

基于 UPLC-MS/MS 的豆瓣菜酚酸类组分分析

廖素凤^{1,2}, 罗进凤¹, 兰孜怡¹,
黄婷婷¹, 熊钊¹, 杨志坚^{1,2}, 许明^{1,2}, 郑金贵^{1,2*}¹福建农林大学农学院 海峡两岸农业技术合作中心;²福建农林大学农学院 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002

摘要:为深入了解和挖掘豆瓣菜的功能性营养物质,本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法对18个豆瓣菜品种的酚酸类成分进行定性和定量分析。结果表明,运用HSS T3色谱柱,流动相0.1%甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱,流速0.3 mL/min,柱温30℃,选择电喷雾离子源在负离子模式下扫描,共鉴定出豆瓣菜的17个酚酸类物质,各化合物分离效果好,标准曲线在检测范围内具有良好的线性($R \geq 0.9992$),检出限在0.8401~4.040 μg/mL,定量限在2.001~20.50 μg/mL,平均加样回收率在94.63%~102.4%,相对标准偏差 $\leq 4.4%$ ($n=6$)。该方法测定的18份豆瓣菜中17个酚酸均可定量,不同品种豆瓣菜的总酚酸含量以及同一品种的各酚酸含量均存在明显差异,总酚酸含量范围为106.0~230.0 mg/g DW,其中羟基苯甲酸、鞣花酸、绿原酸和3,5-二羟基苯甲酸是主要的酚酸类物质。综上所述,基于UPLC-MS/MS方法可快速精准分析豆瓣菜中酚酸类化合物的组成和分布,为后续富含酚酸的豆瓣菜优异种质资源的挖掘建立了技术平台,有助于加快豆瓣菜品种改良。

关键词:豆瓣菜;酚酸;超高效液相色谱;串联质谱

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)11-1874-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.11.008

Analysis of phenolic acids in *Nasturtium officinale* R. Br. base on UPLC-MS/MSLIAO Su-feng^{1,2}, LUO Jin-feng¹, LAN Zi-yi¹,
HUANG Ting-ting¹, XIONG Fan¹, YANG Zhi-jian^{1,2}, XU Ming^{1,2}, ZHENG Jin-gui^{1,2*}¹Cross-straits Agricultural Technology Cooperation Center, College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University;²Key Laboratory of Crop Genetics, Breeding and Comprehensive Utilization, Ministry of Education, College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract:To understand and explore the functional nutrients in *Nasturtium officinale* R. Br., an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the qualitative and quantitative analysis of 17 phenolic acids in 18 *N. officinale* cultivars. The optimal detection method obtained by optimizing the parameters of UPLC-MS/MS condition was as follows: the samples were separated using an HSS T3 column and eluted with 0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase, the flow rate was set to 0.3 mL/min and the column temperature was set to 30℃. A total of 17 phenolic acids in *N. officinale* were detected by negative ion mode scanning. The separation effect of compounds is good. The linear ranges of 17 phenolic acids showed good linearity ($R \geq 0.9992$), the limit of detection ranged from 0.8401 μg/mL to 4.040 μg/mL, the limit of quantitation ranged from 2.001 μg/mL to 20.50 μg/mL, and the average recovery ranged from 94.63% to 102.4%, relative standard deviation $\leq 4.4%$ ($n=6$). All 17 phenolic acids in 18 *N. officinale* detected by our method were quantitatively measurable. The total phenolic acid content in different cultivars and the accumulation of 17 kinds of phenolic acids in the same *N. officinale* cultivar were significantly different. The total content of phenolic acids ranged from 106.0 mg/g DW to 230.0 mg/g DW. Among them, *p*-hydroxybenzoic acid, ellagic acid, chlorogenic acid and 3,5-dihydroxybenzoic acid were the main phenolic acids in *N. officinale*. In summary, the UPLC-MS/MS method can quickly and ac-

收稿日期:2024-04-29 接受日期:2024-08-01

基金项目:福建省教育厅项目(JAT200094);福建省农业农村厅项目(KLD18001A);福建农林大学专项基金(FAFUXMPC202210389254, FAFUXMPC20230718001-00166)

* 通信作者 E-mail:jinguiheng@126.com

curately analyze the composition and distribution of phenolic acid compounds in *N. officinale*, and establish a technical platform for the subsequent mining of excellent phenolic acid-rich germplasm resources of *N. officinale*, which is helpful to accelerate the improvement of *N. officinale* cultivars.

Key words: *Nasturtium officinale* R. Br.; phenolic acid; ultra-high performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry

豆瓣菜(*Nasturtium officinale* R. Br.),又名西洋菜,被评为“最健康的蔬菜”^[1],属于十字花科豆瓣菜属中的栽品种^[2]。它种植历史超过 2 000 年^[1],主要栽培于我国华南地区,如广州、广西和武汉等省。豆瓣菜生长周期短,便于管理,产量高,经济效益好。豆瓣菜作为药用和蔬菜作物,富含促进人体健康的植物活性成分,包括多酚(类黄酮、酚酸)、硫代葡萄糖苷、异硫氰酸酯和萜类等^[1,3]。欧洲食品安全局(EFSA)将豆瓣菜归类为叶类蔬菜、香草和可食用花类的安全蔬菜^[3]。在传统医学中豆瓣菜长期被用于治疗高血糖、高血压、哮喘和咳嗽等^[4,5]。现代药理学研究表明,豆瓣菜具有抗癌、抗氧化、抗菌、抗炎、抗银屑病和保护心脏等药理作用^[6-8]。因此,选育品质优良、营养丰富的豆瓣菜种质资源是豆瓣菜育种研究的重要目标。

高等植物中广泛分布的含有酚羟基和羧基的一类次生代谢产物,其中酚酸约占多酚类物质的三分之一^[9],主要通过酯键及醚键与细胞壁结构组分以结合态存在于植物中,具有抗氧化、预防癌症、调节免疫力、抗过敏、抗衰老等多种生物活性^[10,11]。植物体内的酚酸作为信号分子,在植物与微生物的共生、植物防御等方面起重要作用^[12],如水杨酸是通过诱导产生的一种重要的防御化合物,作为信号分子参与植物的防御^[9]。

目前对豆瓣菜功能性成分的研究主要集中在萜类、硫代葡萄糖苷及其衍生物上,对酚酸类组分的研究有待深入。植物中酚酸类物质的鉴定和分析方法有毛细管电泳法^[13]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[14]、超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)和高效液相色谱-串联质谱联用法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[15]等,如 Klimek-Szczykutowicz 等^[16]通过 HPLC-DAD 分析比较了不同组织培养条件下豆瓣菜中咖啡酸、原儿茶酸和没食子酸等 10 种酚酸组分的含量。毛细管电泳法灵敏度较低,高效液相色谱法灵敏度比毛细管电泳法高,但是

对于基质复杂的样品分离效果不够理想,且分析时间较长。超高效液相色谱-串联质谱联用法(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)是近年兴起的检测技术手段,利用离子通过不同通道技术对结构相近物质有效分离,分离时间短,灵敏度低,效果好。Zhao 等^[17]研究表明,利用 UPLC-MS/MS 技术鉴定和分析植物酚酸类化合物,所需样品量少,时间短,可以同时准确检测多种酚酸组分,可以更好地辅助筛选作物优良种质。本研究以国内外引进的 18 份豆瓣菜种质资源为材料,采用 UPLC-MS/MS 对中不同酚酸类化合物进行定性和定量分析,通过比较分析豆瓣菜种质资源中酚酸类组分及分布,筛选出富含酚酸的豆瓣菜优良种质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试豆瓣菜样品:在福建省福州市福建农林大学农产品品质研究所试验田,北纬 26°05',东经 119°14',18 个豆瓣菜品种于 2020 年 10 月中旬统一移栽,待苗高 10 cm 时移栽,移栽 45 d 后采摘长势良好,叶片无病虫害的新鲜豆瓣菜叶片、根、茎或整棵植株。每个品种随机采集 3 份。将豆瓣菜洗净后放 -40 °C 冰箱预冻 24 h,于冷冻干燥机中冻干,磨成粉末,并过 40 目筛,-20 °C 冰箱保存备用。

18 个豆瓣菜品种的引种信息如下:NAS1 ~ NAS12 品种的种子于 2020 年 8 月 6 日引自德国植物遗传和作物研究所(IPK)的种质资源保藏中心(Genebank Information Management System, GBIMS),品种相关的信息记录在 GBIMS 网站;野生种 9P24 种子引自中国农业科学院蔬菜所;NAS14(国内市场主要售卖种子的品种)、NAS18(百色豆瓣菜)和 1079 的种子由国内市场种业公司购买;NAS13(福建主栽品种)和 NAS15 ~ NAS17 是 2019 年由本实验室从国内主产地或者野外获得的豆瓣菜苗保种。本研究所引进的 18 个豆瓣菜品种经湖南农业大学园艺园林学院黄科教授和福建农林大学许明助理研究员鉴定,均为 *Nasturtium officinale* R. Br.(见表 1)。

表 1 不同豆瓣菜品种的种子或种苗的引种信息

Table 1 Introduction information for seeds or seedlings of different *N. officinale* cultivars

编号 No.	引种产地 Country of origin	开始开花时间 Flowering time	开始结荚时间 Pod-setting time
NAS1	GBIMS of the IPK	未开花	未结荚
NAS2	GBIMS of the IPK (France)	2021.3.22	2021.4.25
NAS3	GBIMS of the IPK (Morocco)	2021.3.18	2021.4.15
NAS4	GBIMS of the IPK (Spain)	2021.3.23	2021.4.27
NAS5	GBIMS of the IPK (France)	2021.3.26	2021.4.26
NAS7	GBIMS of the IPK (Cuba)	2021.3.9	2021.4.27
NAS8	GBIMS of the IPK (Cuba)	2021.3.22	2021.4.12
NAS9	GBIMS of the IPK (Cuba)	2021.3.16	2021.4.16
NAS11	GBIMS of the IPK (Germany)	2021.3.24	2021.4.25
NAS12	GBIMS of the IPK (Italy)	2021.4.2	2021.4.28
NAS13	中国福建福州耕韵生态农业开发有限公司	未开花	未结荚
NAS14	中国北京绿金蓝种苗有限责任公司	2021.3.12	2021.4.7
9P24	中国农业科学院蔬菜研究所	2021.3.18	2021.4.18
1079	中国广东省兴宁市庆丰盈科种子有限公司	2021.3.22	2021.4.12
NAS15	中国广东清远阳山县阳城镇鱼水村态保豆瓣菜专业合作社	未开花	未结荚
NAS16	中国福建龙岩市永定区西溪乡野外采摘	未开花	未结荚
NAS17	中国广东中山	未开花	未结荚
NAS18	中国广西百色市广西兆禾种业有限公司	2021.2.28	2021.3.28

1.2 实验仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Xevo TQ-S 三重四级杆质谱(美国 Waters 公司); Millipore Direct-Q5 超纯水仪(美国 Millipore 公司); UV-1800pc 分光光度计(默克 Sigma-Aldrich 公司); AL2002 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

没食子酸、邻香豆酸、香草酸、丁香酸、苯甲酸、绿原酸、异阿魏酸、原儿茶酸、鞣花酸、阿魏酸、3,5-二羟基苯甲酸、异绿原酸 A、水杨酸、对羟基苯甲酸、熊果酸、咖啡酸、和对香豆酸等标准品(纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); LC-MS 级的乙腈、甲醇、乙醇和 Folin & Ciocalteu 酚试剂(德国 Merck 有限公司); 氢氧化钠、盐酸、甲酸(AR, 西陇化工股份有限公司); 乙酸乙酯、EDTA、抗坏血酸(AR)、0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜过滤器(国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为 Millipore Direct-Q5 超纯水仪制备。

1.3 实验方法

1.3.1 豆瓣菜提取物的制备

豆瓣菜样品中活性成分的提取参考 Liu 等^[18]的方法, 稍作修改。称取 0.200 g 豆瓣菜样品冻干

粉置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 的 70% 甲醇溶液, 盖紧试管, 涡旋混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下超声提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min 后将上清液全部转移至 50 mL 棕色容量瓶中; 残渣继续加入 10 mL 的 70% 甲醇, 重复上述步骤。合并提取液后定容至 50 mL, 混匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 置于棕色进样瓶中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待上机分析。每个样品重复 3 次。

1.3.2 酚酸标准溶液的配制

精密称取 17 个酚酸标准品适量, 用甲醇溶解后分别配成没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、香草酸、3,5-二羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、鞣花酸、对香豆酸、异绿原酸 A、阿魏酸、异阿魏酸、邻香豆酸、熊果酸、苯甲酸和水杨酸浓度分别为 20.06、32.21、80.63、16.72、16.25、120.55、250.89、8.16、80.36、20.02、20.99、8.85、8.12、8.96、20.28、20.94、160.52 和 442.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单标储备液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存备用。混合酚酸标准品工作液的配制: 移取一定量的上述单标储备液, 用梯度稀释法稀释至 0.16 ~ 160.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列混合酚酸标准品溶液, 充分混匀, 现配现用。

1.3.3 豆瓣菜总酚酸的测定

总酚酸测定采用 Du 等^[19]的 Folin-Ciocalteu 方

法,稍加改进。移取一定量的没食子酸单标储备液,用甲醇溶液梯度稀释得到浓度为 0 ~ 79.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的没食子酸标准品溶液。再分别取 1 mL 上述标准品溶液于 25 mL 具塞玻璃试管中,加入 1 mL Folin-酚溶液稀释液,混匀静置 5 min 后,再加入 1 mL 现配的 10% Na_2CO_3 溶液,混匀,盖上试管塞,于 35 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中显色反应 30 min 后在 765 nm 处测定吸光值。豆瓣菜样品总酚酸含量的测定:准确吸取 1 mL “1.3.1”项下制备的提取液,进行显色反应,操作同没食子酸标准曲线的检测方法。

1.3.4 UPLC-MS/MS 分析条件

1.3.4.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 和安捷伦 ZORBAX SB- C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 $^\circ\text{C}$; 样品室温度 12 $^\circ\text{C}$; 进样量: 2.0 μL ; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 过 0.22 μm 有机相微孔过滤膜过滤, 现配现用; 流动相 B: 乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0 ~ 6.50 min, 92.0% \rightarrow 50.0% A; 6.50 ~ 8.00 min, 50.0% \rightarrow 92.0% A; 8.00 ~ 10.00 min, 维持 92.0% A。检测波长为 243 nm 和 275 nm。

1.3.4.2 质谱条件

采用串联质谱 (LC-MS/MS) 和多重反应监测 (MRM) 模式对豆瓣菜中的酚酸类物质进行定性分析。采用电喷雾电离源 (ESI) 进行离子化, MRM 模式进行正负离子扫描, 毛细管电压 3.0 kV; 毛细管温度: 300 $^\circ\text{C}$, 离子源温度: 350 $^\circ\text{C}$; 脱溶剂气温度: 500 $^\circ\text{C}$; 脱溶剂气流量: 1 000 L/h; 碰撞气流速: 0.15 mL/min; 锥孔气流速: 150 L/h; 扫描范围 (m/z): 50 ~ 550。

1.3.5 豆瓣菜中酚酸类化合物的定性定量分析

用 UPLC-MS/MS 的方法进行提取液中酚酸类化合物的定性结构解析, 子离子最多选取 2 个用于

定性结构解析。采用内标法对“1.3.1”的提取液的不同种类酚酸进行定量分析, 以 275 nm 处紫外吸收色谱图的峰面积为纵坐标, 以内标浓度为横坐标制作的标准曲线回归方程式进行含量计算。

1.4 数据的统计分析

采用 Microsoft Excel 16 软件、GraphPad Prism 6.01 和 TB-tools v2.012 软件进行数据整理图标绘制, 实验数据用平均值 \pm 标准差表示, 采用 IBM SPSS Statistics 26 统计分析软件进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

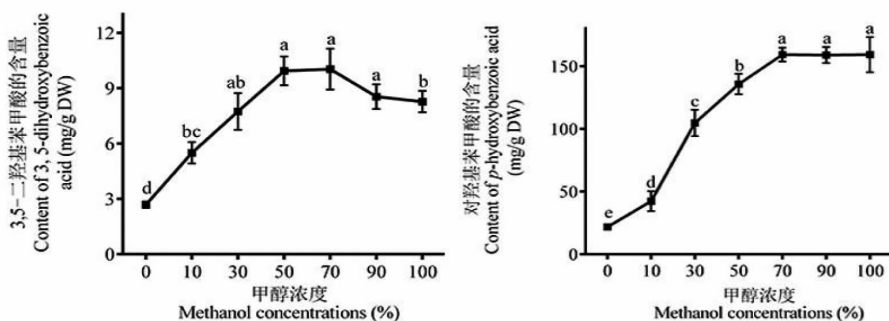
2.1 样品前处理条件的选择

配制不同浓度梯度没食子酸标准品溶液, 经过分光光度计分析, 以浓度 (X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)、吸光值 (Y) 分别为横坐标和纵坐标, 得到回归方程, 没食子酸标准曲线的回归方程为 $Y = 10.432X + 0.0014$ ($R = 0.9995$), 相关系数较高, 其回归方程线性关系良好。

在以往测定植物性样品的酚酸的报道中, 多选用乙醇-水或者甲醇水为提取酚类物质的溶剂^[13,20]。超高效液相色谱-串联质谱的流动相体系多为甲醇-水或者乙腈-水^[17,21], 为检测过程中减少溶剂效应对峰型的影响, 因此选择甲醇-水作为提取溶剂。试验中比较了不同浓度甲醇对豆瓣菜中主要酚酸成分提取效率的影响, 发现各酚酸的提取效果随着甲醇浓度的提高呈现先增加后降低或者趋于稳定的趋势 (见图 1), 以 70% 甲醇溶液为提取剂时测得的豆瓣菜中鞣花酸、3,5-二羟基苯甲酸、绿原酸、对羟基苯甲酸以及总酚酸含量最高。因此, 后续研究以 70% 甲醇溶液为豆瓣菜酚酸的提取剂。

2.2 色谱条件的优化

本研究考察了不同流动相体系以及在流动相中添加不同酸对目标化合物离子色谱峰峰型及响应信号的影响。结果表明, 采用 0.1% 甲酸水溶液-乙腈



续图 1 (Continued Fig. 1)

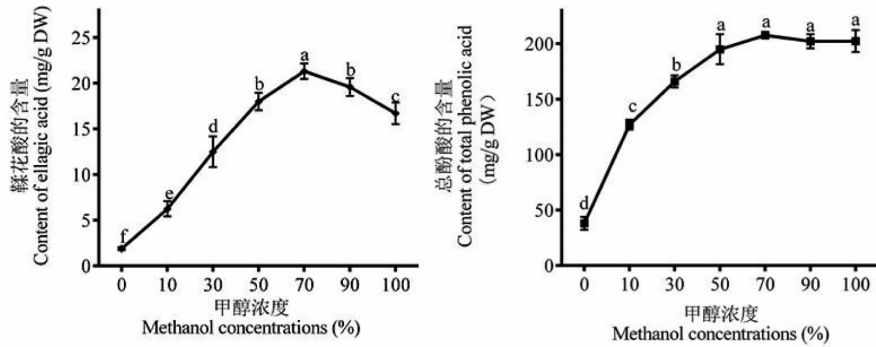


图1 不同甲醇浓度对豆瓣菜中主要酚酸和总酚酸提取效果的影响

Fig. 1 Effects of different methanol concentrations on the extraction efficiency of main phenolic acids and total phenolic acid in *N. officinale*

注:不同小写字母表示在0.05水平上差异显著,下同。Note: Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level, the same below.

作为流动相,进行梯度洗脱时,峰型比0.1%磷酸水溶液-甲醇、0.1%甲酸-甲醇、0.5%乙酸-乙腈等有明显改善,17个酚酸类化合物能得到较好的峰形、分离度和较高的响应值。所分析的酚酸类组分,大都具有酚羟基官能团或同时含有羟基与羧基结构,表现出一定的弱酸性^[18]。在流动相中加入一定浓度的甲酸有利于抑制酚酸类组分与色谱柱的静电作

用,减少拖尾现象,改善峰形,但是酸含量达到一定浓度后又会抑制负离子模式化合物的电离,降低灵敏度。因此,试验最终采用0.1%甲酸水和乙腈作为流动相,通过进行梯度洗脱,在10 min内,实现了各酚酸类化合物的彻底分离(见图2)。与Zhao等^[17]文献报道的15 min完成分离酚酸类物质相比,本方法将所需时间缩短了5 min。

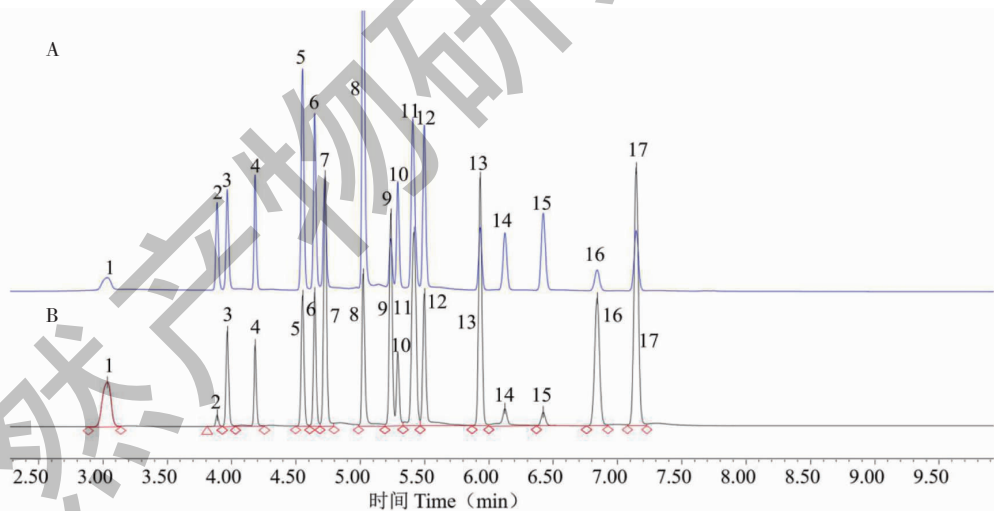


图2 豆瓣菜样品(A)和酚酸类化合物的混合标样(B)的液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatogram of *N. officinale* sample(A) and mixed phenolic acids standards(B)

注:1:没食子酸;2:原儿茶酸;3:绿原酸;4:咖啡酸;5:香草酸;6:3,5-二羟基苯甲酸;7:对羟基苯甲酸;8:丁香酸;9:鞣花酸;10:对香豆酸;11:异绿原酸A;12:阿魏酸;13:异阿魏酸;14:邻香豆酸;15:熊果酸;16:苯甲酸;17:水杨酸。Note: 1: Gallic acid; 2: Protocatechuic acid; 3: Chlorogenic acid; 4: Caffeic acid; 5: Vanillic acid; 6: 3,5-Dihydroxybenzoic acid; 7: p-Hydroxybenzoic acid; 8: Syringic acid; 9: Ellagic acid; 10: Coumalic acid; 11: Isochlorogenic acid A; 12: Ferulic acid; 13: Isoferulic acid; 14: o-Coumaric acid; 15: Ursolic acid; 16: Benzoic acid; 17: Salicylic acid.

2.3 色谱柱的选择

本研究考察了不同色谱柱对17个酚酸类化合物混合标准品的离子色谱峰峰型及响应信号的影响。试验结果表明:ZORBAX SB-C₁₈色谱柱仅能分

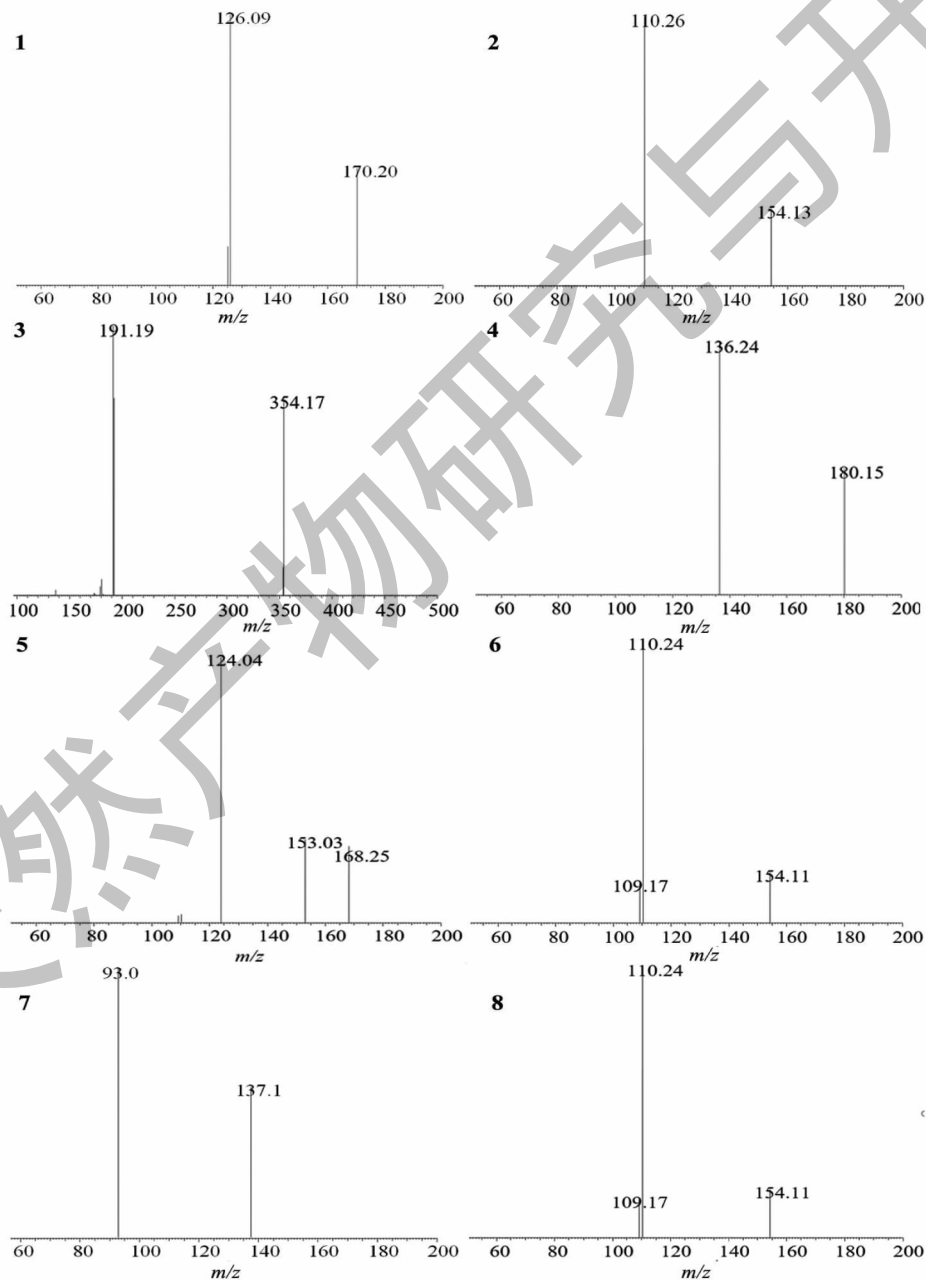
离出10种酚酸,而Waters的HSS T3色谱柱和BEH C₁₈色谱柱均能实现17个酚酸的分离。然而,在峰形和分离度方面,HSS T3色谱柱略优于BEH C₁₈色谱柱,具有更窄的峰型特征,尤其是在对3,5-二羟

基苯甲酸和对羟基苯甲酸等化合物中差异更为显著(见图2)。窄且对称的峰型有助于准确定量分析,因此,在试验中选择了 HSS T3 作为分离柱。

2.4 质谱条件的选择和优化

Waters 三重四极杆质谱条件的优化主要包括确定各化合物的母离子、子离子、锥孔电压(CV)、碰撞能量(CE)等参数。本试验配制了 500.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度的 17 个酚酸类组分单标溶液,流动相为 0.1% 甲酸-水溶液:流动相 B(乙腈) = 50:50 (V/V),通过质谱

直接进样对标准溶液进行电喷雾正离子模式(ESI^+)和负离子模式(ESI^-)下自动调谐方式扫描,以确定 17 个酚酸的裂解电压、碰撞能量。实验结果表明,在 ESI^- 电离方式下相较于 ESI^+ 更容易得到稳定的母离子及子离子,并且响应信号更佳。针对豆瓣菜酚酸的分析采用串联质谱 MRM 模式进行信号采集,在 ESI^- 电离方式下,17 个酚酸均可形成稳定的准分子离子峰(见图3)。具体关于各个酚酸标准品的质谱参数详见表 2。



续图 3(Continued Fig.3)

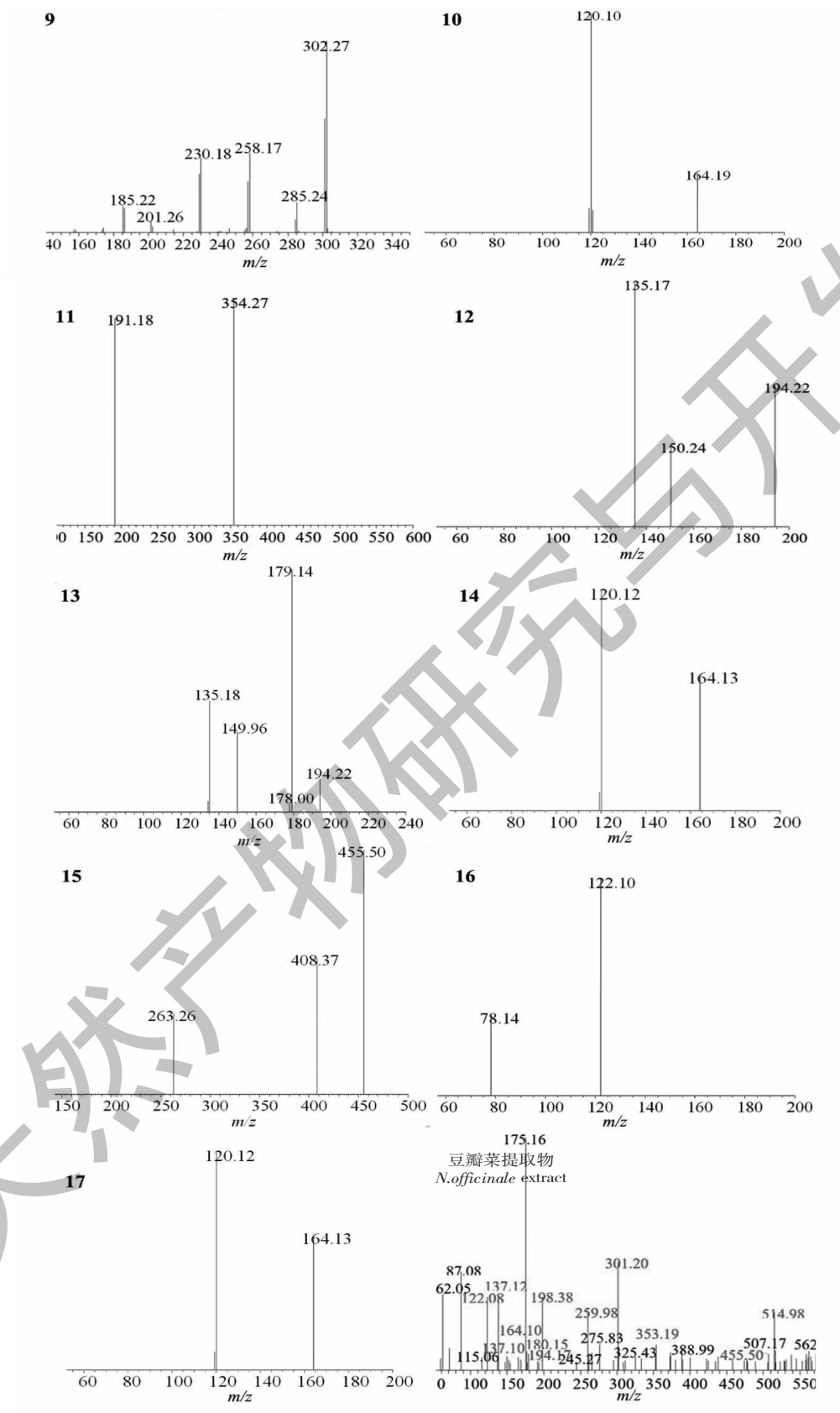


图 3 17 个酚酸类物质和豆瓣菜提取物的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of 17 phenolic acids and *N. officinale* extract

表 2 目标化合物的质谱分析参数

Table 2 UPLC-MS/MS parameters for target compounds

化合物编号 Compound number	t_R (min)	分子式 Molecular Formula	化合物 Compound	m/z		锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)
				母离子 Parent ion	子离子 Daughter ion		
1	3.036	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 Gallic acid	170.20	126.09*	28	14.24
2	3.888	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸 Protocatechuic acid	154.11	110.26*	6	14.22
3	3.967	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 Chlorogenic acid	354.17	191.19*	15	31.14
4	4.183	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸 Caffeic acid	180.15	136.24*	30	15.30
5	4.552	C ₈ H ₈ O ₄	香草酸 Vanillic acid	168.25	153.03*、124.04	36	14.19
6	4.647	C ₇ H ₆ O ₄	3,5-二羟基苯甲酸 3,5-Dihydroxybenzoic acid	154.11	110.24*	14	14.18
7	4.728	C ₇ H ₆ O ₃	对羟基苯甲酸 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	137.1	93.0*	36	12.16
8	5.023	C ₉ H ₁₀ O ₅	丁香酸 Syringic acid	198.27	183.00*、154.03	48	14.20
9	5.238	C ₁₄ H ₆ O ₈	鞣花酸 Ellagic acid	302.27	258.15*、230.18	30	12.14
10	5.28	C ₉ H ₈ O ₃	对香豆酸 Coumalic acid	164.19	120.10*	44	16.26
11	5.418	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	354.27	191.18*	30	16.32
12	5.499	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸 Ferulic acid	194.22	150.24*、135.17	15	12.14
13	5.933	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	异阿魏酸 Isoferulic acid	194.22	159.14*、135.18	6	12.14
14	6.126	C ₉ H ₈ O ₃	邻香豆酸 <i>o</i> -Coumaric acid	164.13	120.12*	40	30.35
15	6.423	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸 Ursolic acid	455.50	408.37*、263.26	44	30.42
16	6.842	C ₇ H ₆ O ₂	苯甲酸 Benzoic acid	122.10	78.14*	26	12.16
17	7.146	C ₇ H ₆ O ₃	水杨酸 Salicylic acid	138.16	94.18*	36	16.12

注: * 定量离子

Note: * Quantitative ion.

2.5 方法评价

2.5.1 线性范围考察

在优化的条件下,测定一系列不同浓度的 17 个酚酸标准溶液,根据其浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)与对应的色谱峰峰面积响应值(Y)作标准曲线,计算回归方程和相关系数。结果显示,这 17 个物质在相应浓度范围内呈良好线性关系,相关系数(R)介于 0.999 2 ~

0.999 8 之间。方法检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)基于特征离子色谱峰色谱信号 3 倍信噪比($S/N \geq 3$)和 10 倍信噪比($S/N \geq 10$), LOD 范围为 0.840 1 ~ 4.040 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LOQ 范围为 2.001 ~ 20.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可满足定量分析需求,具体结果见表 3。

表 3 17 个酚酸类组分检测的方法学验证

Table 3 Methodological verification of 17 phenolic acid components

化合物编号 Compound number	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (R)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	$Y = 11\,424.01X + 7\,791.70$	0.999 8	0.546 7 ~ 20.06	1.440	5.303
2	$Y = 9\,067.80X - 8\,651.90$	0.999 6	0.510 2 ~ 32.21	1.120	12.00
3	$Y = 7\,007.50X - 6\,730.50$	0.999 6	0.900 0 ~ 80.63	1.241	3.122
4	$Y = 13\,083.01X - 9\,917.40$	0.999 7	0.920 1 ~ 16.72	2.101	4.651
5	$Y = 12\,488.02X - 11\,762.01$	0.999 6	0.530 4 ~ 16.25	2.520	4.212
6	$Y = 1\,057.90X - 905.41$	0.999 7	0.700 4 ~ 120.6	0.8401	20.50
7	$Y = 552.43X - 448.78$	0.999 4	0.280 0 ~ 250.9	0.0500	20.50
8	$Y = 25\,984.40X - 22\,837.04$	0.999 7	0.542 3 ~ 8.16	1.421	20.00

续表 3 (Continued Tab. 3)

化合物编号 Compound number	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (<i>R</i>)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
9	$Y = 1\ 954.50X - 1\ 739.80$	0.999 7	0.930 1 ~ 80.36	1.472	20.40
10	$Y = 164\ 760.0X - 15\ 400.0$	0.999 6	0.164 5 ~ 20.02	1.465	2.001
11	$Y = 22\ 028.08X - 21\ 040.04$	0.999 6	0.852 1 ~ 20.99	1.011	2.002
12	$Y = 30\ 434.04X - 26\ 503.05$	0.999 5	0.420 1 ~ 8.850	1.092	2.001
13	$Y = 17\ 079.04X - 14\ 269.10$	0.999 7	0.650 1 ~ 8.122	0.950 2	2.005
14	$Y = 28\ 611.01X - 27\ 500.10$	0.999 6	0.410 0 ~ 8.960	0.941 0	1.302
15	$Y = 3\ 950.60X - 3\ 028.20$	0.999 2	0.851 0 ~ 20.28	1.091	1.201
16	$Y = 2\ 432.80X - 2\ 243.10$	0.999 2	0.610 1 ~ 20.94	4.040	15.00
17	$Y = 736.45X - 798.01$	0.999 3	0.920 4 ~ 160.5	1.092	13.20

取 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液连续进样 6 次, 计算 17 个目标成分峰面积的相对偏差 (relative standard deviation, RSD), 考察其精密度。结果显示, 17 个酚酸的精密度 RSD 范围为 0.23% ~ 2.3%, 结果表明本实验方法具有较好的精密度。

2.5.2 稳定性试验

取同一样品供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 进样 6 次, 测定目标化合物峰面积的 RSD, 考察其稳定性。结果显示, 17 个酚酸的稳定性 RSD 范围为 0.41% ~ 6.5%, 其中咖啡酸、香草酸、原儿茶酸和绿原酸的稳定性 RSD 高于 5.0%, 表明该样品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.5.3 重复性试验

取同一豆瓣菜样品, 按照“1.3.1”项下方法制备 6 份样品溶液, 按“1.5.2”项下条件测定 17 个酚酸的峰面积, 计算各物质量的 RSD 范围为 0.31% ~ 3.5%, 结果表明样品重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验

根据各酚酸类组分在 NAS13 样品中含量和各化合物的线性范围确定目标化合物在样品中的加标量。在优化实验条件下进行低、中和高水平加标, 每个加标水平重复 6 次。结果显示, 17 个酚酸的平均加标回收率范围为 94.63% ~ 102.4%, RSD 为 0.64% ~ 4.4%, 表明该分析方法具有较好的准确度 (见表 4)。

表 4 豆瓣菜样品中添加 17 个酚酸的回收率结果 ($n = 6$)Table 4 Recovery rates of 17 phenolic acids in *N. officinale* samples ($n = 6$)

化合物编号 Compound number	本底值 Background (mg/g)	加标量 Addition (mg/g)	测量值 Measured value (mg/g)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0.320 1	0.403 0	0.688 5	95.21	99.64	3.1
	0.319 9	0.810 5	1.149	101.6		
	0.321 3	2.014	2.384	102.1		
2	2.541	0.402 4	2.913	98.95	97.80	1.7
	2.532	0.805 4	3.307	99.09		
	2.529	2.205	4.514	95.36		
3	2.981	0.204 7	2.951	92.62	97.80	3.7
	2.983	0.400 4	3.391	100.2		
	2.979	1.056	4.058	100.6		
4	1.351	0.400 4	1.652	94.32	96.50	4.4
	1.355	0.800 5	2.213	102.7		
	1.352	2.054	3.155	92.50		
5	0.991 1	0.405 6	1.289	92.28	96.52	4.1

续表 4(Continued Tab. 4)

化合物编号 Compound number	本底值 Background (mg/g)	加标量 Addition (mg/g)	测量值 Measured value(mg/g)	回收率 Recovery(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
	0.989 9	0.800 3	1.665	92.99	96.52	4.1
	0.990 1	2.000	3.029	101.3		
6	9.850	1.000 3	10.16	93.66	95.76	3.1
	9.854	2.010	11.09	93.45		
	9.849	4.006	13.88	100.2		
7	162.5	10.89	164.2	94.69	96.49	2.5
	162.4	20.54	173.4	94.76		
	162.4	50.89	213.4	100.0		
8	0.799 9	0.404 7	1.150	95.43	98.87	3.1
	0.795 6	0.800 4	1.570	98.34		
	0.797 8	2.230	3.114	102.9		
9	27.24	10.01	36.32	97.51	96.71	2.0
	27.21	20.23	46.82	98.69		
	27.23	50.04	72.57	93.92		
10	0.680 1	0.400 1	1.096	101.5	102.40	0.65
	0.681 1	0.800 4	1.524	102.9		
	0.684 2	2.171	2.936	102.8		
11	0.030 1	0.202 1	0.235 3	101.4	98.43	2.1
	0.030 4	0.400 3	0.415 8	96.55		
	0.030 3	1.021	1.024	97.39		
12	0.170 1	0.200 2	0.371 7	100.4	98.99	2.7
	0.170 7	0.405 4	0.548 7	95.24		
	0.171 1	1.058	1.246	101.4		
13	0.380 4	0.200 1	0.537 1	92.53	94.63	1.6
	0.380 7	0.400 4	0.742 4	95.05		
	0.381 3	1.002	1.332	96.32		
14	0.150 7	0.200 1	0.343 4	97.90	97.98	2.7
	0.150 9	0.400 4	0.558 7	101.3		
	0.151 2	1.023	1.112	94.71		
15	0.751 1	0.400 1	1.097	95.29	98.31	2.2
	0.757 3	0.800 4	1.565	100.5		
	0.751 5	2.001	2.730	99.17		
16	0.680 4	0.410 0	1.056	96.86	97.43	3.4
	0.680 6	0.821 0	1.405	93.58		
	0.680 7	2.025	2.756	101.9		
17	1.112	0.400 4	1.441	95.29	98.31	2.2
	1.117	0.800 4	1.926	100.5		
	1.121	2.021	3.116	99.17		

2.6 豆瓣菜样品中酚酸的测定结果

2.6.1 豆瓣菜不同部位酚酸类物质含量的比较

NAS14 品种可结荚,其种子是目前国内主销种子,NAS13 春季不结荚,但在福建高山地区可越冬,是福建主栽豆瓣菜品种。通过 UPLC 分析,比较了长势一致的 NAS14 和 NAS13 植株的整株、根、茎、叶、花或者豆荚的甲醇提取物中总酚酸的含量。结果如图 4 所示,豆瓣菜各部位中总酚酸的含量差异显著。在 NAS14 品种中不同部位的总酚酸含量由高至低依次为叶、花、根、豆荚和茎,叶中总酚酸含量最高为 142.06 mg/g DW,茎组织中总酚酸的含量最低,为 74.04 mg/g DW;在 NAS13 品种叶的总酚酸含量仍最高,为 210.33 mg/g DW。

由于豆瓣菜中酚酸类物质主要在叶组织中,NAS13 品种叶的总酚酸含量相对较高,因此我们采用 UPLC-MS/MS 分析了 NAS13 品种的整株、根、茎

和叶样品中酚酸类化合物的成分和含量。结果如图 5 所示,豆瓣菜不同组织样品共鉴定出 17 个酚酸类化合物,主要有羟基苯甲酸型和羟基肉桂酸型两类。根据其化学结构分类,对羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、鞣花酸、原儿茶酸、水杨酸、没食子酸、香草酸、苯甲酸、丁香酸、属于羟基苯甲酸型;咖啡酸、异阿魏酸、阿魏酸、邻香豆酸、属于羟基肉桂酸型;另外,熊果酸、绿原酸、异绿原酸 A 属于缩合酚酸。豆瓣菜中的酚酸类化合物主要是羟基苯甲酸型酚酸,含量最高的 3 种酚酸为对羟基苯甲酸、鞣花酸和 3,5-二羟基苯甲酸,其中在叶中对羟基苯甲酸相对百分含量高达 78.13%。不同豆瓣菜组织中酚酸组分一致,但各部位中的酚酸类化合物的含量差异显著。苯甲酸衍生物的含量高于肉桂酸衍生物,对羟基苯甲酸的含量在各组织中含量最高,鞣花酸次之。

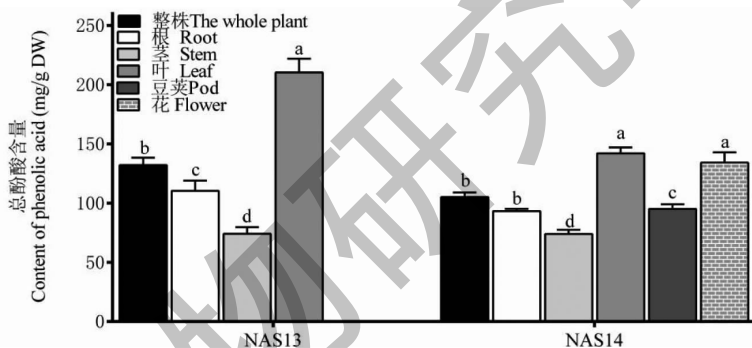


图 4 豆瓣菜不同部位中的总酚酸含量

Fig. 4 Content of total phenolic acids in different parts of *N. officinale*

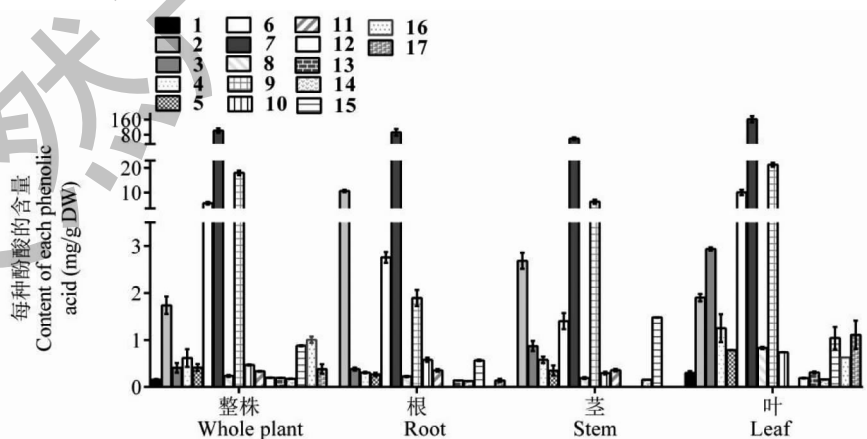


图 5 豆瓣菜不同组织中酚酸含量

Fig. 5 Content of phenolic acids in different tissues of *N. officinale*

2.6.2 18 份豆瓣菜材料中酚酸的含量及分布情况
根据内标法,分析比较了 18 份豆瓣菜叶中酚酸

类化合物的组成和含量,结果如表 5 所示,豆瓣菜中酚酸种类包括羟基苯甲酸类酚酸和肉桂酸类酚酸两

大类,不同品种豆瓣菜的叶中各酚酸化合物含量(以干基计)范围为 0.120 1 ~ 181.6 mg/g DW。不同豆瓣菜品种的叶中各酚酸含量差异较大,主要以羟基苯甲酸型酚酸形式存在,且羟基苯甲酸类酚酸含量明显大于肉桂酸类酚酸。豆瓣菜叶中检测到的主要酚酸种类和含量高低依次为对羟基苯甲酸 > 鞣花酸 > 绿原酸 > 3,5-二羟基苯甲酸 > 水杨酸 > 熊果酸 > 香草酸 > 原儿茶酸 > 苯甲酸 > 丁香酸 > 对香豆

酸。叶中对羟基苯甲酸含量在各品种中占比最大,含量范围为 76.49 ~ 181.6 mg/g DW,占总酚酸含量的 62.06% ~ 80.22%,其次为鞣花酸,含量范围为 19.30 ~ 28.90 mg/g DW,占总酚酸含量的 9.770% ~ 17.64%。豆瓣菜叶中其他酚酸如没食子酸、异绿原酸 A、阿魏酸、异阿魏酸、邻香豆酸和水杨酸的含量普遍偏低,其中,异绿原酸 A、苯甲酸、阿魏酸和水杨酸只在部分材料中检出微量。

表 5 不同豆瓣菜品种中酚酸类组分的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Content of phenolic acids in different *N. officinale* cultivars($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号 No.	酚酸类化合物含量 Content of phenolic acids (mg/g DW)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1079	0.31 ± 0.03	1.04 ± 0.02	10.59 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.42 ± 0.02	5.85 ± 0.18	120.32 ± 8.80	±1.15	24.05 ± 0.02	0.49 ± 0.38	0.27 ± 0.01	ND	0.29 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.53 ± 0.00	2.53 ± 0.00	ND	
NAS1	0.30 ± 0.02	2.03 ± 0.04	12.82 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.54 ± 0.01	4.98 ± 0.21	156.75 ± 2.94	±0.93	28.90 ± 0.02	0.58 ± 1.43	0.20 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.65 ± 0.00	1.53 ± 0.13	4.96 ± 0.13	
NAS2	0.29 ± 0.02	0.42 ± 0.14	7.07 ± 0.01	0.90 ± 0.04	0.48 ± 0.01	4.22 ± 0.06	109.40 ± 7.26	±0.80	25.47 ± 0.03	0.53 ± 0.59	0.20 ± 0.00	0.18 ± 0.00	0.34 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.52 ± 0.00	1.53 ± 0.04	3.57 ± 0.23	
NAS3	0.26 ± 0.01	1.36 ± 0.04	7.34 ± 0.00	0.94 ± 0.11	2.13 ± 0.02	7.30 ± 0.18	96.85 ± 1.10	±1.27	23.25 ± 0.09	0.34 ± 0.23	ND	ND	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.56 ± 0.00	0.65 ± 0.01	ND	
NAS4	0.31 ± 0.01	1.23 ± 0.04	9.62 ± 0.17	1.86 ± 0.05	0.25 ± 0.03	4.55 ± 0.16	110.32 ± 8.13	±1.02	21.57 ± 0.43	0.50 ± 0.03	ND	ND	ND	0.13 ± 0.00	0.67 ± 0.00	ND	ND	
NAS5	0.35 ± 0.01	2.59 ± 0.08	5.52 ± 3.32	0.98 ± 0.01	ND	7.56 ± 0.14	146.50 ± 2.00	±0.85	25.96 ± 0.01	0.54 ± 0.63	0.18 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.15 ± 0.00	ND	ND	0.66 ± 0.01	
NAS7	0.33 ± 0.01	1.29 ± 0.01	1.18 ± 0.00	1.58 ± 0.11	2.99 ± 0.00	4.86 ± 0.02	117.15 ± 9.38	±1.44	26.19 ± 0.22	0.60 ± 1.52	0.37 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.29 ± 0.02	0.25 ± 0.00	3.17 ± 0.02	ND	ND	
NAS8	0.28 ± 0.04	0.57 ± 0.03	9.84 ± 0.57	1.40 ± 0.02	1.48 ± 0.03	10.71 ± 0.01	97.34 ± 0.79	±1.60	27.78 ± 0.02	0.53 ± 3.43	0.37 ± 0.07	ND	0.31 ± 0.00	0.27 ± 0.01	3.12 ± 0.06	ND	1.27 ± 0.00	
NAS9	0.27 ± 0.03	1.26 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.47 ± 0.00	2.73 ± 0.03	4.18 ± 0.28	76.49 ± 32.76	±1.58	15.42 ± 0.37	0.45 ± 5.50	0.16 ± 0.09	ND	0.21 ± 0.00	0.18 ± 0.00	0.56 ± 0.01	ND	ND	
NAS11	0.26 ± 0.03	0.45 ± 0.11	3.74 ± 0.16	0.30 ± 0.18	1.05 ± 0.09	5.22 ± 0.21	153.06 ± 12.03	±0.50	24.41 ± 0.06	0.62 ± 1.59	0.08	ND	ND	0.15 ± 0.09	0.78 ± 0.12	0.67 ± 0.02	ND	
NAS12	0.30 ± 0.02	1.21 ± 0.08	1.28 ± 0.09	0.63 ± 0.02	1.76 ± 0.09	5.19 ± 0.37	102.06 ± 2.76	±0.84	19.30 ± 0.03	0.90 ± 1.07	0.00	ND	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.15 ± 0.02	3.69 ± 0.00	5.88 ± 0.22	
NAS13	0.30 ± 0.02	2.57 ± 0.62	2.94 ± 0.02	1.25 ± 0.17	0.78 ± 0.00	10.03 ± 0.64	62.45 ± 9.67	±0.83	22.64 ± 0.01	0.69 ± 2.08	0.05	ND	0.19 ± 0.00	0.31 ± 0.01	0.16 ± 0.00	1.04 ± 0.14	0.63 ± 0.00	1.11 ± 0.17
NAS14	0.29 ± 0.01	1.12 ± 0.02	1.16 ± 0.03	1.06 ± 0.02	ND	4.61 ± 0.06	109.75 ± 3.19	±1.33	20.76 ± 0.04	0.38 ± 0.02	ND	ND	ND	0.13 ± 0.00	0.63 ± 0.02	0.54 ± 0.00	ND	
NAS15	0.40 ± 0.03	1.43 ± 0.05	3.53 ± 0.05	1.18 ± 0.04	0.90 ± 0.04	11.63 ± 0.41	81.64 ± 6.23	±0.97	22.12 ± 0.69	ND	ND	ND	0.19 ± 0.00	0.31 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.66 ± 0.00	0.63 ± 0.01	0.67 ± 0.00
NAS16	0.31 ± 0.02	1.98 ± 0.78	3.32 ± 0.03	1.77 ± 0.05	2.71 ± 0.15	10.14 ± 0.30	44.85 ± 0.58	±0.88	20.47 ± 1.73	0.62 ± 0.00	ND	ND	0.18 ± 0.00	0.31 ± 0.04	0.72 ± 0.07	ND	ND	ND
NAS17	0.33 ± 0.01	2.21 ± 0.70	2.92 ± 0.11	1.39 ± 0.18	0.69 ± 0.00	11.19 ± 0.28	44.80 ± 7.75	±0.88	27.65 ± 0.01	0.69 ± 1.50	0.00	ND	0.23 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.62 ± 0.00	0.71 ± 0.02
NAS18	0.23 ± 0.03	0.97 ± 0.04	1.14 ± 0.04	1.23 ± 0.00	2.55 ± 0.04	4.64 ± 0.27	90.27 ± 22.84	±1.09	22.48 ± 0.21	0.71 ± 2.43	0.00	ND	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.98 ± 0.05	0.66 ± 0.00	ND
9P24	0.32 ± 0.01	4.08 ± 0.04	5.50 ± 0.15	1.16 ± 0.03	1.00 ± 0.05	12.14 ± 0.45	73.72 ± 8.07	±1.17	27.68 ± 0.12	0.68 ± 0.02	ND	ND	0.19 ± 0.00	0.29 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.79 ± 0.00	1.11 ± 0.06	ND

注:ND 表示未检出。

Note:ND: not detected.

为进一步分析不同酚酸类化合物在 18 个豆瓣菜品种中的情况,本研究对检测出的酚酸类化合物种类及含量进行热图分析(见图 6)。结果表明,18 个豆瓣菜品种按酚酸化合物种类和含量可以分成 3 个大的类群 I、II 和 III。其中类群 I 的野生种豆瓣菜 9P24 和 NAS16 以及栽培种 NAS13、NAS17 和 NAS15 等的原儿茶酸、羟基苯甲酸、鞣花酸和 3,5-

二羟基苯甲酸含量较高;类群 III 的 NAS1、NAS2、NAS11、NAS12 和 1079 中苯甲酸、水杨酸、绿原酸和异绿原酸 A 含量高于其他品种。从热图可见,不同品种豆瓣菜的酚酸类化合物种类及含量存在一定的差异,18 个品种的 17 个酚酸类化合物的聚类之间呈现一定相关性。

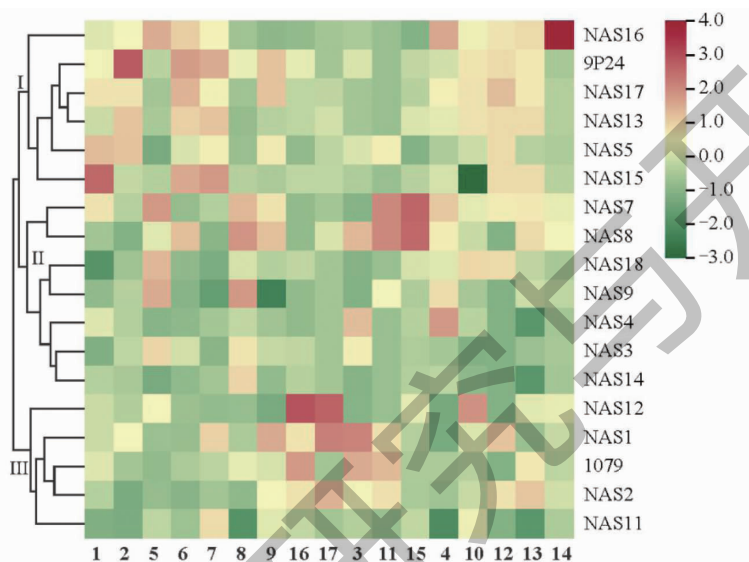


图 6 不同品种豆瓣菜中酚酸类物质的含量热图

Fig. 6 Heat map of phenolic acids content in different cultivars of *N. officinale*

从不同材料的总酚酸含量来看(以干基计,见图 7),18 份豆瓣菜种质资源中的总酚酸含量存在显著差异,总酚酸含量范围为 106.0 ~ 230.0 mg/g DW,含量最高的材料是 9P24,其次是 NAS15,含量最低的材料是 NAS 9。总酚酸含量高于 200.0 mg/g DW 的豆瓣菜品种有 4 份,分别是 9P24、NAS1、NAS13 和 NAS15;总酚酸含量在 100.0 ~ 200.0 mg/

g DW 的豆瓣菜品种有 11 份;总酚酸含量低于 100.0 mg/g DW 的豆瓣菜品种仅有 3 份。结果表明,不同豆瓣菜品种总酚酸含量差异较大,其中 9P24、NAS15、NAS13 和 NAS1 品种是富含酚酸类化合物的豆瓣菜种质资源,可为后续豆瓣菜抗性育种或者种质资源的开发利用研究提供优良的种质资源。

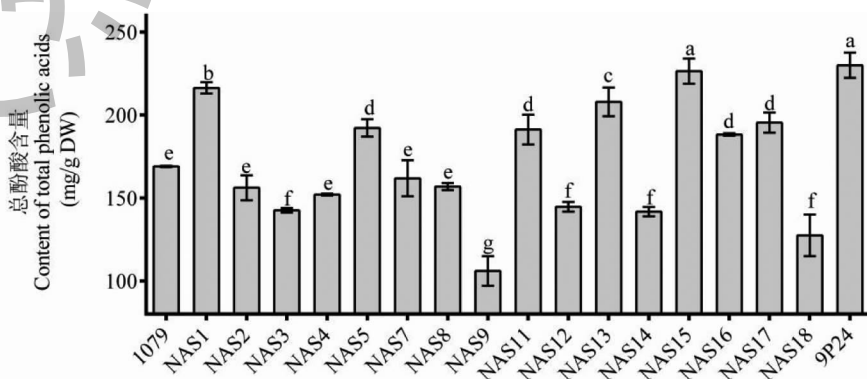


图 7 不同品种豆瓣菜叶中总酚酸含量

Fig. 7 Content of total phenolic acid in leaves of different *N. officinale* cultivars

3 讨论与结论

酚酸是植物次级代谢产物中的一大类化合物,它们在植物界中种类繁多,具有多种生物学功能。目前已从植物中成功地分离、鉴定了 1 000 余种酚酸类化合物,并对其中一些酚酸及其衍生物开展了广泛的生物活性及药理方面的研究。酚酸的存在对人类生产和生活也具有重要作用。Liu^[18]、He^[21]和 Wang^[20]等研究表明,采用超高效液相色谱法可用于测定植物中酚酸类化合物的含量。本研究通过色谱-质谱条件的优化、供试品制备方法考察建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时对豆瓣菜中酚酸类化合物进行了定性和定量分析。为了获得更好的色谱分离和质谱效应,本研究考察了不同的流动相和梯度洗脱。考虑到酚酸类化合物的极性相对较低,最终采用 8% ~ 50% 乙腈梯度洗脱,该方法较 Liu 等^[18]的研究更节约乙腈试剂且环保。另外,由于使用纯乙腈和水造成色谱峰的严重尾化,本方法中在水相中加入甲酸来改善峰形,以流动相为乙腈-0.1% 甲酸水的梯度洗脱,定性成分色谱峰型较好,没有拖尾,基线平直。Klimek-Szczykutowicz 等^[16]采用 HPLC-DAD 方法 85 min 内分离了豆瓣菜的咖啡酸、香豆酸、鞣花酸、阿魏酸和没食子酸等 10 种酚酸类化合物,本研究中的梯度洗脱时间不到 8 min 就可以准确定量分离豆瓣菜中 17 个酚酸,相比 Zhao 等^[17]的 UPLC-MS/MS 方法的梯度洗脱时间(15 min)也更短。本研究中质谱条件的优化比较了负离子模式和正离子模式扫描检测,结果表明,负离子模式电离效果优于正离子模式。此外,考虑到化合物的结构性质,在负离子模式下电离效果更好,得到的串联质谱图更全面,故选择负离子模式为检测手段。综上所述,本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法灵敏、快速、准确,适用于豆瓣菜中酚酸类物质组分的定性定量分析,可为豆瓣菜的资源开发利用提供参考。

本研究测定的 18 份豆瓣菜种质资源中总酚酸的含量范围为 106.0 ~ 230.0 mg/g DW,不同品种豆瓣菜酚酸类物质组分的含量差异明显,其中野生种豆瓣菜的叶中 9P24 品种的总酚酸含量最高,比总酚酸含量最低的 NAS9 品种高 2.17 倍,高出的部分主要是对羟基苯甲酸、鞣花酸、绿原酸和 3,5-二羟基苯甲酸。不同豆瓣菜组织中酚酸类化合物的含量差异显著,各部位的总酚酸由高至低依次为、花、根、豆荚和茎,叶的总酚酸含量高达 142.1 mg/g DW,比茎

组织高近 1 倍。从酚酸组成来看,豆瓣菜中存在不同形式的酚酸,其含量也各不相同,在所分析的豆瓣菜样品中共检出 17 个酚酸类组分,各酚酸化合物含量范围为 0.120 1 ~ 181.6 mg/g DW,包括羟基苯甲酸型酚酸、羟基肉桂酸型酚酸和缩合酚酸,主要以羟基苯甲酸型酚酸形式存在,且羟基苯甲酸类酚酸含量明显大于肉桂酸类酚酸,这与 Klimek-Szczykutowicz 等^[16]得到研究的结论相符。相对于其他酚酸组分,在所有的豆瓣菜样品中,对羟基苯甲酸的含量在叶中均为最高,在叶中相对百分含量高达 80.22%;其次为鞣花酸,最高含量为 28.90 mg/g DW,最低含量为 19.30 mg/g DW;其他酚酸如没食子酸、异绿原酸 A、阿魏酸、异阿魏酸、邻香豆酸和水杨酸的含量普遍偏低,其中,异绿原酸 A、苯甲酸、阿魏酸和水杨酸只在部分材料中检出微量。据此结果可推测,对羟基苯甲酸可能是豆瓣菜起主要作用的功能性成分之一,但还需待进一步研究证实。值得注意的是,本研究 NAS5 中原儿茶酸的最高含量为 2.590 mg/g DW,明显高于 Klimek-Szczykutowicz 等^[16]组织培养豆瓣菜中原儿茶酸的含量(0.970 0 mg/g DW),推测豆瓣菜中酚类物质的含量与品种和种植条件有关。

本研究建立了 UPLC-MS/MS 测定豆瓣菜中 17 个酚酸的方法,该方法具有灵敏、快速、准确和节省溶剂的特点。通过方法学验证,证明采用该方法测定豆瓣菜中 17 个酚酸线下关系良好,检出限、定量限低,精密度高,稳定性好,方法准确度符合要求,适用于豆瓣菜中酚酸类化合物的定性和定量分析。本研究分析了 18 份豆瓣菜种植资源中的酚酸组分,发现豆瓣菜中酚酸组成主要以羟基苯甲酸型酚酸形式存在,包括对羟基苯甲酸、鞣花酸、绿原酸和 3,5-二羟基苯甲酸等,总酚酸含量范围为 106.0 ~ 230.0 mg/g DW。本研究不仅有助于更加清楚地了解豆瓣菜酚酸的组成及分布,同时对于进一步挖掘其功能营养成分具有重要的现实意义。

参考文献

- 1 Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Blicharska E, et al. Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress) [J]. *Fitoterapia*, 2018, 129:283-292.

- 2 Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Blicharska E, et al. Phytochemical and biological activity studies on *Nasturtium officinale* (watercress) microshoot cultures grown in RITA® temporary immersion systems [J]. *Molecules*, 2020, 25: 5257.
- 3 Nikol Voutsina I, Adrienne CP, Robert DH, et al. Characterization of the watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae) transcriptome using RNASeq and identification of candidate genes for important phytonutrient traits linked to human health [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 378-315.
- 4 Kyriakou S, Tragkola V, Alghol H, et al. Evaluation of bioactive properties of lipophilic fractions of edible and non-edible parts of *Nasturtium officinale* (watercress) in a model of human malignant melanoma cells [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15: 141-161.
- 5 Ramezani S, Javadi I, Kokhdan EP, et al. Protective and therapeutic effects of ethanolic extract of *Nasturtium officinale* (watercress) and vitamin E against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Res Pharm Sci*, 2021, 16: 94-102.
- 6 Shahani S, Behzadfar F, Jahani D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Nasturtium officinale* involved in attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2017, 27: 107-114.
- 7 Sathasivam R, Bong SJ, Park CH, et al. Identification, characterization, and expression analysis of carotenoid biosynthesis genes and carotenoid accumulation in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) [J]. *ACS Omega*, 2021, 7: 430-442.
- 8 Azarmehr N, Afshar P, Moradi M, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of watercress extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Heliyon*, 2019, 5: e02072.
- 9 Chen ZJ, Wu JQ, Ma Y, et al. Biosynthesis, metabolic regulation and bioactivity of phenolic acids in plant food materials [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2018, 39: 321-328.
- 10 Song HX, Zhang LQ, Wu LP, et al. Phenolic acid profiles of common food and estimated natural intake with different structures and forms in five regions of China [J]. *Food Chem*, 2020, 321: 126675.
- 11 Rockett FC, Schmidt HD, Schmidt L, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of *Butia* and *Opuntia* fruits [J]. *Food Res Int*, 2020, 137: 109740.
- 12 Mandal SM, Chakraborty D, Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5: 359-368.
- 13 Sun Y, Cui J, Tian L, et al. Phenolic acid functional quaternized chitooligosaccharide derivatives: preparation, characterization, antioxidant, antibacterial, and antifungal activity [J]. *Mar Drugs*, 2023, 21: 535-555.
- 14 Wang CQ, Chen Y, Wang L, et al. Determination of 10 polyphenol components by HPLC and antioxidant activity in the leaves of *Ilex latifolia* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 557-565.
- 15 Miklavčič Višnjevec A, Baker PW, Peeters K, et al. HPLC-DAD-qTOF compositional analysis of the phenolic compounds present in crude tomato protein extracts derived from food processing [J]. *Molecules*, 2021, 26: 6403.
- 16 Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Ekiert H. Bioaccumulation of selected macro- and microelements and their impact on antioxidant properties and accumulation of glucosinolates and phenolic acids in *in vitro* cultures of *Nasturtium officinale* (watercress) microshoots [J]. *Food Chem*, 2019, 300: 125184.
- 17 Zhao S, Zhong LL, Zhou H, et al. Identification and analysis of phenolic acids in rice using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2020, 53: 612-631.
- 18 Liu WJ, Huang B, Lin XX, et al. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds in purple potato by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Fujian J Agric Sci (福建农业学报)*, 2019, 34: 1203-1210.
- 19 Du RJ, Shi ZH, Zhan ZL, et al. Optimization of the extraction process of total phenolic acid from *Trollii Flos* by response surface methodology and study on its whitening activity [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35: 915-924.
- 20 Wang ZC, Sha YB, Yu XB, et al. Determination of 14 phenolic acids in bamboo extract by high pressure liquid chromatography [J]. *Anhui Agri Sci Bull (安徽农学通报)*, 2016, 22: 109-113.
- 21 He J, Zhang B, Lu XY, et al. Determination of ten phenolic acids in *Rosa rugosa* by ultra-performance liquid chromatography [J]. *Food Ferment Sci Technol (食品与发酵科技)*, 2019, 55: 100-105.