

研究报告 Original Papers

不同产地番红花活性物质的代谢组学研究

王然¹, 卢晓慧^{2,3}, 刘永胜^{1,3}, 王一君^{4,*}, 岳俊阳^{1,5,*}¹合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥230601²嘉兴职业技术学院信息技术分院, 浙江嘉兴314036³安徽农业大学园艺学院, 合肥230036⁴安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥230036⁵合肥工业大学计算机与信息学院, 合肥230601

摘要: 采用液相色谱-质谱联用的代谢组学技术分析了安徽亳州和浙江嘉兴两地所产番红花(*Crocus sativus*)的主要代谢活性物质种类和数量的差异, 结果表明, 不同产地番红花中主要活性物质的种类大体相同, 但其数量差异显著。安徽亳州产番红花较浙江嘉兴产番红花能够积累更多的番红花醛、番红花酸和番红花甙, 说明不同的生长环境对番红花的内在品质产生了很大的影响。进一步比较发现传统的加热烘干处理方法明显损失番红花醛、番红花酸和番红花甙等活性物质, 但同时增加了部分风味氨基酸的含量。本研究为选择番红花栽培环境和改良其加工技术提供基础数据。

关键词: 番红花; 代谢组学; 类胡萝卜素类物质; 多元统计分析

番红花(*Crocus sativus*)又称西红花、藏红花, 是鸢尾科番红花属的多年生球根类草本植物(黄一泓等2013), 原产于欧洲南部地中海沿岸地区, 在希腊、西班牙和伊朗等国家一直有大面积种植。新中国成立以来, 我国江苏、上海、浙江、安徽等地陆续开展了广泛的引种栽培。番红花在我国是珍稀名贵中药材, 药用价值独特, 经济价值较高, 已被列为重点发展的中药材品种。

据《中华人民共和国药典》记载, 番红花具有活血化瘀、消肿止痛、舒经活络、凉血解毒、散郁开结等功效, 可用于预防和治疗血亏体虚、脉管炎、产后瘀阻、脑血栓等疾病(国家药典委员会2010)。现代药理学实验证明番红花提取物能够显著抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡和清除自由基, 起到抗癌、抗抑郁和镇痛的作用, 并且还具有提高免疫力、预防心血管和中枢神经系统疾病等功效(Khorasanchi等2018; 李伟平等2011)。

目前为止, 通过化学分析方法在番红花中总共获得了大约150种挥发性和非挥发性代谢活性物质, 但仅有50种左右得到鉴定(楚溪等2016)。其中, 发挥功效的主要活性物质为类胡萝卜素类物质及其糖苷类衍生物, 包括番红花素(crocin)、番

红花醛(safranal)、番红花酸(crocetin)和番红花甙(picrocrocetin)等。类胡萝卜素类物质是一类重要的天然色素, 广泛存在于各种植物中, 在动物和微生物中也有发现, 具有抗氧化、调节免疫、抵抗癌症和延缓衰老等功效(靳青等2014)。番红花中积累的类胡萝卜素类物质属于萜类化合物, 通过类异戊二烯化合物合成途径合成, 合成途径中的关键酶基因 β -LCY、BCH、CCD及相关小RNA的克隆和调控机理研究一直备受关注(卢晓慧等2018; Ahrazem等2015; Frusciante等2014)。调控这些基因的表达能直接影响番红花中类胡萝卜素类物质的生物合成含量, 进而影响番红花的内在品质。

番红花的品质不仅受到内在遗传因素的控制, 还受到诸多外部因素的影响, 如环境温度、年降水量、管理条件和栽培方式等(D'Archivio和Maggi 2017)。Ward等(2003)对不同地点种植的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)进行了代谢组学比较研究, 发现不同的生长环境对拟南芥中氨基酸、糖等物

收稿 2020-02-01 修定 2020-03-10

资助 安徽省自然科学基金(1808085QC68)。

* 共同通讯作者: 王一君(yijun@ahau.edu.cn)、岳俊阳(aaran.yue@gmail.com)。

质的合成积累有较大的影响。曾超珍等(2017)也对茶树(*Camellia sinensis*)采摘部位、季节、产地和加工等外部因素与茶叶化学成分和品质的关系进行了系统性的综述,发现这些因素均会不同程度改变茶叶中的代谢物种类或含量。可见生长环境不同,各产地的番红花在品质和风味上也会形成其独特之处。因此,本课题借助代谢组学技术系统分析了两个不同地区生产的番红花中主要活性物质的形成差异,并进一步阐明了这些活性物质在花丝烘干加工过程中的变化特点。

1 材料与方法

1.1 材料

本文所用番红花(*Crocus sativus* L.)均采自具有10年以上成功种植经验的基地,分别为安徽亳州兵涛种植基地和浙江嘉兴天禾农村合作社。采收时均选择正常盛开的花朵,并及时摘取花朵中的花丝(本文中花丝指雌蕊柱头,是番红花的药用部位)。一部分花丝装入无菌保鲜袋中并迅速放置于冰上带回实验室,作为新鲜花丝实验组进行后续实验;剩余花丝在30 min内烘干,作为成品干花丝实验组。每个实验组内同时准备6个重复样品。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

取安徽亳州新鲜花丝(BX)、安徽亳州成品干花丝(BG)、浙江嘉兴新鲜花丝(JX)和浙江嘉兴成品干花丝(JG)共4个实验组的冻干样品,研磨成粉。精密称取50 mg样品粉末,加入800 μ L 4 $^{\circ}$ C预冷的体积分数为70%的甲醇溶液,涡旋60 s;然后在25 $^{\circ}$ C超声提取40 min,期间每隔20 min取出涡旋60 s;接着在4 $^{\circ}$ C条件下12 000 \times g离心15 min,取上清液装入进样小瓶待测。

1.2.2 色谱分析

所有色谱分离均使用超高效液相色谱(UPLC)系统(英国SCIEX)进行。使用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m, 英国沃特世)进行反相分离。柱箱温度保持在35 $^{\circ}$ C。流速为0.4 mL \cdot min $^{-1}$,流动相由溶剂A (25 mmol \cdot L $^{-1}$ 乙酸铵+25 mmol \cdot L $^{-1}$ 氨水)和溶剂B (体积分数为89.9%的异丙醇+体积分数为10%的丙烯腈+体积

分数为0.1%的甲酸)组成。梯度洗脱程序设定为:0~0.5 min,体积分数为95%的B;0.5~9.5 min,体积分数为65%~95%的B;9.5~10.5 min,体积分数为40%~65%的B;10.5~12 min,体积分数为40%的B;12~12.2 min,体积分数为40%~95%的B;12.2~15 min,体积分数为95%的B。每个样品的进样量为4 μ L。

1.2.3 质谱分析

使用高分辨率串联质谱仪TripleTOF 5600 plus(英国SCIEX)检测从色谱柱洗脱的代谢物。四级杆-飞行时间(quadrupole-time of flight, Q-TOF)串联质谱以正离子和负离子模式运行。气帘设置为30 lbf \cdot in $^{-2}$ (简称PSI;约合206.8 kPa),离子源气体1设置为60 lbf \cdot in $^{-2}$ (约合413.7 kPa),离子源气体设置为60 lbf \cdot in $^{-2}$,界面加热器温度为650 $^{\circ}$ C。质谱数据以数据依赖型扫描(information dependent acquisition, IDA)模式获取。TOF质量范围为60~1 200 Da。总循环时间固定为0.56 s。通过监视具有四阳极/通道检测的40 GHz多通道时间数字转换模式(time to digital convert, TDC)检测器,以11 kHz的脉冲频率将每个扫描的4个时间总和相加。动态排除设置为4 s。在采集过程中,每20个样品校准一次质量精度。

1.2.4 非靶向代谢物分析

使用XCMS在线工具(<https://xcmsonline.scripps.edu>)对采集的质谱数据进行预处理,包括峰选择、峰分组、保留时间(retention time, RT)校正、第2次峰分组以及同位素和加合物的注释。结合RT和质荷比(mass to charge ratio, m/z)数据鉴定每个离子。记录每个峰的离子信号强度(个 \cdot s $^{-1}$, counts per second, CPS),并生成一个三维矩阵,其中包含样品名称、RT与 m/z 组成的峰特征和离子信号强度。处理后的数据先导入XCMS在线工具进行主成分分析(principal components analysis, PCA),再导入OmicShare云平台进行正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA),并使用OPLS-DA的置换检验(permutation test)对模型的可靠性进行验证。根据分析结果,找出差异性代谢物,然后借助MetaboAnalyst工具(<http://www.metaboanalyst.ca>)进行差异代谢物含量及相关性分析。最后运用Origin软件(版

本8.0, 美国)对不同实验组中番红花样品的生物活性物质相对含量进行统计分析。

2 实验结果

2.1 代谢数据分析

运用XCMS在线工具对安徽亳州新鲜花丝、安徽亳州成品干花丝、浙江嘉兴新鲜花丝和浙江嘉兴成品干花丝共4个实验组24个样品的质谱矩阵数据进行处理。分析发现,总离子流图中4个实验组的峰及其RT几乎是相同的,而整体的峰高和峰面积却呈现明显差异,说明各实验组样品含有活性物质的种类相似,但同一物质的含量差异较大(图1)。结合Metlin数据库比对,对液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)获得的RT、 m/z 和离子信号强度的三维矩阵进行代谢物注释,获得791个能够被数据库注释的代谢物。这些代谢物参与到包括糖类降解、蛋白质合成和脂肪酸合成等200多条代谢途径中。为了进一步确定不同实验组之间的差异,采用多元统计分析将处理后的结果进行PCA,得到的第一主成分和第二主成分在总方差中所占的比重分别为35%和20%(图2)。图2中每个点对应一份样品,同一几何形状的点表示相同的实验组,结果表明各组内样品聚集程度较好,而不同实验组间能被完全分离,说明4个实验组间差异显著。

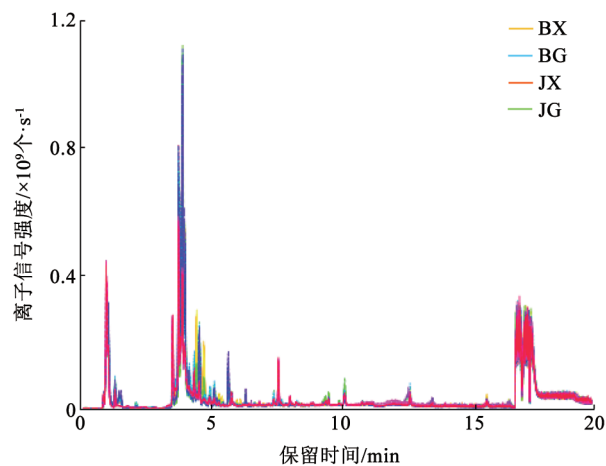


图1 四个番红花实验组样品LC-MS分析的总离子流图
Fig.1 Total ion chromatogram from LC-MS analysis of the four experimental groups in *C. sativus*

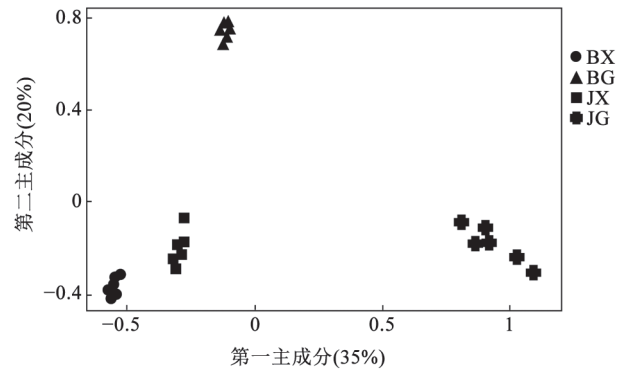


图2 四个番红花实验组样品PCA得分图
Fig.2 PCA analysis of the four experimental groups in *C. sativus*
刻度值代表相对距离。

2.2 两地产番红花中活性物质的差异

2.2.1 基于LC-MS寻找两地产新鲜花丝差异代谢物

对安徽亳州新鲜花丝和浙江嘉兴新鲜花丝进行PCA,得到的第一主成分在总方差中所占的比重为43%,能够将两组样品明显区分(图3-A)。PCA是一种无监督的分析方法,其结果同时反映了组内和组间的差异。为了排除组内差异,突出组间差异,寻找由于产地不同所导致的番红花代谢物的差别,本研究进一步采用了有监督的OPLS-DA对数据进行分析,并建立了番红花中代谢物含量和样品类别之间的关系模型。如图3-B所示,横坐标表示正交信号矫正过程中主要成分的得分值,而纵坐标表示正交成分得分值。可见,安徽亳州新鲜花丝和浙江嘉兴新鲜花丝两组样品之间差异明显,但各组内差异较小。置换检验结果显示OPLS-DA构建的模型参数分别为 $R_x^2=0.719$ 、 $R_y^2=0.996$ 和 $Q^2=0.975$,表明该模型拟合效果较好(图3-C)。通过2个模型相互论证充分说明安徽亳州新鲜花丝和浙江嘉兴新鲜花丝在生长过程中形成了各自不同的特征代谢物。用偏最小二乘法判别分析(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA),设定参数VIP (variable importance on projection) >1 、 $P<0.05$,寻找差异倍数在2倍以上的代谢物,发现安徽亳州新鲜花丝和浙江嘉兴新鲜花丝有110种代谢物的含量存在显著差异。安徽亳州新鲜花丝中含量相对上调的代谢物有39种,浙江嘉兴新鲜花丝中有71种(图3-D)。功能分析表明这些显著差异代谢产物主要参与糖降解和氨基酸降解等代谢途径。

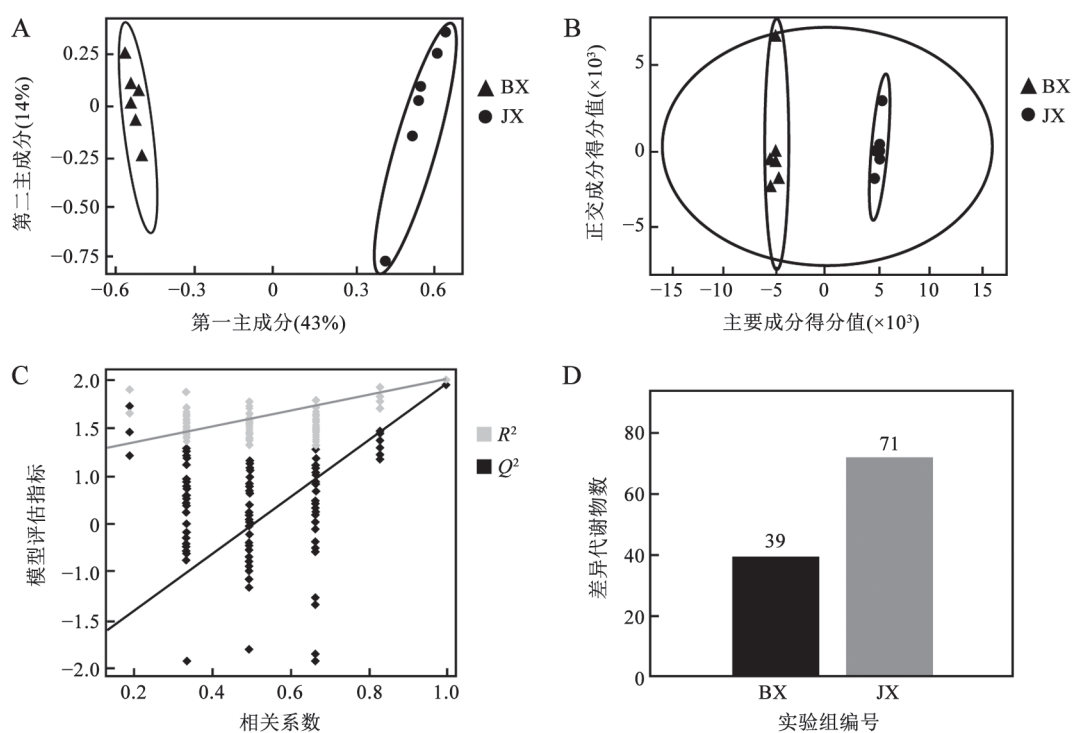


图3 安徽亳州新鲜花丝和浙江嘉兴新鲜花丝代谢组成分析

Fig.3 Analysis of metabolite compositions in the experimental groups BX and JX

A: PCA得分图, 刻度值代表相对距离(图5-A和C同); B: OPLS-DA得分图; C: 置换检验评分图, R^2 表示该模型对X和Y矩阵的解释率, Q^2 表示该模型的预测能力; D: 差异代谢物分析, 柱形代表的数值表示该实验组中含量上调的代谢物数。

2.2.2 主要代谢活性物质差异分析

通过比对Metlin数据库, 获得安徽亳州和浙江嘉兴番红花样品中三种主要活性物质(番红花醛、番红花酸和番红花甙)的谱图特征, 并进一步对这三种物质在不同实验组样品中的含量进行了比较分析。结果表明, 安徽亳州新鲜花丝中番红花醛

和番红花甙的含量均极显著高于浙江嘉兴新鲜花丝(图4-A), 而番红花酸在两组样品中没有显著差异。此外, 安徽亳州成品干花丝中番红花醛、番红花酸和番红花甙的含量也都极显著高于浙江嘉兴成品干花丝, 尤其番红花甙的含量几乎是浙江嘉兴成品干花丝的两倍(图4-B)。无论是新鲜花丝

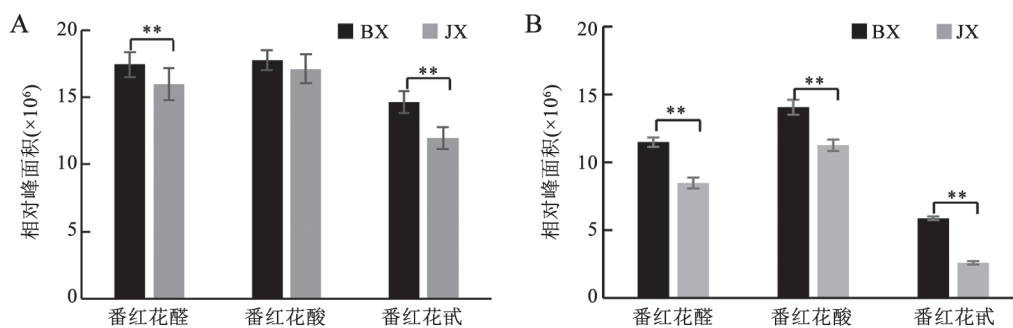


图4 安徽亳州和浙江嘉兴产番红花中三种主要活性物质含量比较

Fig.4 Comparison of the contents of three main active substances in *C. sativus* produced from Bozhou, Anhui and Jiaying, Zhejiang

A: 新鲜花丝; B: 成品干花丝。**表示差异极显著($P < 0.01$), 图6同。

还是成品干花丝, 安徽亳州和浙江嘉兴产番红花中活性物含量呈现出相似的差异, 说明两个产地生产的番红花品质确实存在明显而稳定的差异。

2.3 烘干加工对番红花活性物质的影响

2.3.1 基于LC-MS寻找新鲜花丝和成品干花丝差异代谢物

分析PCA模型图和OPLS-DA模型图发现, 无论是安徽亳州还是浙江嘉兴产番红花, 其新鲜花丝样品和成品干花丝样品可以被明显区分, 表明二者的化学组成差异很大, 说明番红花的代谢产物在烘干过程中发生了明显的变化(图5)。以VIP>1和 $P<0.05$ 为标准, 对差异倍数2倍以上的代谢物进行鉴定, 发现安徽亳州成品干花丝较新鲜花丝有119种差异代谢物, 而浙江嘉兴成品干花丝较新鲜花丝有109种差异代谢物。进一步分析发现, 在两个产地获得的成品干花丝中, 谷胱甘肽、鸟嘌呤、尿嘧啶和4-苯丁氧基苯甲酸等物质含量显著下降, 而

腺嘌呤、天冬氨酸、亮氨酸、组氨酸和谷氨酸等物质的含量都显著提高。

2.3.2 主要代谢活性物质差异分析

通过比对Metlin数据库, 获得番红花新鲜花丝和成品干花丝样品中主要活性物质的谱图特征, 并进一步对其在不同实验组样品中的含量进行了比较分析。如图6所示, 无论是安徽亳州还是浙江嘉兴产的番红花, 成品干花丝中的番红花醛、番红花酸和番红花甙的含量都极显著低于新鲜花丝, 说明本实验所使用的加热烘干方法导致了该类物质的降解。然而在此过程中, 天冬氨酸、亮氨酸、组氨酸和谷氨酸的含量却极显著增加(图7)。

3 讨论

本研究基于LC-MS的代谢组学技术测定并比较了安徽亳州产番红花和浙江嘉兴产番红花所积

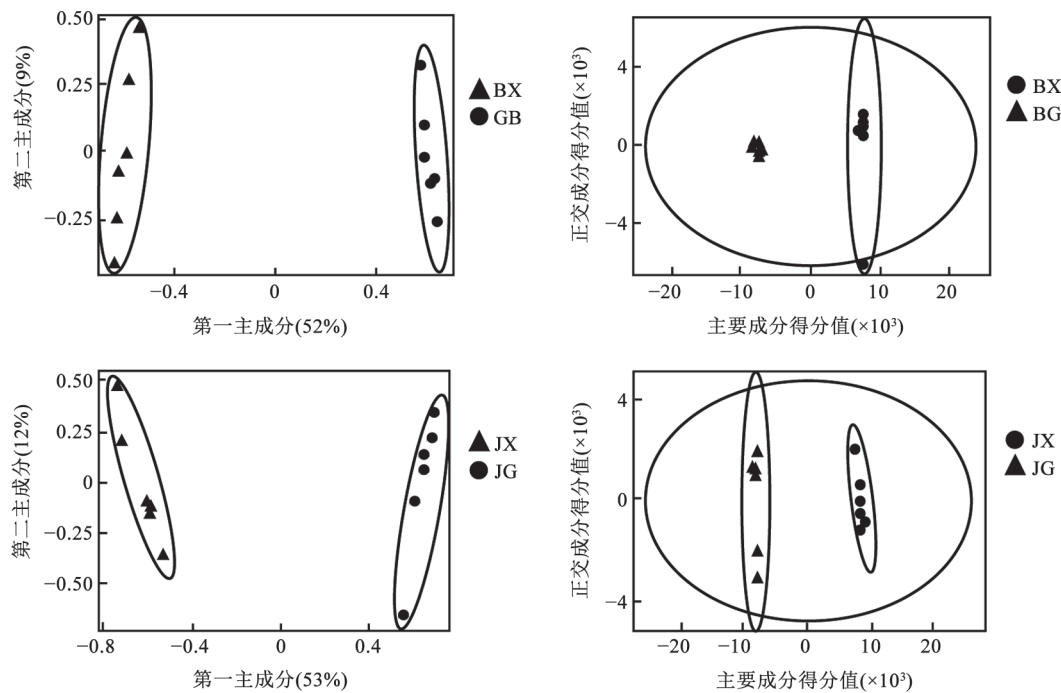


图5 番红花新鲜花丝和成品干花丝代谢组成的多元统计分析

Fig.5 Multivariate statistical analysis of metabolite compositions in the fresh and dry stigmas of *C. sativus*

A: 安徽亳州产番红花PCA得分图; B: 安徽亳州产番红花OPLS-DA分析图; C: 浙江嘉兴产番红花PCA得分图; D: 浙江嘉兴产番红花OPLS-DA分析图。

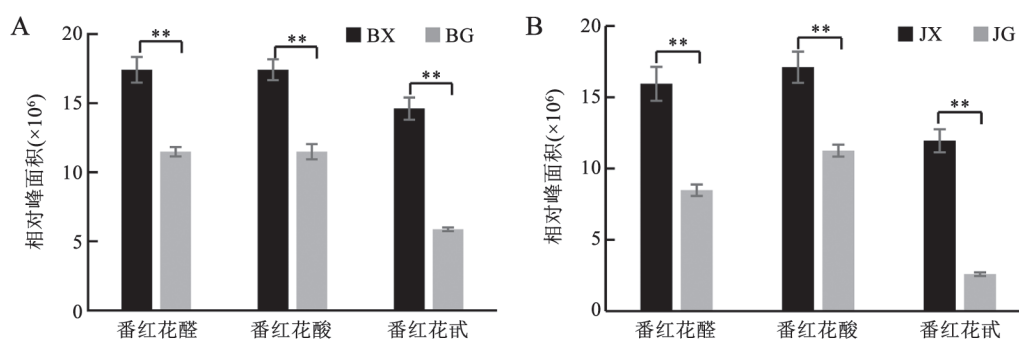


图6 番红花新鲜花丝和成品干花丝中三种主要活性物质含量比较

Fig.6 Comparison of the contents of three main active substances in fresh and dry stigmas of *C. sativus*

A: 安徽亳州产番红花; B: 浙江嘉兴产番红花。

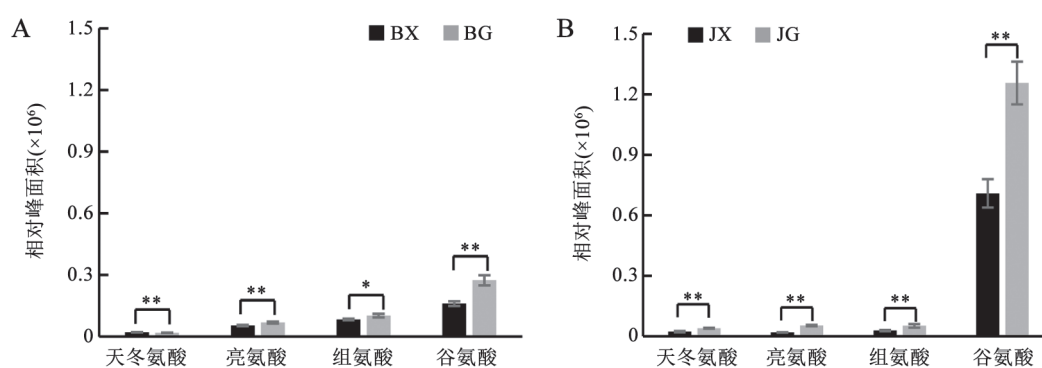


图7 番红花新鲜花丝和成品干花丝中主要氨基酸成分含量比较

Fig.7 Comparison of the contents of major amino acids in fresh and dry stigmas of *C. sativus*A: 安徽亳州产番红花; B: 浙江嘉兴产番红花。*表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)

累活性物质的种类和含量。结合多元统计分析发现, 两地生长的番红花产生的主要活性物质大体一致, 但其含量差异较大。其中, 安徽亳州新鲜花丝含有较高的海藻糖、赖氨酸和精氨酸, 而浙江嘉兴新鲜花丝中谷氨酸、肉桂醇和酪氨酸的含量较高。进一步比较发现, 无论是新鲜花丝还是成品干花丝, 安徽亳州产番红花中番红花酸、番红花醛和番红花甙的积累量均高于浙江嘉兴产番红花, 表明安徽亳州产番红花可能具有更高的药用价值。虽然高丽等(2017)对不同产地番红花的干燥柱头做过类似的研究, 但其中只有一组样品为新鲜采收制备, 其余所取材料多为市售, 缺少明确的产地追踪, 也没有详细的采收时间和加工方式等信息, 因此难以进行比较。

产地影响是一个多种因素综合的作用, 既包

括内在遗传因素(如栽培的品种), 也有自然环境因素(如温度、光照、土壤、降水等), 还涉及人工管理(如栽培的方式)的影响。番红花为三倍体, 有性败育, 只能以球茎进行无性繁殖, 遗传信息极其稳定。我国自20世纪60年代引种番红花以来, 改进了国外传统的粗放型连作栽培方式, 因地制宜, 不断探索, 形成了越年生栽培和室内栽培两种精细的栽培方式(施林妹等2014; 赵婷婷等2005)。其中, 越年生栽培在田间生长开花, 主要适应于北方地区, 而不适合夏季雨水较多的南方地区。鉴于此, 南方地区种植番红花首选室内栽培, 在田间生长后移置到室内培育开花, 避开了南方夏季多雨的天气。室内栽培除了不受雨水影响, 还具有用地面积和时间少、抹芽和采花劳力小、管理方便、采花时间较为集中等诸多优点, 逐步受到广大种植

户的偏爱。本研究开展番红花实验的安徽亳州基地采用越年生栽培,而浙江嘉兴基地选用室内栽培,或许是导致两地产番红花代谢差异的主要因素。与栽培方式密切相关的土壤环境很可能对番红花花丝的发育发挥了重要的作用。元玉碧等(2014)的研究表明,土壤中的营养基质可以调节植株的生理生化代谢,从而使得番红花种球的繁殖系数与其生理生化代谢呈正相关,有效提高了番红花花丝的品质。

同时,本研究还发现番红花醛、番红花酸和番红花甙三种活性物质合成途径上游的代谢中间物3-羟基环柠檬醛的含量在两地所产番红花中具有极显著的差异,相较于安徽亳州新鲜花丝,浙江嘉兴新鲜花丝中3-羟基-环柠檬醛的含量要低得多(数据未显示)。而已有研究表明,催化这一步反应的酶为类胡萝卜素裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenase, CCD),而CCD在类胡萝卜素合成途径中具有十分关键的作用(Baba等2015)。因此,不同生长环境可能影响了关键基因CCD的转录表达,进而影响了最终代谢产物的生成。

番红花花丝在采摘后须及时进行处理,否则极易萎焉并发黑,导致品质下降。目前,最常用的方法是采用加热烘干或炭火烤干来获取成品干花丝。本文所采收的番红花新鲜花丝都在30 min内进行45°C加热烘干20 min制备为成品干花丝。对新鲜花丝和成品干花丝的代谢组学分析发现,无论是安徽亳州还是浙江嘉兴产番红花,其中番红花酸、番红花醛和番红花甙三种主要活性物质的含量在烘干加工处理后均显著下降,特别是番红花甙的含量较新鲜花丝减少近一倍。扶文君和袁丽红(2015)的研究表明,类胡萝卜素具有不稳定性,易发生化学氧化降解、光氧化降解和热氧化降解。很明显,番红花花丝中这三种物质的损耗与加热烘干过程中发生的热氧化降解有关。但本研究同时发现在成品干花丝中,天冬氨酸、亮氨酸、组氨酸、谷氨酸等氨基酸的含量显著增加。这些特定氨基酸的积累,将有助于番红花成品干花丝形成独特的香气和风味。考虑到碱性蛋白酶的最适温度为40~60°C,暗示其很可能参与了番红花花丝加热烘干过程中的内部反应(白腾辉等

2014)。由此可见,番红花加工工艺的选择和优化也会直接影响番红花花丝的品质。

番红花作为我国重点发展的珍稀名贵中药材品种,种植周期长,投资成本高,因此探索不同生长环境对其主要活性物质积累的影响具有重要的现实指导意义。本研究发现采用越年生栽培方式的安徽亳州产番红花较采用室内栽培方式的浙江嘉兴产番红花能够积累更高含量的番红花酸、番红花醛和番红花甙等活性物质。但需要注意的是,评估番红花的经济效益涉及到各方面的因素。室内栽培方式在用地、用工和管理等方面有着诸多优势,扩大了番红花的栽培地域。同时,本研究还发现传统的烘干加工方式极易造成番红花酸、番红花醛和番红花甙的热降解,可以为今后番红花加工技术的创新和改良提供参考。

参考文献(References)

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Jimeno ML, et al (2015). Structural characterization of highly glucosylated crocins and regulation of their biosynthesis during flower development in *Crocus*. *Front Plant Sci*, 6: 971
- Baba SA, Mohiuddin T, Basu S, et al (2015). Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC Genomics*, 16: 698
- Bai TH, Pan RS, Ma YP, et al (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for casein by response surface methodology. *Sci Tech Food Ind*, 35 (23): 203–206 (in Chinese with English abstract) [白腾辉, 潘润淑, 马亚萍等(2014). 响应面法优化酪蛋白酶法水解条件. *食品工业科技*, 35 (23): 203–206]
- Chinese Pharmacopoeia Commission (2010). *Chinese Pharmacopoeia*. Part 1. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 120–121 (in Chinese) [国家药典委员会(2010). 中华人民共和国药典. 1部. 北京: 中国医药科技出版社, 120–121]
- Chu X, Liu T, Han X, et al (2016). Research on chemical constituents of *Crocus sativus* and their cardiovascular pharmacological effects. *Guangzhou Chem Ind*, 44 (18): 30–32 (in Chinese with English abstract) [楚溪, 刘涛, 韩雪等(2016). 西红花的化学成分和心血管药理作用的研究概况. *广州化工*, 44 (18): 30–32]
- D'Archivio AA, Maggi MA (2017). Geographical identification of saffron (*Crocus sativus* L.) by linear discriminant analysis applied to the UV-visible spectra of aqueous extracts. *Food Chem*, 219: 408–413

- Frusciante S, Diretto G, Bruno M, et al (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (33): 12246–12251
- Fu WJ, Yuan LH (2015). Stabilities of saffron pigments produced by *in vitro* cell culture of *Crocus sativus* L. *Chin J Bioproc Eng*, 13 (2): 41–46 (in Chinese with English abstract) [扶文君, 袁丽红(2015). 离体培养藏红花细胞合成的藏红花色素稳定性. *生物加工过程*, 13 (2): 41–46]
- Gao L, Wang X, Zhang JJ, et al (2017). Determination of crocin-I and crocin-II in *Crocus sativus* L. from various places by HPLC. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 35 (9): 68–70 (in Chinese with English abstract) [高丽, 王旭, 张景景等(2017). HPLC法测定不同产地西红花中西红花昔-I和西红花昔-II的含量. *中华中医药学刊*, 35 (9): 68–70]
- Huang YH, Liu YL, Wu WB, et al (2013). Bioactivity-guided fractionation of petals of *Crocus sativus* and their antioxidant activity investigation. *Nat Prod Res Dev*, 25 (11): 1489–1493 (in Chinese with English abstract) [黄一泓, 刘雅莉, 武文斌等(2013). 藏红花花瓣体外抗氧化活性部位的筛选与研究. *天然产物研究与开发*, 25 (11): 1489–1493]
- Jin Q, Bi YL, Liu XM, et al (2014). Recent advances on research of carotenoid metabolism and functions. *Chin J Anim Nutr*, 26 (12): 3561–3571 (in Chinese with English abstract) [靳青, 毕宇霖, 刘晓牧等(2014). 类胡萝卜素代谢及功能研究进展. *动物营养学报*, 26 (12): 3561–3571]
- Khorasanchi Z, Shafiee M, Kermanshahi F, et al (2018). *Crocus sativus* a natural food coloring and flavoring has potent anti-tumor properties. *Phytomedicine*, 43: 21–27
- Li WP, Zhang Y, Ding ZS (2011). The research progress of *Crocus sativus*. *J Beijing Union Univ Nat Sci*, 25 (3): 55–58 (in Chinese with English abstract) [李伟平, 张云, 丁志山(2011). 西红花的研究进展. *北京联合大学学报(自然科学版)*, 25 (3): 55–58]
- Lu XH, Zhu ZM, Yue JY (2018). Bioinformatics analysis for high-throughput sequencing of small RNAs in the stigmas of saffron (*Crocus sativus*). *Plant Physiol J*, 54 (5): 827–836 (in Chinese with English abstract) [卢晓慧, 朱志明, 岳俊阳(2018). 藏红花柱头小RNA高通量测序及生物信息学分析. *植物生理学报*, 54 (5): 827–836]
- Shi LM, Xu XH, Zhu B, et al (2014). High-yield cultivation and utilization of *Crocus sativus* and *Houttuynia cordata*. Beijing: China Agriculture Press, 23–26 (in Chinese) [施林妹, 徐象华, 朱波等(2014). 藏红花、鱼腥草高产栽培与利用. 北京: 中国农业出版社, 23–26]
- Ward JL, Harris C, Lewis J, et al (2003). Assessment of 1H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62 (6): 949–957
- Yuan YB, Zhang HR, Zou XS, et al (2014). Effects of different substrates on physiological and biochemical metabolism and reproduction coefficient of *Crocus sativus*. *Jiangsu Agr Sci*, 42 (5): 202–204 (in Chinese with English abstract) [元玉碧, 张红瑞, 邹小双等(2014). 不同基质对西红花生理生化代谢和繁殖系数的影响. *江苏农业科学*, 42 (5): 202–204]
- Zeng CZ, Liu ZH, Liu ZX, et al (2017). Advances in application of metabolomics to *Camellia sinensis* research. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1591–1597 (in Chinese with English abstract) [曾超珍, 刘仲华, 刘志祥等(2017). 代谢组学在茶树研究中的应用进展. *植物生理学报*, 53 (9): 1591–1597]
- Zhao TT, Tang L, Xu Y, et al (2005). *In vitro* flowering of *Crocus sativus*. *Plant Physiol Commun*, 41 (1): 64 (in Chinese) [赵婷婷, 唐琳, 徐莺等(2005). 西红花的离体成花. *植物生理学通讯*, 41 (1): 64]

Metabolomics study of active substances in saffron (*Crocus sativus*) from different production areas

WANG Ran¹, LU Xiaohui^{2,3}, LIU Yongsheng^{1,3}, WANG Yijun^{4,*}, YUE Junyang^{1,5,*}

¹School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China

²College of Information Technology, Jiaxing Vocational & Technical College, Jiaxing, Zhejiang 314036, China

³College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

⁴School of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

⁵School of Computer Science and Information Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China

Abstract: Metabolomics analysis using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was employed to detect a wide spectrum of active substances in saffron (*Crocus sativus*) harvested from Bozhou, Anhui and Jiaxing, Zhejiang. The quantity difference between the main active substances in saffron from these two areas was also identified. Our results show that although the chemical compositions were similar, the quantities of active substances varied greatly. Saffron produced from Bozhou contained higher quantities of safranal, crocetin and picrocrocin than that from Jiaxing, which strongly indicates that the growing environment has a great influence on the inner quality of saffron. Furthermore, traditional processing methods of heating and drying clearly reduced the amounts of safranal, crocetin and picrocrocin, but enhanced the content of some flavor amino acids. This study provides basic information for determining optimal cultivation conditions and improving processing techniques by saffron growers.

Key words: saffron; metabolomics; carotenoids; multivariate statistical analysis

Received 2020-02-01 Accepted 2020-03-10

This work was supported by the Anhui Provincial Natural Science Foundation (1808085QC68).

*Co-corresponding authors: Wang YJ (yijun@ahau.edu.cn), Yue JY (aaran.yue@gmail.com).