

不同杀青方式对栀子有效成分及体外抗氧化活性的影响

潘媛^{1,2,3}, 谭均^{1,2,3}, 陈大霞^{1,2,3}, 宋旭红^{1,2,3}, 李隆云^{1,2,3*}

¹重庆市中药研究院; ²中国中医科学院中药资源中心重庆分中心;

³重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

摘要:为明确栀子的最佳杀青方法和时间,本研究设置不同杀青方式处理样品,采用 HPLC、DPPH、FRAP、OH 法评价其对栀子药材质量及体外抗氧化活性的影响。结果表明:不同的杀青方式对栀子药材质量及体外抗氧化活性有不同程度的影响。以沸水煮杀青 9 min 栀子苷和绿原酸含量最高,热风 105 °C 杀青 12 min 西红花苷含量最高;蒸汽蒸 15 min 对 DPPH 清除能力显著强于其他处理,沸水煮 9 min 对 Fe³⁺ 的还原能力和羟自由基的清除能力显著高于其他处理。综合考虑药材质量、抗氧化活性,栀子杀青以沸水煮 9 min 为宜,本研究为栀子初加工过程中的质量控制提供一定的理论依据。

关键词: 栀子; 杀青; 有效成分; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2; R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.9.002

Effects of Different Fixing Methods and Time on Content of Active Component and Antioxidant Activity in *Gardenia jasminoides* Ellis

PAN Yuan^{1,2,3}, TAN Jun^{1,2,3}, CHEN Da-xia^{1,2,3}, SONG Xu-hong^{1,2,3}, LI Long-yun^{1,2,3*}

¹Chongqing Academy of Chinese Material Medica; ²Chongqing Subcenters of

Traditional Chinese Medicine Resource Center and China Academy of Chinese Medical Science;

³Chongqing Research Center of Techniques and Engineering for Chinese

Material Medica Fine Variety Breeding and Evaluation, Chongqing 400065, China

Abstract: In order to determine the best fixation method and time for gardenia, we set up different ways to fix the samples and evaluated the effects of HPLC, DPPH, FRAP and OH method on the quality and the antioxidant activity of *Gardenia jasminoides*. The results showed that: The effect of different methods of fixing on the quality of Gardenia and the antioxidant activity *in vitro* is different. The content of geniposide and chlorogenic acid were the highest in FZ-9, the content of crocin was the highest in RF-12, and the DPPH scavenging ability in Z-15 was significantly stronger than other treatments, FZ-9 on the reduction ability of Fe³⁺ and hydroxyl radical scavenging capacity was significantly higher than other treatments. Taking into account the content, antioxidant activity, resource utilization, the appropriate methods was FZ-9. It will provide a theoretical basis for establishing a standardized initial processing method for *Gardenia jasminoides*. Ellis.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; fixation; active component; antioxidant activity

栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)是茜草科栀子属一种常绿灌木,又名黄栀子、山栀子、红栀子等,主产于江西、湖南、福建、四川、重庆等省市。栀子的果实(也称栀子)是我国传统中药,属卫生部颁布的第一批药食两用资源。栀子中含有环烯醚萜类、黄酮类、有机酸类、色素类等化学成分,具有泻火除烦、清

热利尿、凉血解毒、消肿止血等作用,在中医临床治疗中有广泛应用^[1,2]。

2015 版药典中栀子的采收加工方法为“9~11 月果实成熟呈红黄色时采收,除去果梗和杂质,蒸至上气或置沸水中略烫,取出,干燥”^[1]。“蒸至上气或置沸水中略烫”,这一传统的杀青炮制工艺操作过程较模糊,没有一个明确的量化标准,生产上急需对栀子的杀青工艺进行规范,且杀青方式对栀子的抗氧化活性影响尚不清楚。本研究通过比较不同杀青方式对栀子药材质量及其体外抗氧化活性的影响,为筛选栀子适宜的杀青方法,也为栀子初加工过

收稿日期:2018-01-02 接受日期:2018-08-23

基金项目:重庆市重点产业共性关键技术创新专项(cstc2016zdcy-ztx10003);国家中药材产业技术体系(CARS-21);重庆市中药材产业技术体系(2018-[5]号);重庆市“科技平台与基地建设”项目(cstc2014pyjd10001)

* 通信作者 Tel:86-23-89029118; E-mail:lilongyun8@163.com

程中的质量控制提供一定的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药材

新鲜栀子于 2016 年 11 月采自重庆市巴南区安澜镇栀子种植基地,均为 7 年生植株,经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为茜草科栀子属植物栀子的果实。为避免植株之间的差异,每个平行样品都来自同一植株。

1.2 试剂

栀子苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,中国;批号 MUST-14042110,PUTITY: $\geq 98\%$)、西红花苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,中国;批号 MUST-14060905,PUTITY: $\geq 98\%$)、绿原酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,中国;批号 MUST-12031401,PUTITY: $\geq 99\%$)、乙腈、甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司;中国);DP-PH、TPTZ(Solarbio 公司,中国);硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、过硫酸钾、铁氰化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、三氯乙酸、三氯化铁,均为分析纯。

1.3 仪器

BS223S 型万分之一电子天平(Sartorius 公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(Agilent 公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水仪(Millipore 公司);Tecan Infinite F 200 型多功能酶标仪(TECAN 公司)。

2 方法

2.1 药材处理方法

本试验共设置 3 种杀青方式:热风 105 °C、蒸汽蒸、沸水煮;设置 5 种杀青时间:3、6、9、12、15 min;设置不杀青为空白对照。以上样品杀青完毕后均放

入 50 °C 热风中干燥,干燥后将栀子粉碎过 60 目筛,待测。

2.2 有效成分测定

栀子有效成分的测定参照潘媛等^[3]的方法并作修改。采用高效液相色谱仪测定栀子主要有效成分:栀子苷、西红花苷和绿原酸。色谱柱:WATERS Symmetry (C18250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);以乙腈为流动相 A,甲醇为流动相 B,以 0.1% 三氟乙酸溶液为流动相 C,按下表中的规定进行梯度洗脱(见表 1);栀子苷检测波长为 238 nm,西红花苷检测波长为 440 nm,绿原酸检测波长为 326 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量 10 μ L,色谱图见图 1。方法学考察结果显示栀子苷精密度、稳定性、重复性 RSD 值分别为 0.999%、1.145%、0.172%,加样回收率分别为 95.47%、1.96%;西红花苷精密度、稳定性、重复性 RSD 值分别为 0.999%、1.641%、0.746%,加样回收率分别为 96.20%、1.40%;绿原酸精密度、稳定性、重复性 RSD 值分别为 0.999%、1.265%、1.076%,加样回收率分别为 95.99%、1.56%。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The program of gradient elution

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)	流动相 C Mobile phase C (%)
0	5	5	90
5	5	5	90
10	10	5	85
18	10	5	85
30	25	5	70
40	25	5	70
50	65	5	30
52	70	5	25
60	95	5	0

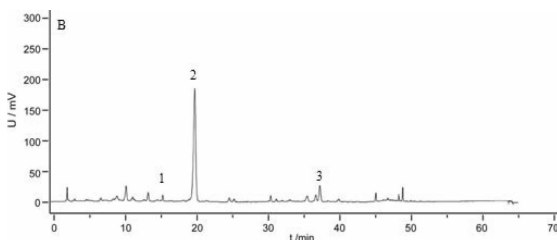
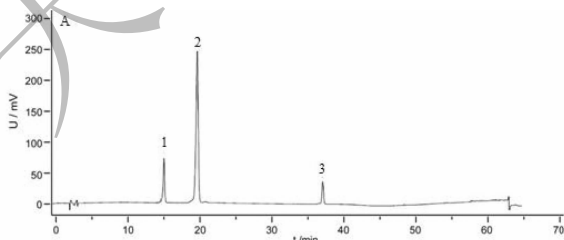


图 1 对照品(上)和供试品(下)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of substances (left) and sample (right) of Gardeniae Fructus

注:1 为绿原酸,2 为栀子苷,3 为西红花苷。

Note: 1 indicates chlorogenic acid, 2 indicates Geniposide, 3 indicates crocin.

2.3 体外抗氧化活性测定

2.3.1 样品制备方法

准确称取栀子干燥样品粉末 1.00 g, 加入 40 mL 甲醇, 称定重量, 于锥形瓶中在功率为 300 W 的条件下超声 40 min, 放至室温后, 再称定重量, 用甲醇补足缺失重量, 摇匀后将混合液进行真空抽滤, 得澄清溶液。

2.3.2 总抗氧化能力的测定(FRAP 值测定)^[4]

取“2.3.1”项下样品溶液, 适当稀释后移液器取 100 μ L, 加入 FRAP 工作液 3 mL, 混匀反应 20 min, 于 593 nm 处读取吸光度。以 FeSO_4 为标准物质绘制标准曲线, 样品的抗氧化能力以 FRAP 值表示; 1 FRAP 单位 = 1 mmol/L FeSO_4 , 即样品的抗氧化能力相当于 FeSO_4 的 mmol/L 数。

2.3.3 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力的测定参照徐晶晶等^[5,6]的方法并作修改。吸取“2.3.1”项下样品溶液 2 mL, 加入 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液, 振荡均匀, 室温下避光反应 30 min, 后于 517 nm 处分别测定空白对照甲醇溶液和反应液的吸光度 A_0 与 A_i 。

DPPH 自由基清除率(%) = $[(A_0 - A_i) / A_0] \times 100$

2.3.4 OH 自由基清除能力的测定

OH 自由基清除能力的测定参照陈慧等^[7]的方法并作修改。吸取“2.3.1”项下样品溶液 2 mL, 依次加入 2 mL 6 mmol/L 硫酸亚铁和 6 mmol/L 双氧水溶液, 振荡均匀, 室温下避光反应 10 min 后, 再加入 2 mL 6 mmol/L 水杨酸溶液, 振荡均匀, 室温下避光反应 30 min 后于 510 nm 处测定吸光度 A_i , 以蒸馏水代替提取液测定吸光度 A_0 , 同时以蒸馏水代替水杨酸测定吸光度 A_j 。

OH 自由基清除率(%) = $[(A_0 - A_i + A_j) / A_0] \times 100$

2.4 数据分析

实验数据采用 SPSS 20.0 软件统计进行方差分

析, 用 Duncan 法检验差异的显著性, Excel2007 进行制表绘图。

3 结果与分析

3.1 不同杀青方式对栀子中栀子苷含量的影响

不同杀青方式对栀子中栀子苷含量的影响见表 2。可见, 不同杀青方式对栀子中栀子苷含量影响显著。热风 105 $^{\circ}\text{C}$ 杀青条件下, 栀子中栀子苷的含量随杀青时间延长先升高后降低, 杀青 12 min (RF-12) 时含量最高, 达 4.035%, 再随时间延长, 栀子苷含量降低; 沸水煮条件下, 栀子中栀子苷含量变化趋势先升高后降低, 杀青 9 min (FZ-9) 时含量显著高于其他处理, 再随时间延长栀子苷含量降低; 蒸汽蒸条件下, 栀子苷含量变化趋势同沸水煮, 先升高后降低, 杀青 9 min (Z-9) 含量最高; 不杀青直接烘干方式 (CK) 含量显著低于其他杀青方式 ($P < 0.05$)。

3.2 不同杀青方法及时间对栀子中西红花苷含量的影响

不同杀青方法及时间对栀子中西红花苷含量的影响见表 2。不杀青直接烘干方式西红花苷含量显著低于其他杀青方式; 其余三种杀青方式西红花苷含量变化趋势呈先升高后降低, 都在杀青 9 min 和 12 min 之间含量达到最高; 其中沸水煮热风 105 $^{\circ}\text{C}$ 杀青 12 min 处理的西红花苷含量显著高于其他杀青方式 ($P < 0.05$)。

3.3 不同杀青方法及时间对栀子中绿原酸含量的影响

不同杀青方法及时间对栀子中绿原酸含量的影响见表 2。三种杀青方式的含量变化也随时间呈先升高后降低趋势, 但是不同于栀子苷和西红花苷的是沸水煮和热风 105 $^{\circ}\text{C}$ 都在杀青 6 min 时含量达到最高; 该杀青方式绿原酸含量显著高于其他杀青方式 ($P < 0.05$), 达 0.126%。

表 2 不同杀青方法及时间对栀子有效成分含量的影响 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of different fixing methods and time on content of active component in Gardeniae Fructus ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

杀青方式 Fixation method	栀子苷 Geniposide (%)	西红花苷 Crocin (%)	绿原酸 Chlorogenic acid (%)
RF-3	3.842 \pm 0.120 cde	1.285 \pm 0.011 ab	0.073 \pm 0.015 abc
RF-6	3.564 \pm 0.110 de	1.283 \pm 0.009 ab	0.076 \pm 0.007 abc
RF-9	3.775 \pm 0.137 cde	1.306 \pm 0.001 ab	0.055 \pm 0.005 c
RF-12	4.053 \pm 0.267 abcd	1.317 \pm 0.058 a	0.058 \pm 0.006 bc

续表 2(Continued Tab. 2)

杀青方式 Fixation method	栀子苷 Geniposide (%)	西红花苷 Crocin (%)	绿原酸 Chlorogenic acid (%)
RF-15	3.715 ± 0.094 cde	1.287 ± 0.022 ab	0.045 ± 0.009 c
FZ-3	4.316 ± 0.538 abc	1.290 ± 0.019 ab	0.123 ± 0.007 ab
FZ-6	4.373 ± 0.164 abc	1.282 ± 0.011 ab	0.126 ± 0.037 a
FZ-9	4.786 ± 0.306 a	1.315 ± 0.035 a	0.088 ± 0.028 abc
FZ-12	4.744 ± 0.412 ab	1.311 ± 0.008 a	0.079 ± 0.056 abc
FZ-15	4.252 ± 0.157 abcd	1.286 ± 0.038 ab	0.071 ± 0.025 abc
Z-3	3.940 ± 0.263 cd	1.255 ± 0.049 ab	0.065 ± 0.016 abc
Z-6	4.027 ± 0.049 bcd	1.272 ± 0.005 ab	0.106 ± 0.003 abc
Z-9	4.386 ± 0.122 abc	1.299 ± 0.008 ab	0.087 ± 0.007 abc
Z-12	4.142 ± 0.229 abcd	1.298 ± 0.014 ab	0.078 ± 0.025 abc
Z-15	3.877 ± 0.279 cde	1.271 ± 0.043 ab	0.069 ± 0.011 abc
CK	3.182 ± 0.193 e	1.223 ± 0.030 c	0.061 ± 0.004 abc

注:RF 代表热风 105 °C 杀青;FZ 代表沸水煮杀青;Z 代表蒸汽杀青;CK 代表不做杀青处理,数字代表杀青时间。小写字母“a、b、c、d、e”表示不同杀青方式间的差异显著性($P < 0.05$)。

Note:RF is behalf of the hot air 105 °C to kill;FZ is behalf of boiled water boil;Z is behalf of steamed green;CK is not done to kill the handle,the figure represents the fixing time. “a、b、c、d、e、f” indicated there was a significant difference between different fix method.

3.4 不同杀青方式及时间对栀子体外抗氧化活性的影响

3.4.1 对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)清除能力的影响

不同杀青及温度栀子对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)清除能力的影响见图 2。不杀青处理对 DPPH 的清除能力最弱,热风 105 °C 杀青 15 min(RF-15)其次;蒸汽蒸 15 min(Z-15)对 DPPH 清除能力显著强于其他处理($P < 0.05$);其余处理差异未达到显著水平。

3.4.2 对总抗氧化能力(FRAP)的影响

不同杀青方式中,热风 105 °C 杀青 9 min(RF-

9)、沸水煮 9 min(FZ-9)和蒸汽蒸 9 min(Z-9)还原 Fe^{3+} 的能力较强,其中沸水煮 9 min(FZ-9)的还原能力显著高于其他处理($P < 0.05$);不杀青处理(CK)的还原 Fe^{3+} 的能力显著低于其他处理($P < 0.05$)。

3.4.3 对羟自由基清除能力的影响

不同杀青方式中,沸水煮 9 min(FZ-9)和沸水煮 12 min(FZ-12)对羟自由基清除能力显著强于其他处理($P < 0.05$),以沸水煮 9 min(FZ-9)的清除能力最强,随着杀青时间的延长,对羟自由基的清除能力逐渐减弱;不杀青处理(CK)对羟自由基清除能力最弱。

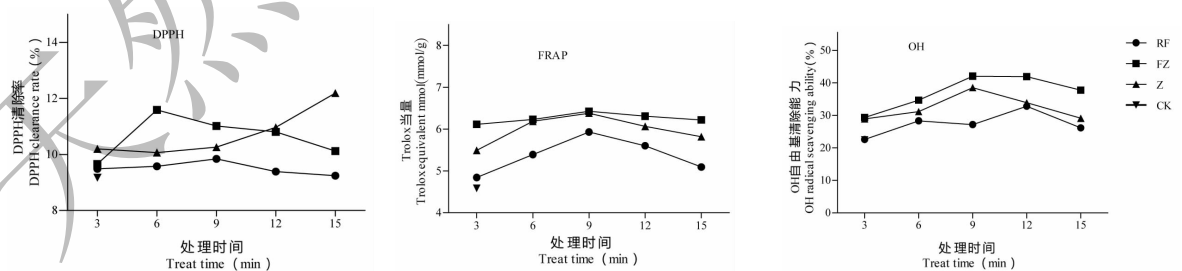


图 2 不同杀青方式及时间对栀子抗氧化活性的影响

Fig. 2 Effects of different fixing methods and time on antioxidant activity in Gardeniae Fructus

4 结论

“杀青”是利用高温迅速破坏鲜药中的各类酶

活性,抑制相应化学成分的酶促氧化反应及水解反应等。杀青过程产生的热化学变化可去除新鲜生物体或鲜活药用部位具有的不适气味,促进含有的低

沸点芳香类物质挥发减少或消失,以改善药性;有利于促进芳香醇类等物质转化形成中药特有的药香气味和形色,达到形成其性状、提高其品质和利于临床疗效的目的^[8,9]。目前栀子药材的产地加工方法有水煮后晒干、蒸汽杀青和沸水浸煮等,但对各种杀青方式进行优化的研究较少,各地区根据实际情况采用不同的杀青方法,多以经验为主^[10]。

由实验结果可知,不同的杀青方式及时间对栀子中的有效成分有不同程度的影响。沸水煮杀青 9 min 栀子苷含量最高,达 4.786%,不杀青直接烘干栀子苷含量最低,仅有 3.182%;热风 105 ℃ 杀青 12 min 西红花苷含量最高,达 1.317%,不杀青直接烘干西红花苷含量最低,仅有 1.223%;沸水煮杀青 9 min 绿原酸含量最高,达 0.126%。可见,杀青是栀子初加工过程中的必须步骤,通过杀青灭活栀子中各类酶,降低其对次生代谢产物的分解;再者栀子外表较厚,高温杀青时间较短不能有效降低各类酶的活性,不能有效防止各类酶在后期烘干中对次生代谢产物的分解,降低药材的药效。

研究表明栀子中的栀子苷、西红花苷等成分具有较强的抗氧化活性^[11,12]。药材在入药时,并不是单一成分在起作用,而是多种成分叠加而发挥药效。故本研究选取了栀子药材醇提液作为研究基础,试图揭示栀子药材的综合抗氧化能力。本研究分别采用 DPPH 法、FRAP 法和 OH 法研究了不同杀青方式及时间对栀子抗氧化能力的影响。3 种方法侧重点不同,能够更全面衡量被测物的抗氧化活性。结果表明,蒸汽蒸 15 min 对 DPPH 清除能力显著强于其他处理,沸水煮 9 min 对 Fe³⁺ 的还原能力显著高于其他处理,沸水煮 9 min 对羟自由基的清除能力最强。栀子中抗氧化活性成分以西红花苷和栀子苷为主,并且由于各杀青处理对栀子的其他有效成分有不同程度的影响,造成了抗氧化活性与有效成分的变化存在差异。虽然某类物质含量高确实会有较强的抗氧化能力,但并非全是这样,研究中需要同时考虑植物提取物各类化学成分^[13]。而杀青方式对不同类型抗氧化成分的含量产生了影响,最终表现为不同杀青方式的栀子抗氧化活性不一致。针对以上结果,还需要进一步展开对栀子抗氧化活性的谱效关系研究。

综上所述,栀子产地加工中的“杀青”是该类药材生产的重要环节,直接影响栀子药材品质的形成。然而在实际生产中,栀子杀青方式较多,基于本研究

结果,以沸水煮 9 min 的杀青方式为宜,本研究为栀子初加工过程中的质量控制提供一定的理论依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:173.
- 2 Liu HP(刘和平), Xu Y(许彦), Shang Q(尚强). Content variations of crocin I, crocin II and gardenoside in *Gardenia jasminoides* var. *grandiflora* with different harvesting times[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1333-1338.
- 3 Pan Y(潘媛), Song XH(宋旭红), Wang Y(王钰). Inorganic elements content in soil and Gardeniae Fructus collected in different region and correlation with effective components[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2018, 30:451-460.
- 4 Kang WY(康文艺), Li CF(李彩芳), Song YL(宋艳丽). Study on antioxidant ketone component of cicada wing vine [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2008, 33: 1982.
- 5 Xu JJ(徐晶晶), Liu B(刘斌). Study on antioxidant effects of peppermint medicinal herbs based on DPPH and FRAP methods[J]. *J Beijing Univ TCM*(北京中医药大学学报), 2015, 38:405-410.
- 6 Zhang X(张霞), Zhang F(张芳), Gao XJ(高晓娟), et al. Effect of different drying methods on content and antioxidant activity of the active components in *Lycium barbarum*[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42:3926-3931.
- 7 Chen H(陈慧), Sheng DD(盛丹丹), Wang WJ(王文君). Study on the components and antioxidant activity of extracts from gold tea alcohol[J]. *Modern Food Sci & Tec*(现代食品科技), 2017, 33(1):26-32.
- 8 Jin XY(金心怡), Chen JB(陈济斌), Ji KW(吉克温). Tea processing project[M]. Beijing: China Agricultural Press(中国农业出版社), 2003:56-60.
- 9 Duan JA(段金廛), Su SL(宿树兰), Yan H(严辉), et al. Discuss on the links of "greening" and the quality of medicinal materials in the primary processing of medicinal materials [J]. *J Chin Mate Med*(中药材), 2011, 34(1):1-4.
- 10 Gao XY(高晓艳), Xiao W(肖伟), Xu HJ(徐海娟), et al. Effects of different steaming time on quality of Gardeniae Fructus[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(15):35-36.