

HPLC法同时测定甘薯叶中5种酚酸和异槲皮苷

傅志丰, 周 鹤, 石 燕, 卢坚雯

Simultaneous Determination of Five Phenolic Acids and Isoquercitrin in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) Leaves by HPLC

FU Zhifeng, ZHOU He, SHI Yan, and LU Jianwen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050099>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同品种甘薯叶提取物抗氧化及对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究

Antioxidant Activity and α -glucosidase Inhibitory Activity of Sweet Potato(*Ipomoea batatas* L.)Leaf Extracts from Different Varieties

食品工业科技. 2019, 40(23): 283-289 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.046>

高效液相色谱法同时测定香灰菌发酵液中L-苯丙氨酸和2-苯基乙醇

Simultaneous Detection of L-phenylalanine and 2-phenylethanol in *Hypoxylon* sp.Fermented Liquid by HPLC

食品工业科技. 2020, 41(14): 210-215 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.034>

HPLC法同时测定食用植物酵素中12种有机酸

Simultaneous Determination of Twelve Organic Acids in Edible Plant Source Jiaosu by HPLC

食品工业科技. 2020, 41(19): 279-285 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.043>

复合酶催化强化浸提桑叶黄酮类物质研究

Enhancing Extraction Flavonoids from Mulberry Leaves by Compound Enzyme

食品工业科技. 2020, 41(17): 141-145,152 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.024>

咖啡酰奎宁酸类化合物抑菌活性的网络药理学研究

Network Pharmacology Study on the Antibacterial Activity of Caffeoylquinic Acids

食品工业科技. 2021, 42(13): 11-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030017>

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010111>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

傅志丰, 周鹤, 石燕, 等. HPLC 法同时测定甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 292–298. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050099

FU Zhifeng, ZHOU He, SHI Yan, et al. Simultaneous Determination of Five Phenolic Acids and Isoquercitrin in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) Leaves by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(5): 292–298. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050099

· 分析检测 ·

HPLC 法同时测定甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷

傅志丰¹, 周 鹤¹, 石 燕², 卢坚雯^{3,*}

(1. 九江市检验检测认证中心食品药品检验检测分中心, 江西九江 332000;

2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

3. 宜春市硒资源开发利用中心, 江西宜春 336000)

摘 要: 咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷是甘薯叶中的主要活性成分, 本研究建立高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 同时测定这 6 种成分的方法。通过对检测波长、色谱柱、洗脱溶剂、洗脱流速等参数优化得到的最佳分析条件为: ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为分析柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B) 为流动相, 采用梯度洗脱: 0~12 min, 10%~25% B; 12~18 min, 25% B, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 326 nm, 柱温 30 ℃。咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷的线性范围分别为 0.25~25.0、0.5~50.0、5.0~100.0、10.0~200.0、5.0~100.0 和 0.5~50.0 μg/mL。该方法分析时间短 (18 min), 线性度 ($R^2 \geq 0.998$)、稳定性 ($RSD \leq 1.97\%$)、精密度 ($RSD \leq 1.56\%$) 和加标回收率 (95.14%~103.22%) 好。对江西 10 个不同产地甘薯叶目标成分分析发现, 宜春丰城的甘薯叶具有最高的总酚含量。

关键词: HPLC, 咖啡酰奎宁酸, 异槲皮苷, 同时测定, 甘薯叶

中图分类号: TS255.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)05-0292-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050099

本文网刊:



Simultaneous Determination of Five Phenolic Acids and Isoquercitrin in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) Leaves by HPLC

FU Zhifeng¹, ZHOU He¹, SHI Yan², LU Jianwen^{3,*}

(1. Food and Drug Inspection Sub Center of Jiujiang Inspection, Testing and Certification Center, Jiujiang 332000, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Selenium Resources Development and Utilization Center of Yichun, Yichun 336000, China)

Abstract: In this study, a reversed-phase high performance liquid-chromatography coupled to ultraviolet detection (RP-HPLC/UV) method for simultaneous determination of six major bioactive constituents (caffeic acid, chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoyl quinic acid, 3,5-dicaffeoyl quinic acid, 4,5-dicaffeoyl quinic acid and isoquercetin) in sweet potato leaves was developed and validated after optimization of various chromatographic conditions and other experimental parameters. The chromatographic separation was achieved on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ reversed-phase column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) using a gradient elution program with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B) (0~12 min, 10%~25% B; 12~18 min, 25% B), at a flow rate of 0.8 mL/min, an operating temperature of 30 ℃, and a wavelength of 326 nm. The calibration curves were linear in the range of 0.25~25.0, 0.5~50.0, 5.0~100.0, 10.0~200.0, 5.0~100.0, 0.5~50.0 μg/mL for caffeic acid, chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoyl quinic acid, 3,5-dicaffeoyl quinic acid, 4,5-dicaffeoyl quinic acid and isoquercetin, respectively. The present method was fast (18 min), and demonstrated acceptable values for linearity ($R^2 \geq 0.998$), stability ($RSD \leq 1.97\%$), recovery (95.14%~103.22%) and precision ($RSD \leq 1.56\%$). Additionally, the new method was successfully applied to determine components in sweet potato

收稿日期: 2022-05-11

作者简介: 傅志丰 (1991-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品检测技术, E-mail: 1062830538@qq.com。

* 通信作者: 卢坚雯 (1971-), 女, 本科, 高级农艺师, 研究方向: 农产品质量安全检测技术研究, E-mail: 1139817128@qq.com。

leaves from ten different regions of Jiangxi Province, and the results indicated that the sample harvested in Fengcheng city of Yichun contained higher total phenol content than those collected in other regions.

Key words: HPLC; caffeoylquinic acids; isoquercitrin; simultaneous determination; sweet potato leaves

甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam), 学名番薯, 种植广泛, 是世界主要的粮食作物之一^[1]。甘薯叶为甘薯加工的副产物, 现代科学研究表明甘薯叶提取物具有抑菌^[1]、抗氧化^[2]、抗癌^[3]、降血糖^[4]、降血脂^[5]等多种生物活性。在许多国家和地区, 甘薯叶被当作一种绿叶蔬菜食用^[6]。酚酸和黄酮类化合物是甘薯叶中主要的活性成分, 甘薯叶中的主要酚酸为咖啡酸衍生物及咖啡酰奎宁酸衍生物, 黄酮类化合物为槲皮素及其衍生物^[7-8]。酚酸和黄酮类化合物具有多种生物活性。绿原酸和二咖啡酰奎宁酸具有抗菌、抗病毒活性和保肝作用^[9-10], 咖啡酸具有止血的功效^[11], 异槲皮苷具有抗氧化、抗炎及抗癌作用^[12]。这些化合物的活性与其含量密切相关^[13], 因此建立合适的定量方法对研究甘薯叶生物活性及甘薯叶高值化利用具有重要意义。

目前,甘薯叶酚酸和黄酮类化合物的定量方法主要有紫外分光光度法(如福林酚法、氯化铝显色法)^[7, 14]和 HPLC 法。其中紫外分光光度法简单方便,但其根据试剂化学反应的原理测定,只能粗略的测定总量,无法区分单体化合物,容易受到干扰^[15-16]。HPLC 具有选择性好、灵敏度和准确度高等特点,可通过标准物质实现具体化合物的定量分析,目前已应用于茶叶^[17]、石榴^[18]、蓝莓^[19]等多种植物酚酸和黄酮类化合物的测定。虽已有 HPLC 法分离测定甘薯叶中酚酸和黄酮类化合物的报道,但有待于进一步改善,如 ZHANG 等^[8]采用 HPLC 分离甘薯叶中酚类物质的时间较长(约 40 min);钟伟^[20]采用 HPLC 测定甘薯叶中酚酸含量时未对甘薯叶中含量较高的二咖啡酰奎宁酸类化合物定量。

咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷为甘薯叶中的主要活性成分^[7](结构如图 1 所示)。本研究

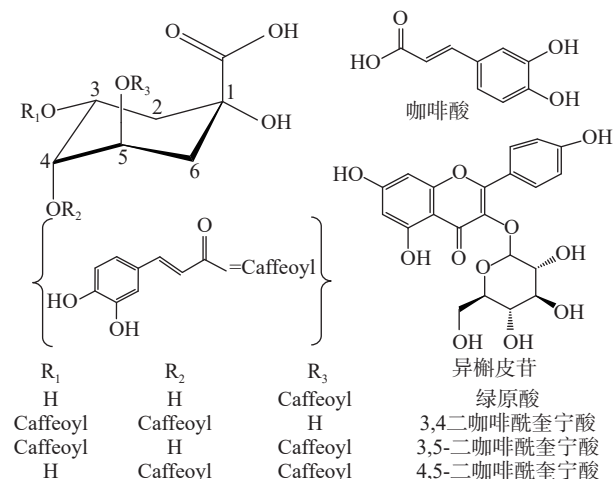


图 1 5 种酚酸和异槲皮苷的化学结构式

Fig.1 The chemical structures of 5 phenolic acids and isoquercetin

优化建立 HPLC 同时测定甘薯叶中这 6 种化合物含量的方法,通过对检测波长、色谱柱、洗脱溶剂、洗脱流速等参数优化得到的最佳分析条件,并进行方法学评价,最后对江西 10 个不同产地甘薯叶进行分析测定,为甘薯叶资源的进一步开发利用提供理论指导和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甘薯叶 于 2020 年 9 月采摘于江西省 10 个不同产地(吉安市新干县、吉安市吉安县、新余市渝水区、宜春市丰城市、宜春市袁州区、上饶市横峰县、鹰潭市贵溪市、南昌市南昌县、景德镇市浮梁县和九江市永修县)的郊区农场,经南昌大学食品学院石燕教授鉴定均为红心甘薯叶(red-flesh *Ipomea batatas* (L.) Lam. leaves); 甲酸(色谱纯)、咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、异槲皮苷(纯度均>97%) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 乙腈、甲醇、丙酮 色谱纯,德国 Merck 公司; 实验用水 超纯水(电阻率 18.2 MΩ)。

Hitachi D-2000 高效液相色谱仪(配 L-2400 紫外-可见光检测器) 日本日立高新技术公司; ML104 电子天平 梅特勒-托利多有限公司; TGL-10C 高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂; DFY-500C 试样粉碎机 温岭市林大机械有限公司; HY-4A 数显多用调速振荡器 常州朗越仪器制造有限公司; Leader-A1 超纯水仪 上海领德仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 取新鲜甘薯叶, 去除杂质, 用清水清洗干净后置于电热鼓风干燥箱中 50 ℃ 干燥 72 h, 然后用粉碎机粉碎过 60 目筛, 置于自封袋中, -20 ℃ 冰箱保存备用。准确称取甘薯叶粉末 5.0 g 于具塞锥形瓶中, 加入 70% 丙酮溶液 100 mL, 于室温在振荡器上 100 r/min 提取 12 h, 所得提取液 4000 r/min 离心 10 min, 残渣再在相同条件下提取 2 h。合并 2 次所得上清液, 用 70% 丙酮定容至 500 mL, 所得溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后即得待测样品。

1.2.2 标准溶液配制 分别准确称取 25 mg 6 种化合物标准物质于 25 mL 容量瓶中,加入 70% 丙酮溶解,定容至刻度,制得浓度为 1 mg/mL 的各化合物标准储备液。再分别精密吸取咖啡酸 0.25 mL、绿原酸 0.50 mL、3,4-二咖啡酰奎宁酸 1.00 mL、3,5-二咖啡酰奎宁酸 2.00 mL、4,5-二咖啡酰奎宁酸 1.00 mL 和异槲皮苷 0.50 mL 于同一 10 mL 容量瓶中,用 70% 丙酮定容至刻度,作为混合标准储备液(咖啡酸 25.0 $\mu\text{g/mL}$,绿原酸、异槲皮苷 50.0 $\mu\text{g/mL}$,3,4-二咖

咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸 100.0 $\mu\text{g/mL}$, 3,5-二咖啡酰奎宁酸 200.0 $\mu\text{g/mL}$), 根据需要对混合标准储备液稀释得到系列浓度的标准使用液。

1.2.3 方法学验证

1.2.4 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B); 洗脱梯度: 0~12 min, 10%~25% B; 12~18 min, 25% B; 流速: 0.8 mL/min, 进样量: 10 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 326 nm。

将测得的各组分保留时间与标准谱图对比, 对各化合物进行定性分析, 采用峰面积按外标法定量分析其质量浓度。

参照 ICH 指导原则^[21], 从线性、精密度、稳定性、重现性和加标回收率等方面验证方法的可行性。

1.2.5 样品含量测定 分别准确称取 5.0 g 不同产地的甘薯叶粉末, 按 1.2.1 方法制备样品, 并根据优化后的条件测定, 准确记录图谱中目标成分的峰面积, 并根据标准曲线计算含量, 结果以干物质(dried material, DM)质量计。

1.3 数据处理

每个样品重复测量 3 次, 结果表示为“ $\bar{X} \pm \text{SD}$ ”, 采用 SPSS 19.0 和 Excel 2010 对数据分析处理, 使用 ANOVA 法进行显著性检验, $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异, 应用 Origin 9.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

采用 Hatachi D-2000 HPLC 对 5 种酚酸和异槲皮苷的洗脱条件进行优化。以前期研究采用的方法作为分离的初始条件^[15], 即水(含 0.1% 的甲酸)为流动相 A; 甲醇为流动相 B; 洗脱梯度: 0~15 min, 10%~35% B, 15~35 min, 35%~80% B, 36~40 min,

100% B; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长 320 nm; 进样量: 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 在此基础上对检测波长、色谱柱、洗脱溶剂 A 和 B、洗脱梯度和洗脱流速等参数进行优化。

2.1.1 检测波长的选择 在 190~400 nm 波长范围内对甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷的紫外光谱进行扫描。如图 2, 咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸的最大吸收波长均为 326 nm, 异槲皮苷在 254 和 355 nm 处均有最大吸收峰。由于 L-2400 紫外-可见光检测器为单波长检测器, 同一时间只能检测一个波长, 且已有大量文献将槲皮素及其衍生物的 HPLC 波长设在 326 nm 附近^[22-24], 综合考虑工作量和试剂使用量等因素, 后续试验中酚酸和异槲皮苷的检测波长设为 326 nm。

2.1.2 色谱柱的选择 酚酸和黄酮类化合物通常采用反相色谱柱进行分离。本文比较了 Phenomenex Luna 5u 100A C_{18} 长柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、Phenomenex LaChrom C_{18} 短柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm)及 Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)3 款色谱柱对甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷分离效果的差异。如图 3, 所选的色谱柱中 Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱分离效果最好, 6 种化合物在 26 min 内均得到完全分离, 且峰形对称, 因此选择此色谱柱进行后续分析。

2.1.3 流动相的选择 酚酸和黄酮类化合物分离的流动相体系主要为乙腈/水及甲醇/水^[25], 本文测试了这两类溶剂系统对甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷的分离效果差异。如图 4, 当采用甲醇/0.1% 甲酸水作为流动相时, 分离时间长(约 26.5 min), 且 3,4-二咖啡酰奎宁酸与 3,5-二咖啡酰奎宁酸无法完全分离, 但

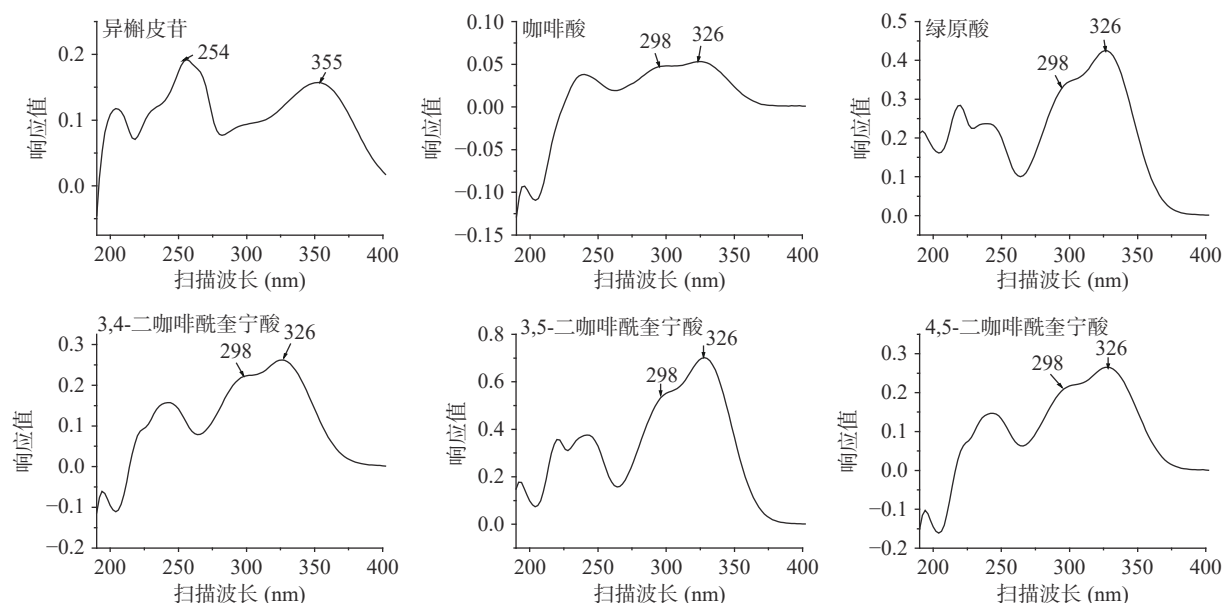


图 2 5 种酚酸和异槲皮苷的紫外扫描光谱图

Fig.2 The ultraviolet absorbance spectra of 5 phenolic acids and isoquercetin

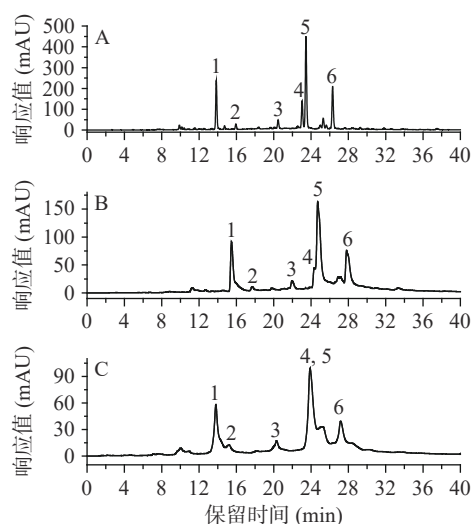


图 3 不同色谱柱对甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷分离效果的影响

Fig.3 Effect of different columns on the separation of five phenolic acids and isoquercitrin

注: A: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱; B: Phenomenex Luna 5u 100A C₁₈ 长柱; C: Phenomenex LaChrom C₁₈ 短柱; 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 异槲皮苷; 4. 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 5. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 6. 4,5-二咖啡酰奎宁酸; 图 4~图 6 同。

采用乙腈/0.1% 甲酸水为流动相时, 6 种化合物均可完全分离, 时间较以甲醇/0.1% 甲酸水为流动相时显著缩短, 这可能是由乙腈的高偶极矩使产生更强的分析物-流动相分散相互作用(供体-受体相互作用)引起的^[26]。使用乙腈为流动相时比甲醇分析时间更短、峰形更尖锐也被 HUANG 等^[27] 报道, 因此初步选择乙腈/0.1% 甲酸水作为流动相, 经过调试得到最佳洗脱程序为: 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B), 洗脱梯度: 0~12 min, 10%~25% B; 12~18 min, 25% B。

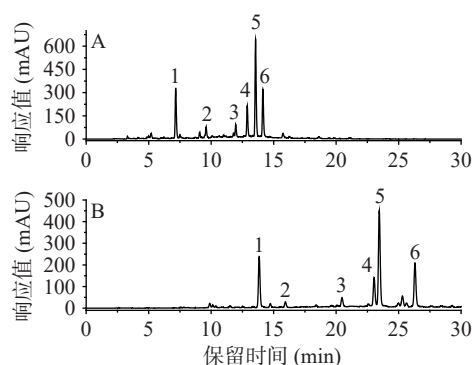


图 4 流动相系统对甘薯叶 5 种酚酸和异槲皮苷分离效果的影响

Fig.4 Effect of mobile phase on the separation of five phenolic acids and isoquercitrin

注: A: 乙腈/0.1% 甲酸水; B: 甲醇/0.1% 甲酸水。

2.1.4 流速的选择 本文比较了不同流动相流速(0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min)对 6 种化合物分离的影响, 如图 5, 流速的增加缩短了化合物的分离时间, 但分析物质之间的分离度降低, 这与段云飞等^[28] 应用 HPLC 法同时测定采后莲雾果实中 7 种有机酸含量

的结果相似, 综合考虑分析时间及分离度, 设置流速为 0.8 mL/min。

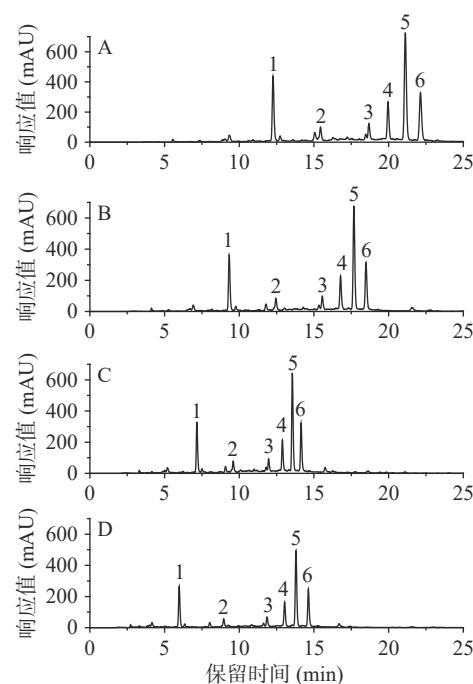


图 5 流速对甘薯叶 5 种酚酸和异槲皮苷分离效果的影响

Fig.5 Effect of the flow rate of the mobile phase on the separation of five phenolic acids and isoquercitrin

注: A: 0.6 mL/min; B: 0.8 mL/min; C: 1.0 mL/min; D: 1.2 mL/min。

综上, 得到优化后的分析条件为: 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B); 洗脱梯度: 0~12 min, 10%~25% B; 12~18 min, 25% B; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 10 μL, 柱温: 30 ℃, 检测波长为 326 nm。在此条件下所得样品和混标溶液的色谱图见图 6。可以看出, 本文建立方法能在 18 min 内对甘薯叶中 6 种目标成分完成分离, 与 ZHANG 等^[8] 及朱亚珠^[29] 分离甘薯叶中酚酸的 HPLC 条件相比, 时间缩短了约 1 倍。

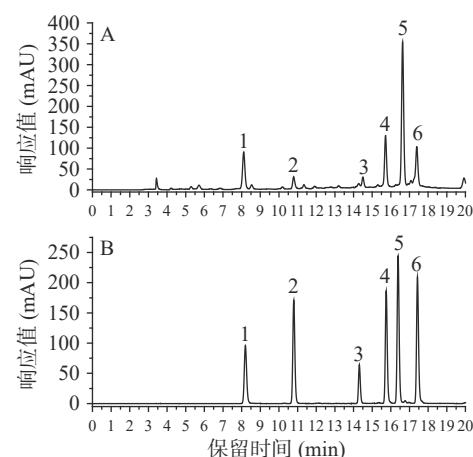


图 6 样品和混标溶液色谱图

Fig.6 Chromatograms of samples and standard mixture

注: A: 样品; B: 混标溶液。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系、检出限和定量限 将不同浓度的混合标准品溶液进样,采用优化好的色谱条件分析,以浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并将标准溶液稀释至信噪比(signal to noise, S/N)为 3 和 10,计算各化合物的检出限及定量限,所得相关信息见表 1。可以看出,咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷分别在 0.25~25.0、0.5~50.0、5.0~100.0、10.0~200.0、5.0~100.0 和 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围具有良好的线性关系,决定系数(R^2)均 ≥ 0.998 。6 种化合物检出限变化范围为 0.9~18.4 $\mu\text{g/g DM}$,定量限变化范围为 3.0~61.2 $\mu\text{g/g DM}$,能够满足定量分析的要求。

2.2.2 精密度 取 1.2.2 中混合标准溶液,在优化好的色谱条件下连续进样 6 次,分别记录 6 种化合物的峰面积。得到咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸以及异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.08%、1.49%、1.19%、1.40%、1.55% 和 1.56%,均 $<2.0\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性 取同一混合标准溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 后进样测定,记录 6 种化合物的峰面积。得到咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸以及异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.75%、0.38%、1.49%、1.83%、1.97% 和 0.66%,均 $<2.0\%$,表明测试样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 重现性 取 6 份产地为南昌的甘薯叶粉末,按照 1.2.1 中的方法制备样品溶液,得到咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸以及异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.37%、1.71%、1.81%、1.94% 和 0.41%,均 $<2.0\%$,表明该方法具有较好的重现性。

2.2.5 加标回收率 采用加标回收实验评价方法的准确性。取 12 份产地为南昌的甘薯叶粉末,其中 3 份用于测定样品中 6 种化合物的本底值,剩余 9 份进行三个标准添加水平的回收率试验,按照 1.2.1 中方法处理样品,采用优化的色谱条件测定并计算回收率。如表 2 所示,5 种酚酸和异槲皮苷的平均加标回

收率变化范围为 95.14%~103.22%,RSD 变化范围 1.0%~3.0%,平均加标回收率结果较好,表明该方法具有较好的准确性。

表 2 5 种酚酸和异槲皮苷的加标回收率结果
Table 2 The recovery results of five phenolic acids and isoquercitrin determined

化合物	样品中含量 ($\mu\text{g/g DM}$)	加入量 ($\mu\text{g/g DM}$)	测得总量平均值 ($\mu\text{g/g DM}$)	平均回收率(%)	RSD (%)
咖啡酸	529	420	939	97.62	1.8
		525	1058	100.76	1.1
		630	1128.4	95.14	1.0
绿原酸	2416	1900	4310.3	99.70	1.6
		2400	4784	98.67	1.8
		2900	5247	97.62	1.4
3,4-二咖啡酰奎宁酸	3332	2650	6017	101.32	2.6
		3350	6790	103.22	3.0
		4000	7426.4	102.36	2.4
3,5-二咖啡酰奎宁酸	12312	9850	21933.5	97.68	2.0
		12300	24272.5	97.24	2.9
		14800	27058.7	99.64	1.7
4,5-二咖啡酰奎宁酸	3857	3100	6895.7	98.02	3.0
		3850	7580.5	96.71	2.9
		4650	8407.5	95.91	1.6
异槲皮苷	1340	1050	2361	97.24	1.6
		1340	2628.3	96.14	2.3
		1600	2874.5	95.91	1.1

2.3 实际样品的测定

将建立的方法用于测定江西省内 10 个不同产地(吉安市新干县、吉安市吉安县、新余市渝水区、宜春市丰城市、宜春市袁州区、上饶市横峰县、鹰潭市贵溪市、南昌市南昌县、景德镇市浮梁县、九江市永修县)甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷的含量。如表 3,咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷的含量变化范围分别为 0.12~0.53、0.68~2.99、0.23~3.33、3.27~18.25、0.85~4.49 和 0.32~1.34 mg/g DM 。在所有甘薯叶中均检出 6 种目标成分,其中 3,5-二咖啡酰奎宁酸均为 6 个化合物中含量最高的物质(占总酚的比例 34.1%~67.5%),这与 MAKORI 等^[30]的结果一致。不同产地甘薯叶中 6 种目标成分总量的变化范围为 9.45~30.24 mg/g DM ,其中产地为宜春丰城市的甘薯叶具有最高的 6 种目标成分总量(30.24 mg/g DM),与 SUÁREZ 等^[31]报道的 30.87~47.28 mg/g

表 1 5 种酚酸和异槲皮苷的线性范围、标准曲线、决定系数、检出限及定量限($n=7$)

Table 1 Linear range, standard curve, determination coefficient, detection limit and quantification limit of five phenolic acids and isoquercitrin ($n=7$)

化合物	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	标准曲线	决定系数(R^2)	检出限($\mu\text{g/g DM}$)	定量限($\mu\text{g/g DM}$)
咖啡酸	0.25~25.0	$Y=67793X-18215$	0.9997	0.9	3.0
绿原酸	0.5~50.0	$Y=37913X-21415$	0.9996	4.3	14.2
3,4-二咖啡酰奎宁酸	5.0~100.0	$Y=40131X-105662$	0.9980	11.6	38.6
3,5-二咖啡酰奎宁酸	10.0~200.0	$Y=25927-110983$	0.9985	18.4	61.2
4,5-二咖啡酰奎宁酸	5.0~100.0	$Y=44641X-81094$	0.9980	12.8	42.6
异槲皮苷	0.5~50.0	$Y=18595X-14879$	0.9991	12.6	41.9

表 3 不同产地甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷的含量

Table 3 Contents of five phenolic acids and isoquercitrin of sweet potato leaves from different areas

样品产地	样品含量(mg/g DM)						总计含量
	咖啡酸	绿原酸	3,4-二咖啡酰奎宁酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	4,5-二咖啡酰奎宁酸	异槲皮苷	
产地1	0.29±0.02 ^{cd}	0.68±0.09 ^a	1.55±0.19 ^b	8.25±0.32 ^d	2.73±0.39 ^c	0.63±0.04 ^c	14.13
产地2	0.22±0.01 ^b	1.10±0.12 ^{bc}	1.52±0.18 ^b	8.34±0.30 ^d	2.73±0.26 ^c	0.67±0.03 ^c	14.58
产地3	0.24±0.02 ^{bc}	1.65±0.14 ^{de}	0.61±0.05 ^a	8.16±0.32 ^d	0.99±0.05 ^a	0.44±0.02 ^b	12.09
产地4	0.51±0.04 ^f	2.99±0.18 ^g	3.04±0.33 ^d	18.25±0.20 ^f	4.49±0.28 ^e	0.96±0.04 ^e	30.24
产地5	0.19±0.02 ^b	0.86±0.10 ^{ab}	2.26±0.23 ^c	3.27±0.19 ^a	1.97±0.10 ^b	1.03±0.05 ^c	9.59
产地6	0.31±0.02 ^d	1.89±0.17 ^e	0.35±0.02 ^a	5.40±0.20 ^b	1.85±0.10 ^b	0.32±0.01 ^a	10.15
产地7	0.12±0.01 ^a	2.73±0.14 ^g	0.23±0.01 ^a	4.75±0.20 ^b	1.22±0.08 ^a	0.40±0.01 ^{ab}	9.45
产地8	0.53±0.03 ^f	2.42±0.12 ^f	3.33±0.25 ^d	12.31±0.43 ^e	3.86±0.43 ^d	1.34±0.07 ^f	23.79
产地9	0.44±0.02 ^e	1.86±0.16 ^e	2.31±0.22 ^c	4.91±0.20 ^b	0.85±0.04 ^a	0.82±0.03 ^d	11.19
产地10	0.41±0.02 ^e	1.36±0.12 ^{cd}	2.02±0.18 ^c	7.47±0.30 ^e	1.29±0.09 ^a	0.62±0.02 ^c	13.17

注: 产地1: 吉安新干县; 产地2: 吉安吉安县; 产地3: 新余渝水区; 产地4: 宜春丰城市; 产地5: 宜春袁州区; 产地6: 上饶横峰县; 产地7: 鹰潭贵溪市; 产地8: 南昌南昌县; 产地9: 景德镇浮梁县; 产地10: 九江永修县。同列不同小写字母表示样品间差异显著($P<0.05$)。

DM 结果接近, 但显著低于 MAKORI 等^[30] 研究的 Yuzi 7 号品种的结果(72.61 mg/g DM)。此外, 不同产地甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷的含量差异较大, 其中产地为南昌南昌县和宜春丰城市的甘薯叶样品中的酚酸和异槲皮苷较高, 前者含有最高的异槲皮苷含量, 后者的绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸含量最高, 但两者的咖啡酸及 3,4-二咖啡酰奎宁酸含量不存在显著性差异($P>0.05$), 这可能是由甘薯叶的栽培环境(降水量、气温、光照、土壤肥力等)及栽培方式等差异多因素引起的^[32-33], 以上表明在后续甘薯叶生物活性研究和高值化利用实验中, 可优先考虑江西南昌南昌县和宜春丰城市的甘薯叶资源。

3 结论

建立了 HPLC 同时检测甘薯叶中咖啡酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷的方法, 通过对 HPLC 条件的选择和优化, 得到的最优分析条件为: ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为分析柱; 以 0.1% 甲酸/水溶液(A)和乙腈(B)为流动相; 检测波长为 326 nm; 梯度洗脱(0~12 min, 10%~25%B; 12~18 min, 25%B); 柱温为 30 ℃。该条件下甘薯叶中 5 种酚酸和异槲皮苷在 18 min 内能够完全分离, 线性关系、灵敏度、精密度、稳定性和重复性好, 且平均加标回收率在 95.14%~103.22% 之间。对江西 10 个不同产地的甘薯叶分析发现同一品种不同产地目标成分含量差异很大, 南昌市南昌县和宜春市丰城市的甘薯叶具有较高的酚酸和异槲皮苷含量。研究结果可为甘薯叶中酚酸和黄酮类化合物的定性定量分析提供技术参考, 同时为甘薯叶资源的高效开发与利用提供一定的指导。

参考文献

[1] NGUYEN H C, CHEN C C, LIN K H, et al. Bioactive compounds, antioxidants, and health benefits of sweet potato leaves[J].

Molecules, 2021, 26(7): 1820.

[2] JANG Y, KOH E. Antioxidant content and activity in leaves and petioles of six sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and antioxidant properties of blanched leaves[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(2): 337-345.

[3] TAIRA J, UEHARA M, TSUCHIDA E, et al. Inhibition of the β -catenin/Tcf signaling by caffeoylquinic acids in sweet potato leaf through down regulation of the Tcf-4 transcription[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(1): 167-172.

[4] LUO D, MU T H, SUN H N. Profiling of phenolic acids and flavonoids in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves and evaluation of their anti-oxidant and hypoglycemic activities[J]. Food Bioscience, 2021, 39: 100801.

[5] NTCHAPDA F, TCHATCHOUANG F C, MIAFFO D, et al. Hypolipidemic and anti-atherosclerogenic effects of aqueous extract of *Ipomoea batatas* leaves in diet-induced hypercholesterolemic rats[J]. Journal of Integrative Medicine, 2021, 19(3): 243-250.

[6] ISHIDA H, SUZUNO H, SUGIYAMA N, et al. Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.)[J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 359-367.

[7] CHEN Y, FU Z F, TU Z C, et al. Influence of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability and antioxidant activity of polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(5): 1131-1137.

[8] ZHANG C C, LIU D Q, WU L H, et al. Chemical characterization and antioxidant properties of ethanolic extract and its fractions from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves[J]. Foods, 2019, 9(1): 15.

[9] NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 67-74.

[10] CHEN S, LIU J, DONG G Q, et al. Flavonoids and caffeoylquinic acids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flowers: A potentially rich source of bioactive compounds[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128733.

[11] LIAN W W, DU G H. Caffeic acid[M]//Natural small

molecule drugs from plants. Springer, Singapore, 2018: 19–23.

[12] LI C, TAN F, YANG J J, et al. Antioxidant effects of *Apocynum venetum* tea extracts on D-galactose-induced aging model in mice[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 381.

[13] STASZOWSKA-KARKUT M, MATERSKA M. Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* L.), raspberry (*Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*) [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 463.

[14] EL-HAWARY S S, MOHAMMED R, EL-DIN M E, et al. Comparative phytochemical analysis of five Egyptian strawberry cultivars (*Fragaria×ananassa* Duch.) and antidiabetic potential of festival and red merlin cultivars[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(27): 16755–16767.

[15] FU Z F, TU Z C, ZHANG L, et al. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities[J]. *Food Bioscience*, 2016, 15: 11–18.

[16] WAY M L, JONES J E, NICHOLS D S, et al. A comparison of laboratory analysis methods for total phenolic content of cider[J]. *Beverages*, 2020, 6(3): 55.

[17] BAE I K, HAM H M, JEONG M H, et al. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 469–475.

[18] RUSSO M, FANALI C, TRIPODO G, et al. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: Application to different Italian varieties[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(15): 3507–3520.

[19] MUSTAFA A M, ANGELONI S, ABOUELENEIN D, et al. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130743.

[20] 钟伟. 红薯叶中多酚类物质的抗氧化及抗肿瘤细胞增殖作用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015. [ZHONG W. Research evaluation of antioxidant and antitumor activities of *Ipomoea batatas* leaves[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015]

[21] Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology[S]. 2005.

[22] 覃日宏, 陈汝旭, 盘涌, 等. HPLC法同时测定五指毛桃中6个黄酮类成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(12): 2244–2249. [QIN R H, CHEN R X, PAN Y, et al. Simultaneous determination of six flavonoids in *Ficus hirta* Vahl. by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, 40(12): 2244–2249.]

[23] TSOLMON B, FANG Y, YANG T, et al. Structural identification and UPLC-ESI-QTOF-MS-MS analysis of flavonoids in the aquatic plant *Landoltia punctata* and their *in vitro* and *in vivo* antiox-

idant activities[J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128392.

[24] LIU J, MU T H, SUN H N, et al. Optimization of ultrasonic-microwave synergistic extraction of flavonoids from sweet potato leaves by response surface methodology[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43(5): e13928.

[25] 马帅, 王纪华, 高媛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定5个产地花椰菜和西兰花中的23种酚酸类化合物[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 176–187. [MA S, WANG J H, GAO Y, et al. Simultaneous determination of twenty-three phenolic acids in Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) and Broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) from five producing places by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 176–187.]

[26] ZHANG A, WAN L, WU C Y, et al. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection[J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 14241–14257.

[27] HUANG R T, LU Y F, INBARAJ B S, et al. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12: 498–508.

[28] 段云飞, 吴光斌, 叶洪, 等. HPLC法同时测定采后莲雾果实7种有机酸的含量[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 175–180. [DUAN Y F, WU G B, YE H, et al. Simultaneous determination of seven organic acids in wax apple (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L. M. Perry) fruit during postharvest storage by high performance liquid chromatography[J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 175–180.]

[29] 朱亚珠. 甘薯叶中咖啡酰奎尼酸类物质的分离纯化和高效液相色谱法分析[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(10): 73–77. [ZHU Y Z. Purification of caffeoylquinic acids from sweet potato leaves and their analysis by high performance liquid chromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(10): 73–77.]

[30] MAKORI S I, MU T H, SUN H N. Total polyphenol content, antioxidant activity, and individual phenolic composition of different edible parts of 4 sweet potato cultivars[J]. *Natural Product Communications*, 2020, 15(7): 1934578X20936931.

[31] SUÁREZ S, MU T H, SUN H N, et al. Antioxidant activity, nutritional, and phenolic composition of sweet potato leaves as affected by harvesting period[J]. *International Journal of Food Properties*, 2020, 23(1): 178–188.

[32] XIANG G, YANG H Y, YANG L, et al. Multivariate statistical analysis of tobacco of different origin, grade and variety according to polyphenols and organic acids[J]. *Microchemical Journal*, 2010, 95(2): 198–206.

[33] ZHANG D Y, WAN Y, HAO J Y, et al. Evaluation of the alkaloid, polyphenols, and antioxidant contents of various mulberry cultivars from different planting areas in eastern China[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 298–307.