

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.028

# 三种提取藏红花废弃物挥发油方法比较

曲绮雯<sup>1</sup>, 魏 琴<sup>2</sup>, 李数数<sup>1</sup>, 杨华侨<sup>1</sup>, 邵平悦<sup>1</sup>, 白 洁<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 宜宾学院香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 644000)

**摘 要:** 采用水蒸汽蒸馏法、超声辅助浸提法和索氏提取法三种方式提取藏红花花瓣及雄蕊中的挥发油, 用 GC-MS 分离鉴定成分并测定各成分的相对含量. 结果显示共鉴定出化合物 49 种, 水蒸汽蒸馏法、超声辅助浸提法和索氏提取法分别分离鉴定出 43、27、21 种组分, 且共有 6 种相同成分. 挥发油的主要成分为棕榈酸、亚油酸、亚麻酸. 水蒸汽蒸馏法提取组分中含有如芳樟醇、优葛缕酮、柏木脑等独有成分, 且藏红花醛含量可达 40.31%, 索氏提取法挥发油提取率最高, 为 6.04%. DPPH 自由基清除实验表明, 水蒸汽提取挥发油在 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时清除率效果表现最佳为 44.17%. 还原力测定实验及总抗氧化能力实验中, 索氏提取物表现出的抗氧化能力最强.

**关键词:** 藏红花; 花瓣; 雄蕊; 挥发油; 抗氧化

**中图分类号:** Q946.91      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1306-05

## Comparison of three methods for extracting volatile oil from Saffron bio-residues

QU Qi-Wen<sup>1</sup>, WEI Qin<sup>2</sup>, LI Shu-Shu<sup>1</sup>, YANG Hua-Qiao<sup>1</sup>, SHAO Ping-Yue<sup>1</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment, Ministry of Education

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065 China;

2. Key Lab of Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, Yibin 644000, China)

**Abstract:** The volatile oil was extracted by water vapor distillation, ultrasonic and Soxhlet extraction from saffron petals and stamens. The relative content in percentage were calculated with area normalization by GC-MS. The results showed that 49 kinds of compounds were identified in total. Three methods can extract 43, 27 and 21 kinds of components respectively and share 6 components together. The main components are palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid. In contrast, water vapor distillation can harvested the most variety of components such as linalol, eucarvone and cedrol etc.. What's more, the relative content of safranal was 40.31%. Soxhlet extraction can showed the highest extraction rate. In the experiment of antioxidant activity, three extracts were tested by DPPH, reducing power assay and T-AOC test for antioxidant measurement, respectively. The clearance rate of water vapor distillation extracts reached 44.17%, which was the highest in the three extraction methods at the concentration of 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The Soxhlet extract showed the best result in reducing power assay and T-AOC test.

**Keywords:** *Crocus sativus* L.; Petals; Stamens; Volatile oil; Antioxidant activity

收稿日期: 2016-09-25

基金项目: 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室开放基金资助项目(2016XLZ002); 西红花规模化生产技术服务(HS20100601106684)

作者简介: 曲绮雯(1992-), 女, 辽宁丹东, 硕士研究生, 主要研究天然产物领域. E-mail: 1054946083@qq.com

通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

## 1 引言

藏红花(*Crocus sativus* L.),又称番红花、西红花,系鸢尾科(*Iridaceae*)番红花属多年生草本植物,主要分布于欧洲和亚洲,尤其是地中海地区、伊朗、及印度<sup>[1]</sup>,我国的上海、浙江、江苏等地有栽培<sup>[2]</sup>。现代药理学研究表明藏红花具有抗肿瘤、清除自由基、降低血脂的功效<sup>[3]</sup>,在藏红花的活性物质中,藏红花苷、藏红花醛是主要的活性物质<sup>[4]</sup>,且几乎均存在于柱头,所以藏红花的花瓣及雄蕊一般作为生产废弃物而被丢弃。近年来,因研究发现藏红花花瓣具有抗炎、镇痛等功效<sup>[5]</sup>,且甲醇提取物具有抗氧化、抑制络氨酸酶活性等功能<sup>[6]</sup>,使藏红花花瓣和雄蕊的研究受到了广泛关注。王晓萌等初步探究过藏红花花瓣及雄蕊中各自的挥发油相对含量<sup>[7]</sup>,从成分上分析,花瓣与雄蕊的挥发油区别很小,且为减少工业生产后期人工分离费用,可以合并实验,以探索其综合开发价值。因此本实验通过水蒸汽、超声辅助和索氏提取三种方法提取并进一步分析藏红花花瓣及雄蕊混合物的挥发油成分,并通过 DPPH、还原力及 T-AOC 测定实验确定不同提取方式对挥发油的活性影响,从而挖掘藏红花废弃物中的潜在价值,为资源合理利用奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

藏红花花瓣及雄蕊,购自浙江,经四川大学生命科学学院白洁副教授鉴定为鸢尾科番红花属藏红花。

挥发油提取器,索氏提取器,LABORO-TA4000 旋转蒸发仪,ZK-82A 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),QP2010 型气相色谱—质谱—计算机联用仪(GC-MS)(日本岛津公司)、Mettler-Toledo 分析天平 AE240、JL-04A 型粉碎机等。

CaCl<sub>2</sub>、正己烷分析纯、乙酸乙酯分析纯、T-AOC 试剂盒(南京建成科技有限公司)、DPPH、三氯乙酸(TCA)、铁氰化钾、三氯化铁。

### 2.2 方法

2.2.1 材料处理 将材料于 50℃ 烘干后,用粉碎机粉碎,过 10 目筛后避光冷藏保存。

2.2.2 水蒸汽蒸馏法<sup>[8]</sup> 精密称取材料 100.0g,用水蒸汽蒸馏法进行提取,蒸馏 8h,馏出液用乙酸乙酯萃取 3 次后,加入少量无水 CaCl<sub>2</sub> 干燥过夜,过滤,滤液经旋转蒸发仪减压浓缩后备用。

2.2.3 超声辅助浸提法<sup>[8]</sup> 精密称取材料 20.0g,加入 150 mL 正己烷,100Hz 超声 30 min 后,置于暗处浸提 10 h,无水 CaCl<sub>2</sub> 干燥,滤液经减压浓缩后备用。

2.2.4 索氏提取法<sup>[8]</sup> 精密称取材料 20.0g,滤纸包裹后置于索氏提取器中,用正己烷于 70℃ 下提取,直至索式提取器中浸出液呈无色为止,提取液经减压浓缩后备用。

2.2.5 GC-MS 色谱条件 气相色谱条件: TG-5MS 弹性石英毛细管色谱柱(0.25mm×30mm;膜厚 0.25μm);载气为高纯度氦气(99.999%),载气流量 1.0 mL/min;不分流进样;进样量 1 μL;升温程序:起始温度为 80℃(保持 2 min),以 15℃/min 升至 200℃,再以 20℃/min 速度升至 280℃,恒温保持 15 min;进样口温度为 250℃。

质谱条件:MSD 离子源为 EI 源,离子源温度 200℃,电子能量 70 eV;扫描范围 30~500 m/z。使用美国 NIST05 质谱标准库计算机检索确定成分,采用面积归一化法计算各组分的相对含量。

2.2.6 DPPH 自由基清除实验 清除 DPPH 自由基的能力测定参照 Compton<sup>[9]</sup> 的方法,略有改动。100μL 不同浓度样品和阳性对照 VC(10~280 μg/mL)及乙醇分别作为实验组、阳性对照和空白组。加入 100μL 0.1mM DPPH(乙醇溶解)溶液,混合物震荡混匀后于 25℃ 环境下静置 30 min,517 nm 处测吸光值,每隔 10 min 测 1 次,直到吸光度达平衡为止,各测 3 次取平均值。最后根据下列公式计算提取液对 DPPH 自由基的清除率:清除率 = (1 - A<sub>1</sub>/A<sub>0</sub>) × 100% 式中,A<sub>1</sub> 为加药液后 DPPH 溶液的吸光值;A<sub>0</sub> 为未加药液时 DPPH 溶液的吸光值。

2.2.7 还原能力测定实验 还原力测定实验根据 He 等的方法<sup>[10,11]</sup> 有所改动。25μL 不同浓度样品和阳性对照 BHT(15~250 μg/mL)及乙醇分别作为实验组、阳性对照和空白组。加入 50μL PBS(pH 6.6,0.2 M)和 25μL 1% 的铁氰化钾水溶液,混匀,于 45℃ 条件下放置 1h,再加入 50μL 10% 的三氯乙酸水溶液和 60μL 0.1% 的三氯化铁水溶液,混匀后测定 700nm 处吸光值,各测 3 次取平均值。

2.2.8 总抗氧化能力测定(T-AOC) 总抗氧化能力测定采用 T-AOC 试剂盒,利用 Fe<sup>3+</sup> 还原成 Fe<sup>2+</sup>,后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物的原理,通过比色可测出其抗氧化能力的高低,在 520 nm 处测吸光值,各测 3 次取平均值。最后根据

下列公式计算总抗氧化能力:

$$\text{总抗氧化能力(单位/毫升组织)} = [(\text{OD}_U - \text{OD}_C) / 0.01] / 30 \times N \times n$$

式中,  $\text{OD}_U$  为测试管吸光值;  $\text{OD}_C$  为对照管吸光度值;  $N$  为反应体系稀释倍数;  $n$  为样品测试前的稀释倍数.

### 3 结果与分析

#### 3.1 挥发油化学成分分析

分别采用水蒸汽蒸馏法、超声辅助浸提法、索氏提取法提取藏红花花瓣及雄蕊的挥发油得率分别为 0.40%、5.00%、6.04%, 且均为黄色, 密度小于水的油状物质. 水蒸汽蒸馏法的挥发油味道较其他两种方法浓郁. 通过 GC-MS 分析了三种提取方

法的挥发油成分及含量(表 1). 超声及索氏提取成分, 几乎均为烷、脂肪酸类化合物. 其中, 超声提取物中烷烃类含量为 45.94%, 脂肪酸含量为 20.66%, 索氏提取物中烷烃类含量为 72.23%, 脂肪酸含量为 13.55%. 水蒸汽提取法的化学成分包含烷、酮、醛、醇、脂肪酸等. 对比王晓萌等<sup>[7]</sup>的实验结果发现, 此次采用水蒸汽提取的挥发油中, 藏红花醛含量为 40.31%, 明显高于王小萌<sup>[7]</sup>记载的 5.66%. 同时, 气象色谱也分析出一些未报道的物质, 如: 优葛缕酮(5.62%)、芳樟醇(1.28%)、马鞭草烯酮(0.22%)等挥发油成分. 研究表明优葛缕酮具有很强的抑菌活性<sup>[12]</sup>, 芳樟醇具有抗炎的功效<sup>[13]</sup>, 以及苯甲醛(0.12%)、苯乙醛(3.61%)、月桂醛(0.46%)等成分用于香料开发等.

表 1 不同方式提取藏红花花瓣及雄蕊挥发油的成分分析

Tab. 1 Chemical constituents of violate oil from saffron petals and stamens by different methods

序号	t/min	化合物名称	水蒸汽蒸馏(%)	超声辅助浸提(%)	索氏提取(%)	序号	t/min	化合物名称	水蒸汽蒸馏(%)	超声辅助浸提(%)	索氏提取(%)
1	3.022	糠醛	2.22	—	—	25	11.908	苯甲酮	0.1	—	—
2	4.675	苯甲醛	0.12	—	—	26	12.834	肉豆蔻酸	0.25	—	—
3	5.142	香豆酮	0.11	—	—	27	13.433	1,2-苯二甲酸	0.57	—	—
4	5.767	苯乙醛	3.61	—	—	28	13.701	棕榈酸	6.84	3.65	2.1
5	6.401	芳樟醇	1.28	—	—	29	14.763	9-蒎甲醛	7.06	—	—
6	6.493	癸烯醛	3.72	—	—	30	14.836	亚麻酸	7.17	1.87	2.46
7	6.855	异佛尔酮	3.14	—	—	31	15.192	亚油酸	4.37	11.22	2.17
8	7.919	藏红花醛	40.31	—	—	32	17.210	十五烷	0.32	11.89	—
9	8.131	优葛缕酮	5.62	—	—	33	17.525	十七烷	—	—	1.7
10	8.253	牻牛儿醇	0.56	—	—	34	18.225	二十六烷	0.14	13.93	9.01
11	8.383	月桂醛	0.46	—	—	35	18.425	月桂酸	—	—	3.97
12	8.525	桂皮醛	0.09	—	—	36	19.217	二十烷	1.51	13.84	11.52
13	8.850	烟酮	0.17	—	—	37	19.6683	二十八烷	0.65	2.15	36.08
14	8.967	马鞭草烯酮	0.22	—	—	38	20.260	二十烷醇	—	0.60	—
15	9.045	环己甲酸	0.62	—	—	39	22.508	二十四烷	—	1.83	7.58
16	9.172	三环戊烯一酮	0.30	—	—	40	22.756	二十五烷	—	0.87	—
17	9.415	环己烯	0.27	—	—	41	22.812	三十三烷	—	—	3.22
18	9.994	丁酮	1.25	—	—	42	22.859	硬脂酸	—	—	2.83
19	10.092	3,7-亚甲基萘	0.55	—	—	43	23.058	二十八烷醇	—	9.91	6.13
20	10.177	酚萘	0.37	—	—	44	24.850	七氟丁酸钠	—	6.88	4.02
21	10.568	十五烷	0.91	—	—	45	26.425	十三烷酮	—	0.76	—
22	10.783	十一烷酸	0.44	0.91	—	46	26.687	三十四烷	—	1.43	—
23	11.381	硬脂酸	1.55	—	—	47	27.700	正三十五烷	—	—	3.12
24	11.825	柏木脑	0.75	—	—	48	27.717	肉豆蔻酸	—	3.92	—
						49	28.250	棕榈酸	—	—	2.12

注:—表示无该成分

#### 3.2 抗氧化能力分析

DPPH 自由基清除实验表明(图 1), 水蒸汽提取挥发油的清除能力在 10~280  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的清除率

为 8.01%~44.17%, 同等浓度下, 超声提取挥发油的清除率为 3.03%~26.20%, 索氏提取挥发油的清除率为 6.83%~34.6%.

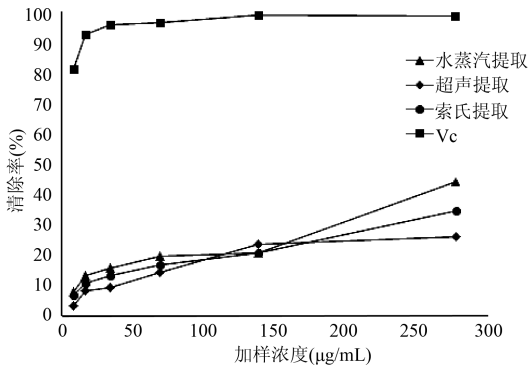


图 1 不同提取方法所得挥发油对 DPPH 清除能力的影响

Fig. 1 Determination of antioxidant activities of volatile oil from different extracts methods by DPPH

还原能力的测定实验中,  $\text{Fe}^{3+}$  被还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  的生成量可以通过生成的普鲁士蓝在 700 nm 处的吸光值作为考察指标。结果(图 2)显示还原能力的高低与提取物浓度的大小存在明显的线性关系。线性关系中 BHT、索氏提取、超声提取、水蒸汽提取的决定系数  $R^2$  分别是 0.9931、0.9963、0.9940、0.9974, 斜率分别为 0.00226、0.00149、0.00061、0.00032, 斜率的高低直观的展现了还原能力的强弱, 索氏提取法挥发油表现出最强的还原能力, 超声提取的还原能力次之, 水蒸汽提取的还原能力最弱。

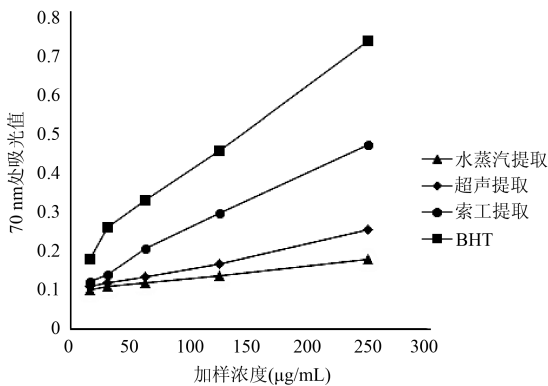


图 2 不同提取方法所得挥发油的还原力测定

Fig. 2 Determination of antioxidant activities of volatile oil from different extracts methods by reducing power

T-AOC 实验中, 将各提取物稀释 50 倍, 结果显示索氏提取的挥发油表现出较好的抗氧化能力, 索氏提取、超声辅助提取及水蒸汽提取中挥发油抗氧化能力分别是 14.21 mg、11.04 mg 和 8.63 mg。

## 4 讨论

水提挥发油成分及含量与王晓萌<sup>[7]</sup>结果的差异表明材料的处理方式对结果有一定的影响。王晓萌<sup>[7]</sup>采用自然阴干, 过 40 目筛的方式处理材料, 而在本次实验中所使用的藏红花经采撷后立即置于烘箱中 50℃ 快速烘干, 过 10 目筛, 避光冷藏保存。有效成分种类及含量的增加可能有点原因。1、材料需保持新鲜 2、材料存放时间不宜过长 3、快速烘干比自然阴干损失率低 4、材料粉碎程度不宜过细, 过细的粉末容易在水蒸汽提取过程中产生糊化现象, 影响提取率。水提挥发油在自由基清除实验中清除率达 44.17%, 高于其它两种提取方式, 且水蒸汽蒸馏法提取中藏红花醛含量高达 40.31%, 现代研究表明在小鼠实验中发现藏红花素和藏红花醛是引起小鼠降血压的重要物质, 而且藏红花醛的作用大于藏红花素, 近些年还发现藏红花醛具有明显的抗癌作用<sup>[14]</sup>, 这对于藏红花废弃物的利用具有重要意义。超声辅助提取的挥发油得率中等, 鉴定出的组分大部分为烷烃类, 少量脂肪酸类, 其抗氧化效果低于索氏提取。索氏提取的挥发油得率最高为 6.04%, 鉴定出的组分大部分为烷烃类, 抗氧化实验中对于还原力的测定, 及 T-AOC 测定中均表现最好的效果, 与成分中含有不饱和脂肪酸有关。藏红花废弃物具有潜在的商业价值, 在工业生产中应以目标为导向选取合适的生产方式, 若利用藏红花醛等有益成分, 进一步开发其药用价值应选用水提的方式, 若利用废弃物抗氧化能力则可使用索氏提取的方式获得目标产物。

## 5 结论

本次研究通过三种提取方式初步探究了藏红花花瓣及雄蕊挥发油的成分及活性, 为藏红花的合理开发及利用奠定了基础。藏红花花瓣及雄蕊的再利用仍有巨大的研究空间, 有待于进一步探究。

## 参考文献:

- [1] Christodoulou E, Kadoglou N P, Kostomitsopoulos N, *et al.* Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. [J]. J Pharm Pharmacol, 2015, 67: 1634.
- [2] 陈书安, 王晓东, 赵兵, 等. 藏红花的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32: 1137.
- [3] Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-

- term potentiation [J]. *Phytother Res*, 2000, 14: 149.
- [4] Escribano J, Alonso G L, Coca-Prados M, *et al.* Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro[J]. *Cancer Lett*, 1996, 100: 23.
- [5] Hossein Hosseinzadeh H M Y. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice[J]. *BMC Pharmacol*, 2002, 2: 7.
- [6] Sariri R, Sabbaghzadeh R, Poumohamad F. In-vitro antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from *Crocus sativus* flowers[J]. *Pharmacologyonline*, 2011, 3: 1.
- [7] 王晓萌, 叶扬, 周双, 等. 藏红花花瓣和雄蕊挥发油化学成分 GC-MS 分析及比较[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24: 1239.
- [8] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [9] Compton D L, Laszlo J A, Evans K O. Antioxidant properties of feruloyl glycerol derivatives [J]. *Ind Crops Prod*, 2012, 36: 217.
- [10] 黄秋兰, 付饶, 郭亦然, 等. 麻疯树叶多酚的提取及其抗氧化作用[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50: 404.
- [11] He J, Huang B, Ban X, *et al.* In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141: 104.
- [12] Fu R, Zhang Y, Guo Y, *et al.* Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas*, L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant[J]. *Ind Crops Prod*, 2014, 58: 265.
- [13] Kim J, Park I K. Fumigant toxicity of Korean medicinal plant essential oils and components from *Asiasarum sieboldi* root against *Sitophilus oryzae* L. [J]. *Flavour Fragr J*, 2010, 23(2):79.
- [14] Peana A T, D'Aquila P S, Panin F, *et al.* Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(8): 721.