018 37	黄酮类
38	11.304	山柰酚-3- <i>O</i> -槐糖苷 ^[13,16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.158 82	-2.32	449.107 24, 287.054 99, 213.054 69, 145.049 80	黄酮类
39	11.308	山柰酚 ^[13]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.054 27	-2.60	287.054 84, 259.060 10, 241.049 70, 165.018 37	黄酮类

表 2 (续)

编号	R/ min	化合物名称	分子式	离子 类型	准分子 离子	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	成分分类
40	11.405	香豆素 ^[21]	C ₁₅ H ₈ O ₅	[M+H] ⁺	269.044 21	-0.89	269.044 19, 241.049 36, 139.054 50, 103.054 49	香豆素类
41	11.466	对香豆酸 ^[21]	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.039 26	-4.94	165.054 84, 147.044 14, 119.049 44, 91.054 77	有机酸类
42	13.201	山柰酚-3-O-鼠李糖苷 ^[13,16]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.111 54	-3.20	287.054 84, 129.054 76, 85.028 98, 71.049 80	黄酮类
43	13.317	山柰酚-3-O-葡萄糖苷-O-阿拉伯糖 ^[13,16]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	579.135 28	-1.01	579.136 23, 284.032 87, 229.050 42, 151.003 01	黄酮类
44	13.793	异鼠李素-3-O-芸香糖苷 ^[13,19]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.161 62	-0.19	479.115 84, 317.065 40, 302.042 05, 274.047 36	黄酮类
45	13.844	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	449.106 23	-3.14	287.055 15, 258.052 25, 213.054 47, 165.018 63	黄酮类
46	14.157	西红花醛 ^[17-18]	C ₁₀ H ₁₄ O	[M+H] ⁺	151.111 59	-0.98	151.111 82, 107.085 95, 105.070 31, 81.070 49	萜类
47	14.339	山柰酚-3-O-芸香糖苷 ^[13,16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.163 88	-2.74	449.108 67, 287.054 75, 213.055 00, 129.054 73	黄酮类
48	14.359	山柰酚-7-O-葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	449.106 92	-2.03	287.054 93, 269.045 99, 258.052 37, 213.054 28	黄酮类
49	15.050	槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖基-6'-乙酸酯 ^[16,19]	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	505.098 77	-0.01	303.049 62, 187.060 27, 153.018 22, 127.039 14	黄酮类
50	16.684	柚皮素-7-O-葡萄糖苷 ^[19]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.113 80	-0.54	271.061 43, 177.019 10, 151.003 10, 119.049 45	黄酮类
51	16.948	芹菜素-3-O-葡萄糖苷 ^[19]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.112 32	-1.20	271.059 78, 153.018 22, 119.049 18	黄酮类
52	19.819	槲皮素 ^[16,19]	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	319.046 01	-0.82	301.035 77, 178.998 23, 151.003 11, 121.028 82	黄酮类
53	19.840	异鼠李素 ^[13,19]	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	317.065 00	-1.88	317.065 19, 302.041 81, 229.049 42, 153.018 16	黄酮类
54	21.404	西红花苷 I ^[17,22]	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	[M-H] ⁻	975.371 05	-0.44	651.266 42, 327.160 40, 283.170 35, 239.180 48	萜类
55	21.410	西红花苷 III ^[17,22]	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	651.263 79	-3.12	473.215 61, 329.174 47, 311.163 88, 293.153 32	萜类
56	21.773	西红花酸 ^[17]	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	[M-H] ⁻	327.159 97	-0.64	265.158 20, 211.111 05, 197.095 47, 157.100 80	萜类
57	22.989	柚皮素 ^[19]	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.060 91	-1.25	273.075 84, 153.018 36, 147.044 22, 119.049 50	黄酮类
58	23.271	槲皮素-3-甲醚 ^[13,16]	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.050 72	-0.97	315.050 60, 300.026 89, 271.024 20, 25.029 60	黄酮类
59	29.804	槲皮素-3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷 ^[13,16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	628.193 42	-0.94	465.100 59, 303.049 71, 153.018 22, 85.028 97	黄酮类

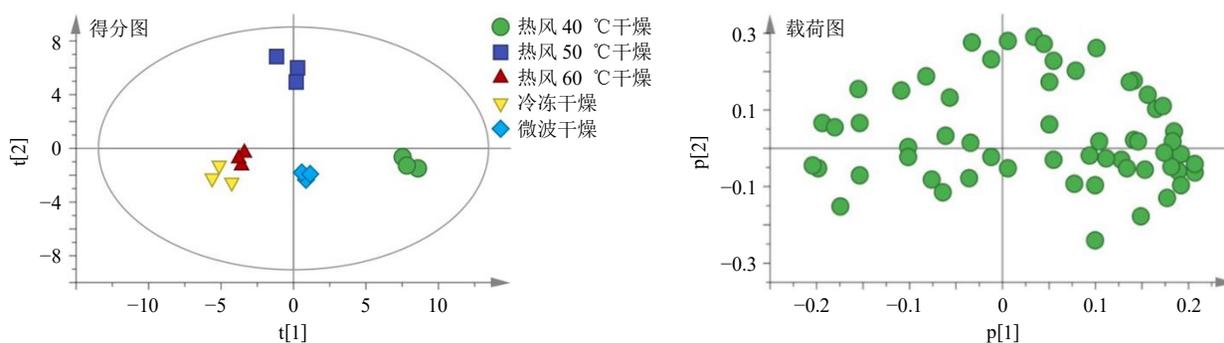


图 3 不同干燥方法去柱头花朵 PCA 得分图和载荷图

Fig. 3 PCA scores and loading diagram of *Crocus sativus* flowers without stigma by different drying methods

睛; 14~16 min, 80%乙睛; 16~17 min, 80%~5%乙睛; 17~18 min, 5%乙睛; 进样量 5 μ L; 体积流量 0.4 mL/min。样品在 MRM 模式下进行正、负离子分析。幕气、雾化器气和加热器气分别设置为 35、40、40 psi (1 psi=6 894.757 Pa)。优化后的离子喷雾电压和源温度分别为 5 500 V 和 450 $^{\circ}$ C, 9 种分析物和 IS 的最佳 MRM 参数如表 4 所示。日志含义设置 MRM 模式下的检测窗口为 90 s 左右的预期保持时间。数据由 AnalystTM 1.6.3 软件收集和分析。

2.5.4 线性关系考察 按照“2.5.2”项下方法制备

对照品溶液, 并以 50%乙醇为溶剂逐级稀释至 7 个不同质量浓度, 得到系列对照品溶液。按照“2.5.3”项下 UHPLC-MS/MS 条件, 测定不同梯度混合对照品中各成分的峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归计算, 得回归方程分别为槲皮素 $Y=7.469 8 X+3 307.628, R^2=0.999 5$, 线性范围 100.3~20 900.0 ng/mL; 山柰酚 $Y=73.738 2 X+43 783.200 0, R^2=0.998 3$, 线性范围 96.96~20 200.00 ng/mL; 山柰酚-3-O-葡萄糖苷 $Y=47.334 7 X+22 816.643 1, R^2=$

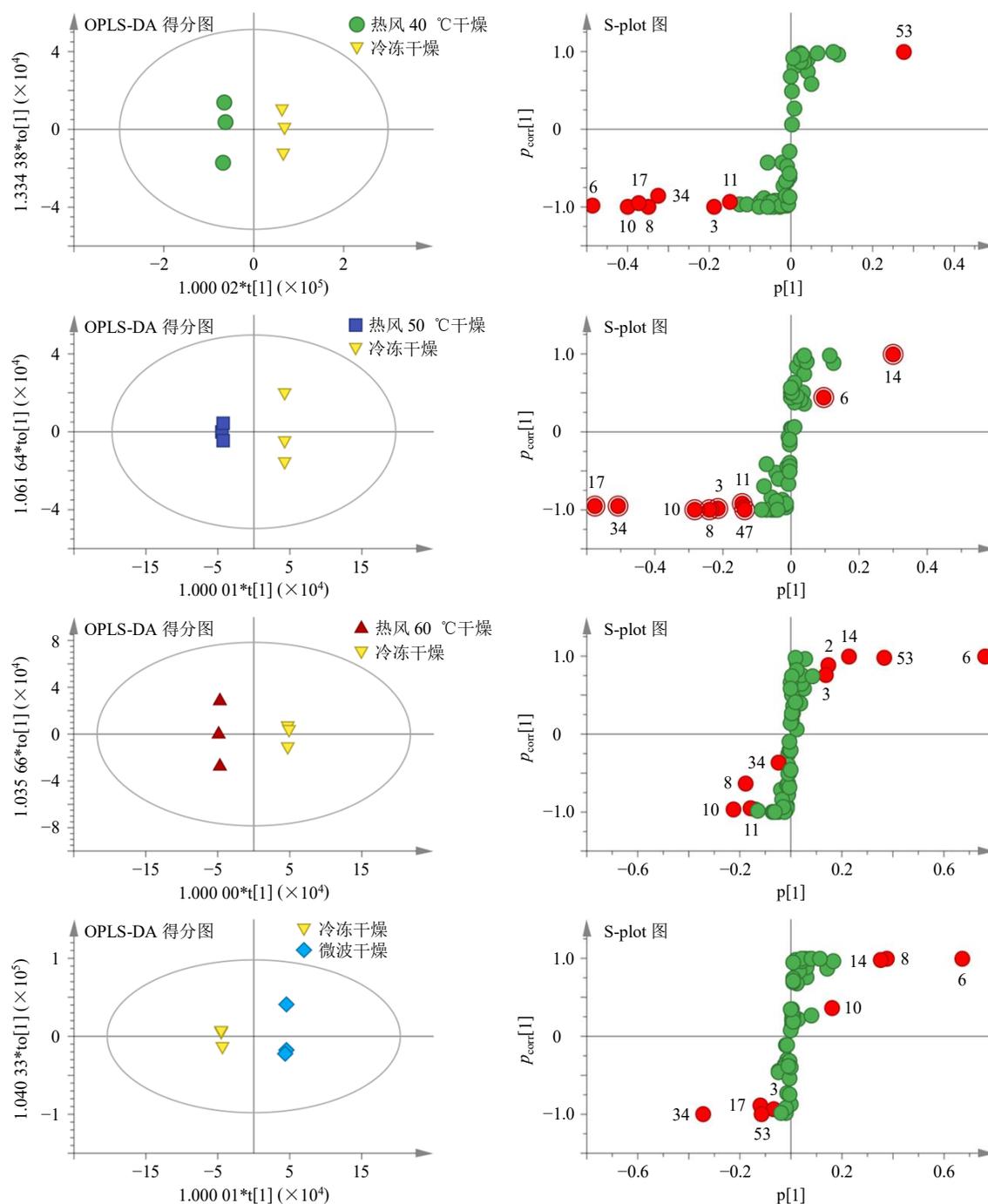


图 4 不同干燥方法番红花去柱头花朵粉末的 OPLS-DA 得分图和 S-plot 图

Fig. 4 OPLS-DA score plots and S-plot of *C. sativus* flowers without stigma powder with different drying methods

0.997 8, 线性范围 254.4~84 800.0 ng/mL; 槲皮素-3-O-葡萄糖苷 $Y=97.966\ 4 X+5\ 044.368\ 54$, $R^2=0.997\ 1$, 线性范围 47.8~15 920.0 ng/mL; 结果表明山柰酚、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷回归方程 R^2 值均大于 0.997 以上, 线性关系良好。

2.5.5 精密度试验 对照品按上述检测条件进行分析, 连续进样 6 针, 结果表明山柰酚、山柰酚-3-O-

葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.80%、3.89%、2.55%、3.81%, 精密度试验结果良好。

2.5.6 重复性试验 根据“2.5.2”项下的制备方法平行制备番红花去柱头花朵微波干燥样品溶液 6 份, 按照“2.5.3”项下色谱条件测定 6 份样品溶液中山柰酚、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷的峰面积, 利用标准曲线计算各成分含量

表3 5种不同干燥方法共有差异成分

Table 3 Common components of flowers by five different drying methods

<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	准分子离子(<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	准分子离子(<i>m/z</i>)
1.230	<i>L</i> -组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	156.076 63	1.499	<i>L</i> -异亮氨酸	C ₉ H ₁₃ NO ₂	132.101 77
1.301	<i>L</i> -苏糖酸	C ₄ H ₈ O ₅	135.028 85	2.101	<i>L</i> -苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164.070 78
1.303	<i>DL</i> -精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	185.118 64	9.296	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 85
1.336	<i>D</i> -(+)-脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	116.070 65	11.380	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.054 78
1.352	<i>L</i> -谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	148.060 09	13.844	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.107 48
1.435	<i>L</i> -(+)-缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.086 26	19.819	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	319.046 01
1.459	<i>DL</i> -酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.081 01	22.989	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.060 91

表4 4种黄酮化合物MRM检测条件

Table 4 MRM detection conditions for four flavonoid compounds

化合物	<i>t_R</i> /min	相对分子质量	母离子(Q1)	子离子(Q3)	去簇电压(DP)/V	碰撞电压(CE)/V	监测离子
槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.61	464.4	463.0	300.0	-165	-40	[M-H] ⁻
山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.89	448.4	447.2	255.0	-170	-55	[M-H] ⁻
槲皮素	5.12	302.2	303.3	285.2	80	32	[M+H] ⁺
山柰酚	6.11	286.2	287.1	153.0	180	30	[M+H] ⁺

的RSD值。结果表明山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷质量分数的RSD分别为3.08%、3.62%、3.12%、3.64%，重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 根据“2.5.2”项下的制备方法番红花去柱头花朵样品溶液，按照“2.5.3”项下色谱条件测定，分别计算0、2、4、6、8、10、12、24 h山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷峰面积的RSD值，结果山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷的峰面积RSD分别为2.71%、3.61%、3.94%、2.29%，供试品溶液在24 h内的稳定性良好。

2.5.8 加样回收试验 精密称取6份已测定的番红花去柱头花朵样品0.05 g，分别加入一定量的山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷对照品溶液，混合后，按照“2.5.2”项下制备方法进行制备，按照“2.5.3”项下色谱条件进行测定，计算加样回收。山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷的加样回收率分别是98.93%、100.90%、101.20%、102.34%，RSD分别为1.90%、2.49%、2.77%、1.68%。

2.5.9 定量限、检测限 取“2.5.2”项下的混合对照品溶液，用50%乙醇逐步稀释并按照“2.5.3”项下检测方法进行测定，记录信号强度与噪音强度的比值，将信号强度和噪音强度之比约为3倍信噪比和10倍信噪比作为检出限和定量限，结果山柰酚、

山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷检出限分别为159.6、17.8、3.8、100.0 ng/mL，定量限分别为319.2、888.0、188.0、200.0 ng/mL。结果表明，试验方法测得的方法检出限和方法定量限均小于标准规定的检出限和定量限，试验方法测定该4种黄酮类化合物的灵敏度较高，能够满足含量测定的需要。

2.5.10 样品测定 取5种不同干燥方法的番红花去柱头花朵样品根据“2.5.2”项下方法制备样品溶液，按照“2.5.3”项下条件进行分析，记录峰面积。根据线性关系计算山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷4种黄酮类化合物的含量并进行含量方差分析(ANOVA)。番红花去柱头花朵样品含量结果见表5。

5组花朵样品中山柰酚、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷存在显著差异。热风50℃干燥和热风60℃干燥、热风40℃干燥和冷冻干燥山柰酚的质量分数不存在显著差异，微波干燥山柰酚的质量分数显著高于其余4种干燥方法。山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷的质量分数从高到低排列为微波干燥>热风50℃干燥>热风40℃干燥>热风60℃干燥>冷冻干燥，其中热风60℃干燥和冷冻干燥、热风50℃干燥和微波干燥不存在显著差异。槲皮素的质量分数从高到低排列为微波干燥>热风60℃干燥>热风40℃干燥>冷冻干燥>热风

表5 不同干燥方法去柱头花朵样品中4种黄酮类化合物的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Contents of four flavonoids in *C. sativus* flowers without stigma by different drying methods ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

干燥方式	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	山柰酚	山柰酚 3-O-葡萄糖苷	槲皮素	槲皮素 3-O-葡萄糖苷
热风 40 °C	16.77±0.04 ^a	36.68±0.94 ^c	4.94±0.10 ^b	10.48±0.24 ^b
热风 50 °C	22.05±1.12 ^b	62.94±0.15 ^b	2.52±0.07 ^a	13.81±0.02 ^c
热风 60 °C	20.33±0.40 ^b	20.46±1.27 ^a	5.54±0.03 ^b	5.12±0.72 ^a
微波干燥	36.81±1.66 ^c	63.07±2.69 ^b	42.87±0.63 ^c	12.76±0.30 ^c
冷冻干燥	16.57±0.21 ^a	16.08±1.49 ^a	5.39±0.06 ^b	3.95±0.14 ^a

50 °C干燥,其中热风 60 °C干燥和冷冻干燥不存在显著差异,微波干燥槲皮素的质量分数最高。热风 60 °C干燥和冷冻干燥、热风 50 °C干燥和微波干燥槲皮素-3-O-葡萄糖苷的质量分数不存在显著差异,质量分数从高到低排列为微波干燥>热风 50 °C干燥>热风 40 °C干燥>热风 60 °C干燥>冷冻干燥。可见,微波干燥快速高温的干燥模式能有效的减少物质基础的损失,更好地保留有效成分。

2.6 体外抗氧化活性评价

2.6.1 羟自由基清除能力

羟自由基的清除活性采用自由基清除能力测定试剂盒测定^[24]。不同干燥样品 0.1 g 加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆, 10 000 r/min, 4 °C离心 10 min, 取上清液置冰上待测。将 1.5 mL 不同干燥方法样品溶液加入 1.35 mL 羟自由基溶液记为测定管 ($A_{\text{样品}}$), 涡旋混匀, 置于 37 °C 恒温培养箱准确反应 60 min。10 000 r/min, 常温离心 10 min, 取各上清液测定 536 nm 处的吸光度 (A), 平行 3 份。不加样品溶液记为对照管 ($A_{\text{对照}}$), 蒸馏水用作空白对照 ($A_{\text{空白}}$)。羟自由基清除率按公式计算。该套件按照制造商指定的程序使用。不同干燥方法去柱头花朵对羟自由基的清除能力从高到低排列为微波干燥>冷冻干燥>热风 40 °C干燥>热风 50 °C干燥>热风 60 °C干燥,其中热风 40 °C干燥、热风 50 °C干燥、热风 60 °C干燥、冷冻干燥 4 种干燥方法不存在显著差异,微波干燥方法羟自由基清除能力显著高于其他 4 种干燥方法 (表 6)。

$$\text{羟自由基清除率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{对照}})$$

2.6.2 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基的清除活性采用自由基清除能力测定试剂盒测定^[24]。不同干燥样品 0.05 g 加入 1 mL 提取液于 40 °C水浴锅中浸提 30 min, 10 000 r/min, 室温离心 10 min, 取

表6 不同干燥方法去柱头花朵样品体外抗氧化能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Antioxidant capacity of *C. sativus* flowers without stigma by different drying methods *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

干燥方法	自由基清除率/%		
	羟基	DPPH	ABTS
热风 40 °C	50.61±7.14 ^a	87.89±1.71 ^a	79.03±0.38 ^a
热风 50 °C	38.81±7.06 ^a	86.31±0.58 ^a	80.82±1.37 ^a
热风 60 °C	34.92±1.02 ^a	88.14±2.11 ^a	82.93±0.31 ^a
微波干燥	79.68±1.41 ^b	82.68±0.82 ^a	85.31±0.42 ^b
冷冻干燥	50.81±5.87 ^a	87.49±1.19 ^a	84.23±0.40 ^b

上清液置冰上待测。将 10 μL 不同干燥方法的样品溶液于 190 μL DPPH 溶液记为测定管 ($A_{\text{样品}}$), 涡旋混匀, 室温避光静置 30 min, 测定 515 nm 处的 A 值。以无水乙醇代替 DPPH 溶液作为对照管 ($A_{\text{对照}}$), 提取液代替样品溶液用作空白对照 ($A_{\text{空白}}$)。DPPH 自由基清除率按公式计算。该套件按照制造商指定的程序使用。5 种不同干燥方法去柱头花朵对 DPPH 自由基的清除能力均不存在显著差异,清除率均大于 80% (表 6),说明 5 种干燥方法均能保留去柱头花朵的对 DPPH 自由基氧化的抑制能力。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}$$

2.6.3 ABTS 自由基清除能力

ABTS 自由基的清除活性采用自由基清除能力测定试剂盒测定^[24]。不同干燥样品 0.05 g 加入 1 mL 提取液于 40 °C水浴锅中浸提 30 min, 10 000 r/min, 室温离心 10 min, 取上清液置冰上待测。将 10 μL 不同干燥方法的样品溶液加入 190 μL ABTS 溶液记为测定管 ($A_{\text{样品}}$), 充分混匀, 室温避光静置 6 min, 测定 405 nm 处的吸光度。按照试剂盒说明书,以所提供的试剂代替 ABTS 溶液作为对照管 ($A_{\text{对照}}$), 蒸馏水用作空白对照 ($A_{\text{空白}}$)。ABTS 自由基清除率按公式计算。该套件按照制造商指定的程序使用。不同干燥方法去柱头花朵对 ABTS 自由基的清除能力从高到低排列为微波干燥>冷冻干燥>热风 60 °C干燥>热风 50 °C干燥>热风 40 °C干燥,其中微波干燥和热风 60 °C干燥与热风 40 °C干燥和热风 50 °C干燥存在显著差异,对 ABTS 自由基的清除率在 85%左右。微波干燥方法可以较好的保留去柱头花朵对 ABTS 自由基的氧化抑制能力 (表 6)。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}$$

3 讨论

不同干燥方法对番红花去柱头花朵外观性状、

物质基础的种类和含量以及抗氧化活性存在影响。干燥过程中加热方式和时间、温度和含水量变化、真空环境等条件是影响去柱头花朵品质的直接因素。热风 40 °C 干燥适合各种酶促反应的发生，四种黄酮类化合物（山柰酚、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷）质量分数趋于平均。热风 60 °C 干燥后的样品中，相较于热风 40 °C 干燥，山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷质量分

数降低，山柰酚和槲皮素质量分数升高，可能是温度的升高促进了糖苷键的断裂（图 5）。热风 50 °C 干燥黄酮糖苷类化合物质量分数较高，酶促反应受到抑制且糖苷键不易断裂。传统热风干燥（40、50、60 °C）水分扩散受限，干燥效率低，耗时较长，随着加热温度的升高，样品皱缩程度变大，内部结构破坏加重，会使热敏性或易氧化成分降解，其自身的抗氧化活性减弱，降低物料品质^[25]。

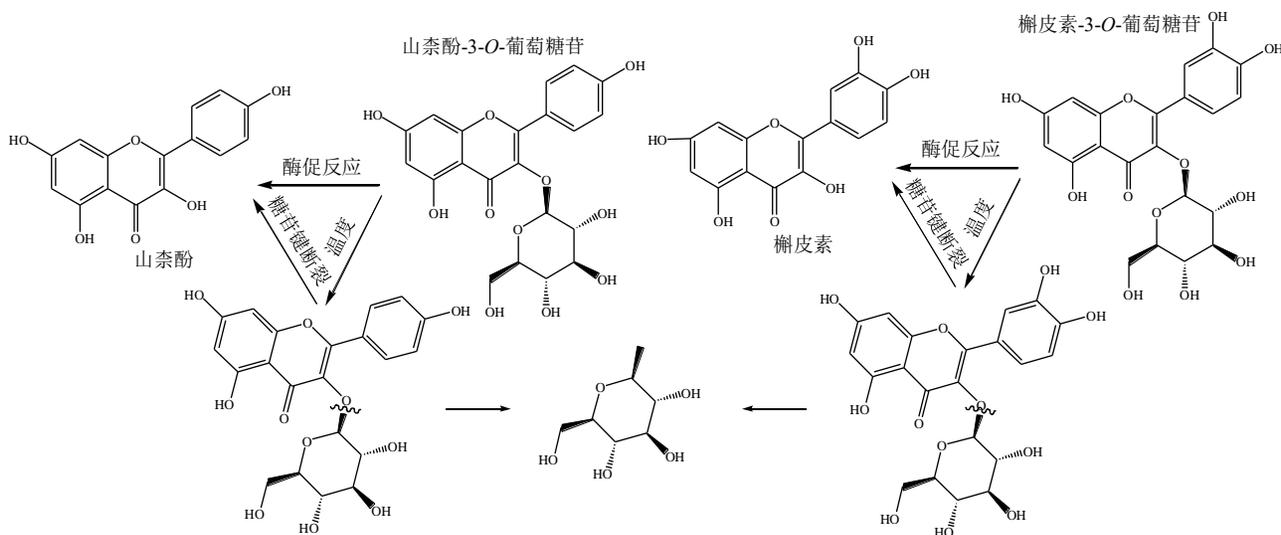


图 5 番红花去柱头花朵黄酮类化合物含量变化途径

Fig. 5 Pathways of flavonoid content in *C. sativus* flowers without stigma

冷冻干燥虽然能最大程度保留去柱头花朵的色泽，但干燥后的样品品质轻易碎，无法维持完整形态，不利于长期储存。并且冷冻干燥 -20 °C 的预冻温度，降温速率快，去柱头花朵内部水分子临界结晶的粒度则越小，成核速度越快，容易形成颗粒较多尺寸较小的细晶。因而冰晶升华后，去柱头花朵内形成的孔隙尺寸较小，冻干样品复水性极好，极易于吸潮，造成检测含量偏低^[26]。同时冷冻干燥也存在效率低、耗时长、成本大的问题，无法满足大工厂的生产需要。

微波干燥后的样品外观形状保留了冷冻干燥的优势又规避了样品易碎的缺点。微波干燥后的样品四种黄酮类化合物含量最高和自由基清除能力最强，真空、快速以及由内而外的加热方式减少了物质基础损耗，样品干燥更均匀。综合实际操作成本及物料的品质等问题，微波干燥更适宜番红花去柱头花朵产地干燥加工。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Basker D, Negbi M. Uses of saffron [J]. *Econ Bot*, 1983,

37(2): 228-236.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 134.

[3] Serrano-Díaz J, Sánchez A M, Martínez-Tomé M, et al. Flavonoid determination in the quality control of floral bioresidues from *Crocus sativus* L. [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(14): 3125-3133.

[4] 陈娜, 杨滨. 西红花非药用部位化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(14): 2884-2891.

[5] 赵成刚, 瞿伟菁. 西红花花瓣总黄酮提取及抗氧化性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(2): 29-33.

[6] Khazdair M R, Boskabady M H, Hosseini M, et al. The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2015, 5(5): 376-391.

[7] Azizi M, Abbasi N, Mohamadpour M, et al. Investigating the effect of *Crocus sativus* L. petal hydroalcoholic extract on inflammatory and enzymatic indices resulting from alcohol use in kidney and liver of male rats [J]. *J Inflamm Res*, 2019, 12: 269-283.

[8] Li X, Xie J, Fan H, et al. Stigma and petals of *Crocus sativus* L.: Review and comparison of phytochemistry and pharmacology [J]. *Arab J Chem*, 2023, 16(8): 104918.

- [9] Kim S, Kim S, Shim I, *et al.* Drying operation effects on the pigments and phytochemical properties of rose cultivars [J]. *JAOAC Int*, 2021, 104(4): 1148-1154.
- [10] Zhou L, Cai Y M, Yang L Y, *et al.* Comparative metabolomics analysis of stigmas and petals in Chinese saffron (*Crocus sativus*) by widely targeted metabolomics [J]. *Plants*, 2022, 11(18): 2427.
- [11] 吕卓, 袁文婷, 汤迪, 等. 西红花花瓣中氨基酸与微量元素等成分含量研究 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(6): 1023-1028.
- [12] Gismondi A, Serio M, Canuti L, *et al.* Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Am J Plant Sci*, 2012, 3(11): 1573-1580.
- [13] Mykhailenko O, Bezruk I, Volochai V, *et al.* Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Crocus speciosus* leaves [J]. *Phyton*, 2022, 91(1): 207-221.
- [14] Li C Y, Wu T S. Constituents of the stigmas of *Crocus sativus* and their tyrosinase inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(10): 1452-1456.
- [15] Zeka, Marrazzo P, Micucci M, *et al.* Activity of antioxidants from *Crocus sativus* L. petals: Potential preventive effects towards cardiovascular system [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1102.
- [16] Baba S A, Mohiuddin T, Basu S, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 698.
- [17] Christodoulou E, Kadoglou N P, Kostomitsopoulos N, *et al.* Saffron: A natural product with potential pharmaceutical applications [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(12): 1634-1649.
- [18] 李坤, 商晓慧, 叶冠. 西红花柱头、雄蕊和花瓣的挥发性化学成分 GC-MS 分析 [J]. *上海医药*, 2017, 38(13): 74-78.
- [19] Montoro P, Maldini M, Luciani L, *et al.* Radical scavenging activity and LC-MS metabolic profiling of petals, stamens, and flowers of *Crocus sativus* L. [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(8): C893-C900.
- [20] Anjum N, Pal A, Tripathi Y C. Phytochemistry and pharmacology of saffron, the most precious natural source of colour, flavour and medicine [J]. *SMU medical journal*, 2015, 2(1): 335-346.
- [21] 张慧芳, 龚雪媛, 陈宗良, 等. 西红花花瓣中槲皮素与山柰素含量测定研究 [J]. *农业与技术*, 2022, 42(11): 15-17.
- [22] 王萌萌, 徐步斌, 周斌, 等. HPLC 法测定西红花不同部位中西红花苷-I 和苷-II [J]. *中成药*, 2019, 41(5): 1102-1105.
- [23] Yun J, Cui C J, Zhang S H, *et al.* Use of headspace GC/MS combined with chemometric analysis to identify the geographic origins of black tea [J]. *Food Chem*, 2021, 360: 130033.
- [24] Yang Y, Liu M C, Wang K, *et al.* Chemical and cytological evaluation of honeybee pollen antioxidant ability [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(3): 824-833.
- [25] 王安娜, 王赟, 彭小伟, 等. 不同干燥方式对竹叶花椒叶品质的影响 [J]. *中国农业科学*, 2023, 56(18): 3655-3669.
- [26] 肖程雨, 李朋洋, 郝小龙, 等. 加工及干燥方式对短小蛇根草活性成分的影响 [J]. *浙江林业科技*, 2023, 43(5): 101-107.

[责任编辑 郑礼胜]