

木薯叶黄酮醇检测方法优化及其含量比较分析

王琴飞¹, 林立铭¹, 薛茂富¹, 张金泉², 余厚美¹, 张振文^{1*}

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/国家薯类加工技术研发分中心, 海南海口 571101; 2. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410000

摘要: 木薯叶富含丰富的黄酮醇类物质, 高效的提取和分析方法可为获取木薯叶黄酮醇提供至关重要的评价技术。本研究旨在优化木薯叶中 4 种黄酮醇物质 (杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷) 的提取和检测方法, 以及分析不同木薯品种、采收期和成熟度对这些黄酮醇含量的影响。结果表明: 使用 50%乙醇水溶液, 料液比为 1 : 50 (g/mL), 超声提取温度 50 °C, 超声提取时间 60 min 可有效提取木薯叶中的 4 种黄酮醇; 不同的 C18 色谱柱配备 HPLC-DAD 能有效分离木薯叶中的 4 种黄酮醇; 方法验证结果显示, 4 种黄酮醇在一定浓度范围内线性相关性良好, R^2 分别达到 0.9999、0.9999、0.9999 和 0.9998; 检出限在 6.0~10.0 mg/kg 之间; 定量限在 20.0~32.0 mg/kg 之间; 检测方法系统适用性较好, 保留时间和峰面积变化相对标准偏差 (RSD) 均小于 1%; 样品日内、日间和月内稳定性较好, 含量变化 RSD 在 0.44%~3.57% 之间, 平均加标回收率在 92.68%~109.14% 之间, RSD 均小于 6.0%。利用建立的提取和分析方法, 分析了 30 个木薯种质中 4 种黄酮醇含量, 芦丁和烟花苷含量占 4 种黄酮醇总量的 93.50%~99.30%, 其含量高低由芦丁和烟花苷决定, 但品种间决定黄酮醇总含量高低的相关性顺序为芦丁 > 水仙苷 > 烟花苷 > 杨梅苷; 木薯种质的不同采收期和不同成熟度叶片中黄酮醇分析表明, 在多数木薯种质中, 第 270 天采收的芦丁、烟花苷和水仙苷含量高于第 180 天, 杨梅苷因品种而异; 不同木薯种质 (除 SC09 外) 幼叶期的杨梅苷、芦丁和烟花苷含量均高于嫩叶期和成熟期; 成熟期 (除花叶木薯) 水仙苷含量均高于幼叶期和嫩叶期。本研究结果可为木薯叶黄酮醇物质的开发利用 (原料的选择、质量控制等方面) 提供评价技术和依据, 也为揭示木薯叶黄酮醇物质积累规律奠定基础。

关键词: 木薯叶; 黄酮醇; HPLC; 采收时期; 成熟度

中图分类号: S533 文献标识码: A

Optimization of Detection Methods for Flavonols in Cassava Leaves

WANG Qinfei¹, LIN Liming¹, XUE Maofu¹, ZHANG Jinquan², YU Houmei¹, ZHANG Zhenwen^{1*}

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National R & D Centre for Potato Processing, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410000, China

Abstract: Cassava leaves are rich in abundant flavonols, and efficient extraction and analysis methods are crucial for the evaluation of flavonol content in the cassava leaves. This study aims to optimize the extraction and detection methods for four flavonols (myricetin, rutin, nicotiflorin, narcissoside) in cassava leaves and to analyze the influence of different cassava varieties, harvesting periods, and maturity on the content of these flavonols. The results indicated that using a 50% ethanol-water solution, a liquid-to-material ratio of 1 : 50 (g/mL), an ultrasonic extraction temperature of 50 °C, and an ultrasonic extraction time of 60 minutes could effectively extract the four flavonols in the cassava leaves. The combination of different C18 chromatographic columns in HPLC-DAD effectively separated the four flavonoids present in the cassava leaves. The results of the method validation showed that the four flavonols exhibited good linear correlations within a certain concentration range, with R^2 values of 0.9999, 0.9999, 0.9999 and 0.9998, respectively. The detection limits ranged from 6.0 mg/kg to 10.0 mg/kg, and the quantification limits ranged from 20.0 mg/kg to 32.0 mg/kg.

收稿日期 2023-09-27; 修回日期 2023-10-24

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2023YFD1600601); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-11-HNZZW)。

作者简介 王琴飞 (1982—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 木薯营养评价与副产物综合利用。*通信作者 (Corresponding author): 张振文 (ZHANG Zhenwen), E-mail: scuta96@163.com。

The detection method demonstrates good system adaptability, with retention time and peak area relative standard deviations (RSD) being less than 1%. The samples showed good stability in terms of intra-day, inter-day, and intra-month variations, with RSD in content variations ranging from 0.44% to 3.57%. The average recovery rates of the method ranged from 92.68% to 109.14%, all with RSD values less than 6.0%. Utilizing the established extraction and analysis methods, the study analyzed the content of the four flavonols in 30 cassava germplasm resources. Rutin and nicotiflorin made up 93.50% to 99.30% of the total flavonol content in the cassava leaves, with the levels primarily determining the total flavonol content. However, the correlation order for the total flavonol content among different varieties was rutin>narcissoside>nicotiflorin>myricetin. Analysis of flavonol content in the cassava leaves from different harvest times and maturity levels of cassava germplasm revealed that in most cases, the levels of rutin, nicotiflorin and narcissoside were higher in the leaves harvested at 270 days compared to those harvested at 180 days, with myricetin varying by variety. Except for SC09, the levels of myricetin, rutin and nicotiflorin were higher in the young leaves compared to the tender and mature leaves in different cassava germplasms. The content of narcissoside in mature leaves (except for flower leaf cassava) was higher than that in young leaves and tender leaves. The results would provide an evaluation basis for the development and utilization of cassava flavonols in the selection of raw materials and quality control, and lay a foundation for revealing the accumulation rules of cassava flavonols.

Keywords: cassava leaves; flavonols; HPLC; harvest time; maturity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.008

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属热带和亚热带的块根作物, 与甘薯、马铃薯并称为世界三大薯类, 有“淀粉之王”和“能源作物”之美誉。木薯叶作为木薯采收后的主要副产物, 占整个植株生物量的 9%, 因其富含蛋白质、矿物质、维生素, 在撒哈拉以南的非洲国家和一些亚洲国家(印度尼西亚、菲律宾和马来西亚等)常作为蔬菜以补充营养, 或被用于动物饲料^[1-5]。全世界木薯产量达 3.15 亿 t (2021 年 FAO 统计数据), 尽管许多国家广泛种植木薯, 也很容易获得木薯叶, 但因其具有高含量的氰化物而被丢弃或留在田间, 这不仅浪费资源, 且对环境造成严重污染。研究显示, 木薯叶除含有人体必需的主要营养物质外, 还富含黄酮类化合物^[6]。自然界中黄酮类化合物常以不同的黄酮醇苷类化合物稳定存在于植物组织中, 具有抗癌、抗炎、抗菌、抗氧化等作用, 可用作营养保健品的膳食类黄酮的替代来源广泛应用于医学、保健品、食品等领域^[7-10]。然而, 提高植物类黄酮产量、稳定或增加食品加工过程中和营养保健品的黄酮含量仍是亟待解决的科学问题^[11]。因此, 选择富含黄酮类化合物的植物, 开发高效、安全的提取方法, 最大程度地获取植物类黄酮, 是未来提高木薯叶等植物工业规模生产黄酮类化合物的主要因素^[12]。目前, 固-液萃取是应用最广泛的黄酮类化合物提取方法, 但该方法使用大量溶剂、耗时长、效率低, 由于长时间加热而导致能耗高^[13-14]。新的提取技术, 如超声辅助萃取 (UAE)、微波辅助萃取 (MAE)、酶辅助

萃取 (EAE)、高压萃取 (HPE) 和超临界流体萃取 (SFE) 提取天然活性物质具有提取率高、速度快, 且不改变有效成分等优点, 并在木薯次生代谢产物中得到广泛应用^[12, 14-17]。研究者利用 HPLC-MS、HPLC-DAD 等色谱分析方法从木薯叶中鉴定到芦丁、烟花苷、槲皮素、山奈酚、杨梅苷、金丝桃苷、刺槐苷、水仙苷 8 种黄酮醇, 其中, 芦丁、烟花苷含量约占黄酮醇总量的 99.0% 以上^[6], 但不同的木薯品种、生育期、采收期和种植环境均会影响其含量^[18-19], 筛选获得高含量、稳定的黄酮醇类物质是提高木薯叶片利用价值的重要途径。本研究在课题组前期建立的分析方法基础上^[19], 优化并建立木薯叶中主要的 4 种黄酮醇提取和定量分析方法, 应用于不同的木薯品种、采收期、成熟度叶片中黄酮醇的分析评价, 期为木薯叶黄酮醇开发利用、原料的选择和质量控制等提供检测依据, 为木薯叶的高值化利用提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 木薯叶片采摘于海南儋州国家木薯种质资源圃, 木薯于 2022 年 3 月种植, 参试木薯种质见表 1。

1.1.2 主要试剂 标准样品杨梅苷 (杨梅素-3-O-芸香糖苷, myricitrin)、芦丁 (槲皮素-3-O-芸香糖苷, rutin)、烟花苷 (山奈酚-3-O-芸香糖苷, nicotiflorin)、水仙苷 (异鼠李素-3-O-芸香糖苷,

表 1 参试木薯种质资源
Tab. 1 Cassava germplasm resources

编号 No.	种质名称 Germplasm name	编号 No.	种质名称 Germplasm name	编号 No.	种质名称 Germplasm name
1	SC5	11	SC124	21	巴西 6 号
2	SC6	12	SC6068	22	KU50
3	SC7	13	SC205	23	卷叶木薯
4	SC8	14	南植 199	24	印尼细叶
5	SC9	15	桂热 4 号	25	紫叶木薯
6	SC10	16	桂热 5 号	26	花叶木薯
7	SC11	17	GR891	27	野生木薯
8	SC12	18	GR911	28	CM483-2
9	SC13	19	汇丰 60	29	野生橡胶木薯
10	SC14	20	巴西 5 号	30	糖木薯

narcissoside), 纯度 $\geq 98.0\%$, 购自上海源叶生物发展有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯, 购自美国 Sigma 公司。无水乙醇、磷酸等为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 聚四氟乙烯(PTFE)微孔滤膜(0.22 μm), 购自天津市津腾实验设备有限公司。

1.1.3 仪器设备 Agilent1260 型液相色谱系统, 配备自动进样器(型号: G1329B)、二极管阵列检测器(型号: G1315D)和柱温箱(型号: G1316A)。色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 购自美国 Agilent 科技有限公司; 超声波清洗器(型号: SB25-12DT), 购自宁波新芝生物有限公司; Elix3+ Synergy 超纯水系统, 购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集和制备 采摘种植后第 180 天嫩叶期的木薯叶片, 考察不同种质木薯叶片黄酮含量的差异; 分别在种植后第 180 天和第 270 天采摘木薯叶片, 考察不同采收时期的黄酮醇含量差异; 参考文献[20-21]的方法在木薯种植后第 180 天时采集叶片, 采摘 5~10 株不同木薯种质的幼叶、嫩叶和成熟叶, 考察不同成熟度木薯叶片 4 种黄酮醇含量的差异, 其中, 幼叶期为顶部向下 1~4 片未展开叶片, 嫩叶期为顶部向下 4~8 片展开未木质化的叶片, 成熟期为顶部向下 8~12 片展开未黄化的叶片; 木薯叶片采集后, 迅速用液氮速冻, 装入洁净的密封袋中, 冷冻密封避光保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 待用。

1.2.2 黄酮醇提取方法的优化 参考文献[14, 19]对黄酮醇提取效率影响较大的因素乙醇浓度(20%、40%、50%、60%、80%、100%)、料液

比(1:10、1:30、1:50、1:70、1:90)进行优化, 利用不同的提取量(0.2、0.5、1.0 g)和提取次数(1次、2次)验证其提取效果。对以上提取条件进行考察时, 超声提取温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提取时间为 60 min。

1.2.3 木薯叶片中黄酮醇的提取 取适量的木薯叶片, 加入液氮研磨后, 准确称取研磨后的木薯叶粉 0.2 g(精确至 0.0001 g)于 15 mL 离心管中, 加入 50%乙醇水溶液 5.0 mL, 超声提取 60 min ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 500 W), 混匀, 离心 10 min (4200 r/min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$); 上清液转移至 10 mL 容量瓶中, 残渣再加入 5.0 mL 50%乙醇水溶液, 旋涡振荡混匀, 离心 5 min (4200 r/min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), 合并 2 次离心的上清液, 加入 50%乙醇溶液定容至 10 mL, 混匀即为待测液。取 1.0 mL 待测液, 通过 0.22 μm PTFE 微孔滤膜, 供高效液相色谱仪测定。

1.2.4 色谱条件优化 参考文献[16, 19], 对检测波长、流动相组成及洗脱程序、色谱柱等进行优化比较, 确定其最佳的条件。最后, 确定稳定性较好, 价格偏低的 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 1 进行样品分析。以甲醇(A)和 0.2%磷酸水(B)溶液为流动相进行梯度洗脱, 洗脱程序为: 起始为 25% A, 75% B; 15 min 时 A 为 58%, B 为 42%; 20 min 时 A 为 80%, B 为 20%; 25 min 时 A 为 100%, B 为 0; 27 min 时, A 为 25%, B 为 75%, 平衡柱子 5 min, 进下一个样; 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 360 nm; 进样量为 10 μL ; 柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。所有样品进样前经 0.22 μm PTFE 微孔滤膜过滤。采用外标法定量。

1.2.5 标准溶液的配制与标准曲线的制作 分别

称取适量的杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷标准样品，用色谱甲醇配制成质量浓度分别为 1.0、6.0、3.0、1.0 mg/mL 的单标母液，保存于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，再用色谱甲醇依次稀释，配制成不同浓度的混合标准溶液，经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ PTFE 微孔滤膜过滤后备用。将混合标准溶液进样分析，以峰面积 (mV) 为纵坐标 (y)，标准溶液浓度 (mg/L) 为横坐标 (x)，制作标准曲线并进行线性回归分析。

1.2.6 方法检出限和定量限测定 称取经液氮研磨后的木薯叶粉 0.2 g (精确至 0.0001 g)，加入 50%乙醇水溶液超声提取黄酮醇，离心后弃上清液，残渣反复洗脱 3~5 次，直到洗脱液上机检测不到 4 种黄酮醇，再在残渣中加入不同浓度的 4 种黄酮醇混合标准品溶液 $200.0\text{ }\mu\text{L}$ ，用氮气吹干样品，使其标准溶液被样品吸收后，按 1.2.2 和 1.2.3 的提取和检测方法分析样品，并按样品中 4 种黄酮醇的峰高和仪器噪音的比值计算信噪比 (S/N)，分别以 $S/N>3$ 和 $S/N>10$ 的样品浓度确定方法的检出限和定量限，设置 5 个重复。

1.2.7 方法系统适应性评价 随机选择 1 个样品，重复进样 6 次，计算样品色谱图中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷的保留时间、峰面积和拖尾因子变化的相对标准偏差 (RSD)，考察检测方法的重复性，以测试方法的系统适应性。

1.2.8 样品的日内、日间和月间稳定性试验 任意选择 1 个加标待测样品置于室温下，每隔 4 h 测定其响应值，计算样品中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷含量变化的 RSD 值，考察样品在 24 h 的日内稳定性。任意选择 1 个加标待测样品在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下避光放置，分别在提取后第 1、10、20、30 天对同一份样品进行测定，计算样品中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷含量变化的 RSD 值，考察样品溶液冷冻条件下避光放置的月内稳定性。将木薯叶样品避光放置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在放置后第 1、3、6、9、12 个月，按 1.2.2 的方法提取样品中黄酮醇进行上机分析，计算样品中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷含量变化的 RSD 值，考察不同保存时间样品中黄酮醇的稳定性。每个样品设置 3 个重复。

1.2.9 样品的加标回收试验 准确称取木薯叶粉 0.2 g (精确至 0.0001 g)，根据考察样品浓度范围按高、中、低 3 个浓度水平加标，每个水平重复 3 次，按 1.2.2 提取 4 种黄酮醇类物质，进行回收率和准确度试验。以回归方程计算样品浓度，并

计算样品平均回收率和相对标准偏差，以此评价方法的准确度。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2015 软件进行数据统计，采用 Origin 2021 软件制图，采用 IBM SPSS Statistics 22.0 统计软件进行显著性、相关性和聚类分析；采用最小显著差数法 (LSD) 进行数据的多重比较。方法学验证参考《中国药典》2020 版的分析方法验证指导原则开展试验。

2 结果与分析

2.1 提取方法的优化

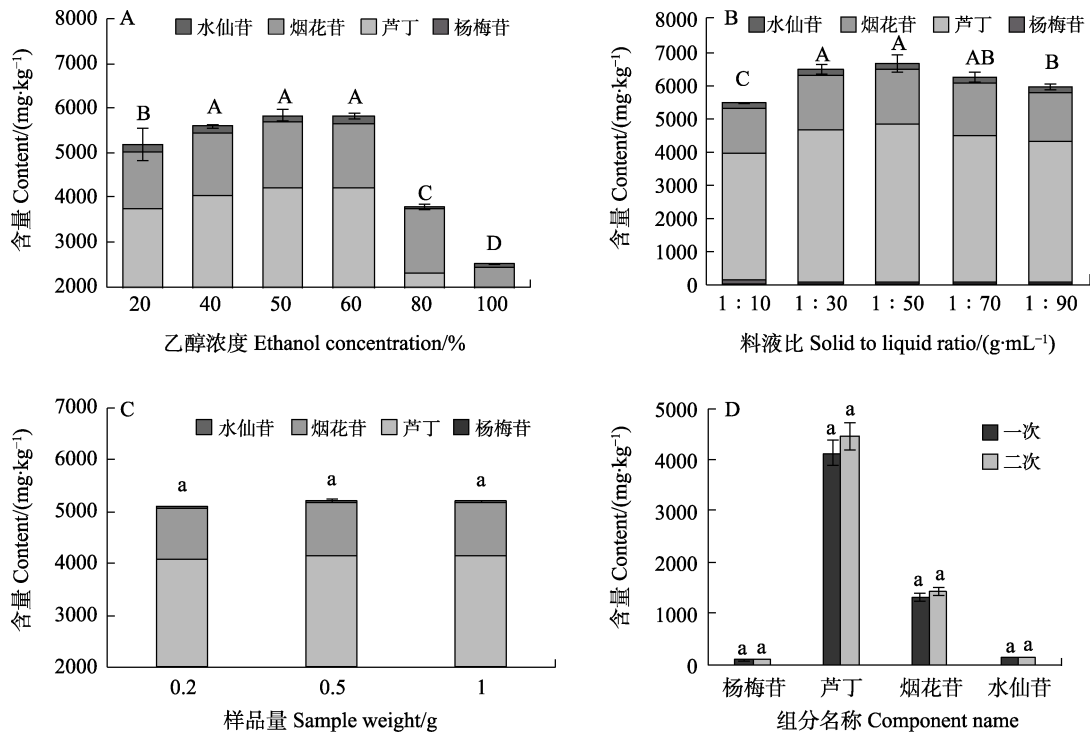
研究表明，提取溶液和料液比是影响黄酮类物质提取效率的最大影响因素^[6, 19, 22]。本研究采用超声波辅助提取法，对提取溶液乙醇比例和料液比进行优化，并考察样品量和提取次数对 4 种黄酮醇总含量的影响。结果表明，40%~60%乙醇浓度适合提取木薯叶中 4 种黄酮醇，在此范围内黄酮醇总含量无显著差异，在乙醇浓度为 50%时黄酮醇提取含量达到最高 (5832.5 mg/kg)；高乙醇浓度 (80%~100%) 不适合黄酮醇的提取 (图 1A)。以 50%乙醇浓度，1:10~1:90 (g/mL) 料液比进行提取，发现料液比为 1:30、1:50、1:70 进行提取时，4 种黄酮醇总含量均未达到显著性差异，料液比为 1:50 时，总黄酮醇含量达到 6657.3 mg/kg (图 1B)。以 1:50 的料液比，对样品量和提取次数进行考察，发现样品量大小不影响 4 种黄酮醇的提取效果 (图 1C)；2 次提取，可以增加 4 种黄酮醇含量，增加量分别为 8.3、326.0、111.2、12.3 mg/kg，但增加量未达显著性差异 (图 1D)。试验确定了木薯叶中 4 种黄酮醇的提取方法为：提取溶液为 50%乙醇水溶液，料液比为 1:50 (g/mL)，分 2 次加入提取溶液，在超声温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下提取 60 min，可获得较好的提取效果。

2.2 检测波长的确定

在 200~600 nm 范围内对杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷的混合标样溶液进行紫外扫描，4 种黄酮醇物质在该波长范围内分别在 260、360 nm 左右有 2 个特征吸收高峰 (表 2)，因此，选择 4 个黄酮醇最大吸收峰处 360 nm 为检测波长。

2.3 流动相的选择

黄酮醇的检测流动相主要用乙腈或甲醇和加酸 (磷酸、乙酸等) 的水溶液进行梯度洗脱，参



不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$) ; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) 。

Different capital letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$); Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 1 乙醇浓度 (A)、料液比 (B)、样品量 (C) 和提取次数 (D) 对 4 种黄酮醇提取量的影响
Fig. 1 Effects of ethanol concentration (A), solid-liquid ratio (B), sample volume (C) and extraction times (D) on extraction amount of four flavonols

表 2 4 种黄酮醇标准样品保留时间、紫外最大吸收波长
Tab. 2 Retention time and UV maximum absorption wavelength of four kinds of flavonol standard samples

序号 No.	组分名称 Component name	保留时间 Retention time/min	最大吸收波长 Maximum absorption wavelength/nm
1	杨梅苷	11.6	256, 358
2	芦丁	13.7	256, 356
3	烟花苷	15.8	266, 350
4	水仙苷	16.2	254, 356

参考文献[16-17]的方法, 比较了乙腈 : 0.25%乙酸溶液 (图 2A) 和甲醇 : 0.2%磷酸溶液 (图 2B) 2

种流动相对比对 4 种黄酮醇混合标准品分离效果的影响, 分析发现, 磷酸水溶液更适合分析 4 种黄酮醇, 乙腈 : 0.25%乙酸溶液不能有效地分离烟花苷和水仙苷。

2.4 流动相的梯度洗脱程序优化

为了获得样品中 4 种黄酮醇的最佳分离效果, 参考文献[19]的方法, 对流动相梯度程序进行了优化, 发现甲醇 : 0.2%磷酸溶液的起始流动相比比例为 25%时洗脱分析样品, 杨梅苷的干扰峰可以完全分离 (图 3A), 而起始流动相比比例为 40%洗脱时, 虽然可以缩短样品的洗脱时间, 但有干

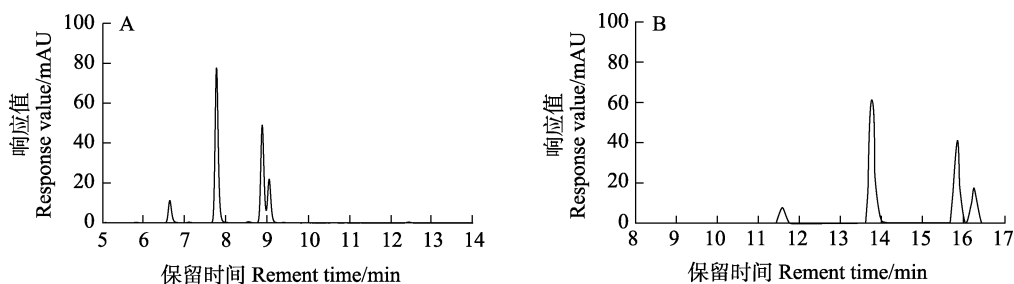


图 2 不同流动相洗脱 4 种黄酮醇的分离效果

Fig. 2 Separation effects of four flavonols eluted by different mobile phases

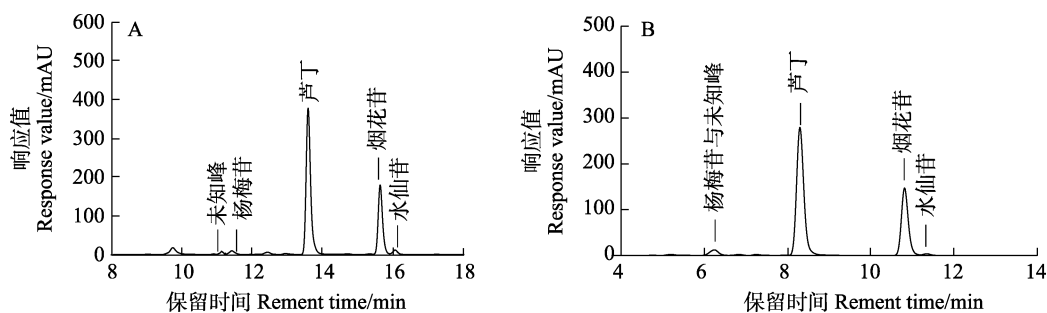


图 3 不同流动相起始比例对黄酮醇分离效果的影响

Fig. 3 Effect of different mobile phase initial ratios on separation of flavonols

扰峰影响杨梅苷的积分 (图 3B), 通过比较分离效果, 确定木薯叶中 4 种黄酮醇的洗脱程序 (见 1.2.3)。

2.5 色谱柱的选择

在进行黄酮类物质进行分析的过程中, 研究者多采用 C18 色谱柱, 但不同品牌和填料修饰其分离效果有差异, 利用优化后的流动相比例 (甲醇: 0.2% 磷酸溶液), 比较了 3 个品牌色谱柱的分析效果 [色谱柱 1: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-

C18 (Analytical 4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 色谱柱 2: Waters Atlantis[®] C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 色谱柱 3: Merk Purospher[®] STAR RP-18e (Hibar[®] 150 mm×4.6 mm, 5 μ m)], 发现 3 个品牌的色谱柱均可以有效分离 4 种黄酮醇类化合物 (图 4)。结果表明, C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 或性能相当的色谱柱均能有效分离木薯叶中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷 4 种黄酮醇类物质。

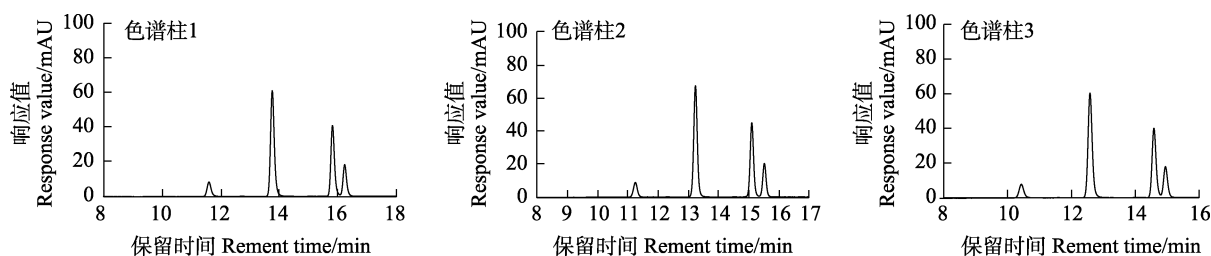


图 4 不同 C18 色谱柱分离 4 种黄酮醇色谱图

Fig. 4 Chromatograms of four flavonols separated by different C18 columns

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 以不同梯度的标准品检测峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 由峰面积 (y) 对溶液浓度 (x) 作线性回归方程, 并得出相关系数 (R^2)。如表 3 所示, 杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷在浓度范围内呈良好的线性关系, R^2 均大于 0.9998。

2.6.2 方法检出限和定量限 通过空白样品加标法, 加入低浓度标准样品进入洗脱的样品中, 考察方法的检出限和定量限。结果显示, 木薯叶中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷 4 种黄酮醇的检出限分别为 10.0、10.0、6.0、6.0 mg/kg, 木薯叶中 4 种黄酮醇的定量限分别为 32.0、27.0、20.0、20.0 mg/kg (表 4)。

2.6.3 方法系统适应性评价 以杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷 4 种黄酮醇浓度分别为 50、300、

表 3 4 种黄酮醇的回归方程及相关系数

Tab. 3 Regression equation and correlation coefficient of four flavonols

组分名称 Component name	线性范围 Linear range/(mg·L ⁻¹)	回归方程 Regression equation	相关系数 R ²
杨梅苷	0.25~100.00	$y=15.188x-3.8410$	0.9999
芦丁	0.15~600.00	$y=15.576x+13.8990$	0.9999
烟花	0.15~300.00	$y=19.848x-3.6170$	0.9999
水仙苷	0.15~100.00	$y=26.890x-6.4917$	0.9998

150、50 mg/L 的标准溶液连续进样 6 次, 考察方法的重复性和峰拖尾情况, 以此评价方法系统适应性。由表 5 可知, 保留时间和峰面积变化的 RSD 均小于 1%, 峰的拖尾因子在 1.12~1.19 之间, 证明方法的重复性较好, 色谱峰形较好。

2.6.4 样品的日内、日间和月间稳定性试验 在 24 h 内, 每隔 4 h 测定加标待测样品中 4 种黄酮

表 4 木薯叶中 4 种黄酮醇的检出限和定量限

Tab. 4 Limits of detection and limits of quantification of four flavonols in cassava leaves

项目 Item	组分名称 Component name	标准品浓度 Standard concentration/(mg·L ⁻¹)	平均峰高 Mean peak height	平均噪音 Average noise	S/N	样品含量 Sample content/(mg·kg ⁻¹)
检出限	杨梅苷	0.20	0.3819	0.1134	3.37	10.0
	芦丁	0.20	0.3581	0.1073	3.34	10.0
	烟花苷	0.12	0.3146	0.0961	3.27	6.0
	水仙苷	0.12	0.2635	0.0803	3.28	6.0
定量限	杨梅苷	0.64	1.1983	0.1134	10.57	32.0
	芦丁	0.54	1.1273	0.1073	10.50	27.0
	烟花苷	0.40	1.0063	0.0961	10.48	20.0
	水仙苷	0.40	0.9531	0.0803	11.86	20.0

表 5 方法系统适应性评价

Tab. 5 Method system suitability evaluation

组分名称 Component name	相对标准偏差 RSD/%		拖尾因子 Tailing factor
	保留时间 Retention time	峰面积 Peak area	
杨梅苷	0.07	0.71	1.14
芦丁	0.05	0.16	1.19
烟花苷	0.06	0.13	1.17
水仙苷	0.05	0.60	1.12

注:保留时间 RSD 和峰面积重复性 RSD 的判定标准分别为 RSD≤1.0%和 RSD≤5.0%,拖尾因子的判定范围为 0.95~1.20。

Note: RSD for retention time and peak area repeatability are RSD≤1.0% and RSD≤5.0%, respectively, and the range of tailing factor is: from 0.95 to 1.20.

醇含量,4 种黄酮醇含量变化的 RSD 在 0.44%~1.04%之间,表明样品在常温条件下放置,日内(24 h)稳定性较好。将待测加标样品溶液避光置于-18℃条件下,分别在提取后第 1、10、20、30 天对同一份样品进行测定,4 种黄酮醇 30 d 内含量变化的 RSD 在 1.45%~3.57%之间,证明提取样品在冷冻条件下避光放置 30 d 内,样品稳定性较好。将样品避光置于-18℃条件下,分别在保存 1、3、6、9、12 个月,提取样品中黄酮醇上机分析,4 种黄酮醇含量变化的 RSD 在 1.37%~3.31%之间,证明样品在-18℃冰箱中保存 12 个月,样品中的黄酮醇含量稳定性较好(表 6)。

表 6 样品中黄酮醇稳定性测试结果

Tab. 6 Stability test results of flavonols in samples

组分名称 Component name	日内稳定性 Intraday stability		日间稳定性 Diurnal stability		月间稳定性 Monthly stability	
	测定值 Detection value/(mg·kg ⁻¹)	RSD/%	测定值 Detection value/(mg·kg ⁻¹)	RSD/%	测定值 Detection value/(mg·kg ⁻¹)	RSD/%
杨梅苷	397.64	0.98	187.60	3.57	105.78	3.31
芦丁	8793.22	0.44	8028.77	1.45	4166.53	1.37
烟花苷	4773.23	1.04	4139.88	2.12	1339.64	2.20
水仙苷	552.82	1.00	425.03	1.59	147.76	1.86

2.6.5 方法回收率和准确度 以样品加标法,通过低、中、高 3 个浓度进行加标试验,结果显示,加标回收浓度变化的 RSD≤5.31%,杨梅苷平均回收率在 94.71%~97.81%之间;芦丁平均回收率 96.78%~102.21%之间;烟花苷平均回收率为 92.68%~100.07%;水仙苷平均回收率为 93.69%~109.14%;RSD 均小于 6.00%,加标回收结果证明该方法的准确度较高,重复性较好,可用于实际样品的测定(表 7)。

2.6.6 不同品种、采收期和成熟度对木薯叶中黄酮醇含量的影响 利用建立的提取方法和检测方

法,对不同品种、不同成熟度和不同采收期木薯叶中的 4 种黄酮醇进行考察。对比王定美等^[18]的研究结果,本研究中种植 180 d 的木薯叶黄酮含量较好,因此,采摘 30 个木薯种质种植 180 d 时嫩叶期木薯叶片进行 4 种黄酮醇含量分析(图 5)。结果表明,30 个木薯种质叶片中的杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷含量分别在 0~554.62、1190.26~8852.21、312.06~3691.51、50.87~283.25 mg/kg 之间,品种间黄酮醇含量差异较大,芦丁和烟花苷含量占 4 种黄酮醇总量的 93.5%~99.3%,这与 CHAHYADI 等^[14]的结果一致。4 种黄酮醇含量较

表 7 样品加标回收试验结果
Tab.7 Standard addition recovery experiment

组分名称 Component name	原含量 Original (mg·kg ⁻¹)	加入量 Added (mg·kg ⁻¹)	检测结果 Test results/(mg·kg ⁻¹)					RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	
			1	2	3	4	5			
杨梅苷	207.23	75	69.81	70.87	75.80	70.90	67.79	71.03	4.15	94.71
		150	144.37	147.97	145.83	146.06	142.99	145.45	1.29	96.96
		300	282.00	283.17	281.08	310.96	310.00	293.44	5.31	97.81
芦丁	4969.74	1500	1580.54	1534.82	1571.22	1518.57	1460.93	1533.22	3.12	102.21
		3000	2859.94	2857.04	3037.12	3068.92	2836.88	2931.98	3.80	97.73
		4500	4246.05	4316.89	4373.04	4364.78	4474.83	4355.12	1.92	96.78
烟花苷	1332.23	750	683.96	690.44	724.41	696.60	679.93	695.07	2.53	92.68
		1500	1532.41	1454.22	1442.33	1563.07	1451.64	1488.73	3.70	99.25
		3000	3009.22	3065.34	2966.39	3002.75	2967.22	3002.18	1.35	100.07
水仙苷	123.73	75	69.35	70.78	71.71	69.86	69.64	70.27	1.38	93.69
		150	161.87	159.59	168.13	165.85	163.15	163.72	2.04	109.14
		300	322.40	328.30	327.99	321.32	331.03	326.21	1.28	108.74

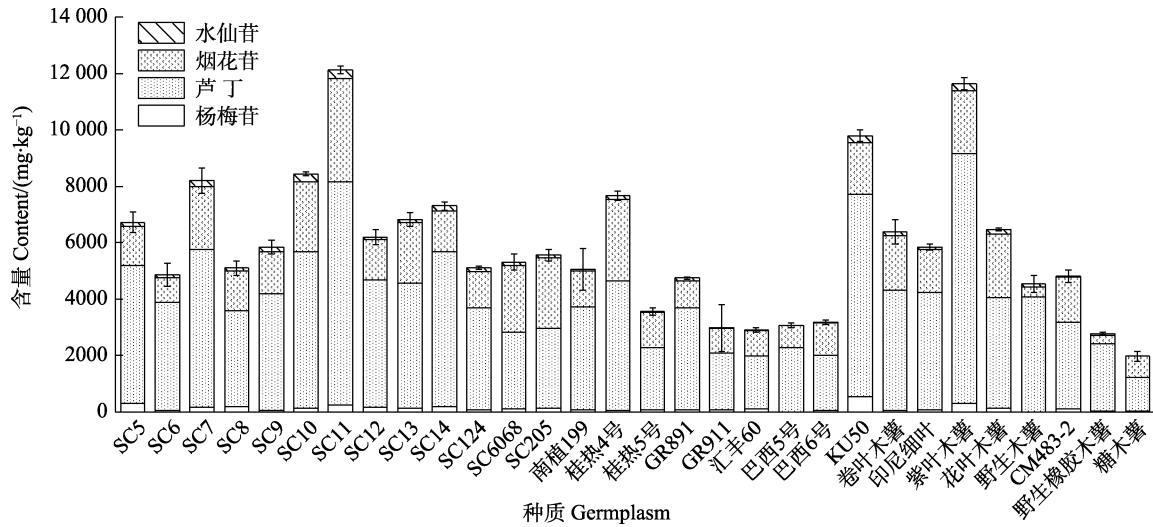


图 5 不同种质木薯叶中 4 种黄酮醇含量

Fig. 5 Contents of four flavonols in cassava leaves of different germplasm resources

高的品种为 SC11、紫叶木薯和 KU50。

30 个木薯种质叶片中 4 种黄酮醇相关分析表明 (表 8), 不同种质间 4 种黄酮醇含量的相关性达显著或极显著, 其中, 芦丁、水仙苷与总黄酮含量相关性较高, 相关系数分别为 0.967、0.915, 烟花苷、杨梅苷与总黄酮含量的相关系数分别为 0.782、0.693。虽然芦丁和烟花苷含量占总黄酮醇含量的 93.5%~99.3%, 但不同种质间水仙苷含量也与总黄酮醇含量相关系数较高, 同样可作为判定总黄酮含量高低的指标。

进一步对 30 份木薯种质进行系统聚类分析, 聚类距离采用欧式距离平方法, 聚类方法采用组

间联接法, 根据不同种质类间距离进行区分, 得到不同种质聚类树状图 (图 6)。欧式距离超过 5 时可分为 3 类, 即第一类为 SC11、紫叶木薯、KU50 三个芦丁和烟花苷含量相对较高的种质; 第二类为花叶木薯、SC09、SC124 等芦丁、水仙苷含量相对较高的种质; 第三类为 SC205、GR911、糖木薯 4 种黄酮醇含量相对较低的种质, 大部分种质集中在第二类。

根据聚类分析结果, 选择 3 类 7 个木薯种质在种植后第 180 天和第 270 天采摘叶片, 分析不同采收时期 4 种黄酮醇含量的差异 (图 7)。结果表明, 第 270 天采收时多数种质叶片中的芦丁、

表 8 不同木薯种质叶片中黄酮醇含量相关性分析
Tab. 8 Correlation analysis of flavonol content in leaves of different cassava germplasm

组分名称 Component name	杨梅苷 Myricetin	芦丁 Rutin	烟花苷 Nicotiflorin	水仙苷 Narcissoside	总黄酮醇含量 Total flavonol content
杨梅苷	1				
芦丁	0.699**	1			
烟花苷	0.404*	0.599**	1		
水仙苷	0.617**	0.899**	0.667**	1	
总黄酮醇含量	0.693**	0.967**	0.782**	0.915**	1

注：*表示显著相关 ($P<0.05$)，**表示极显著相关 ($P<0.01$)。

Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$), ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

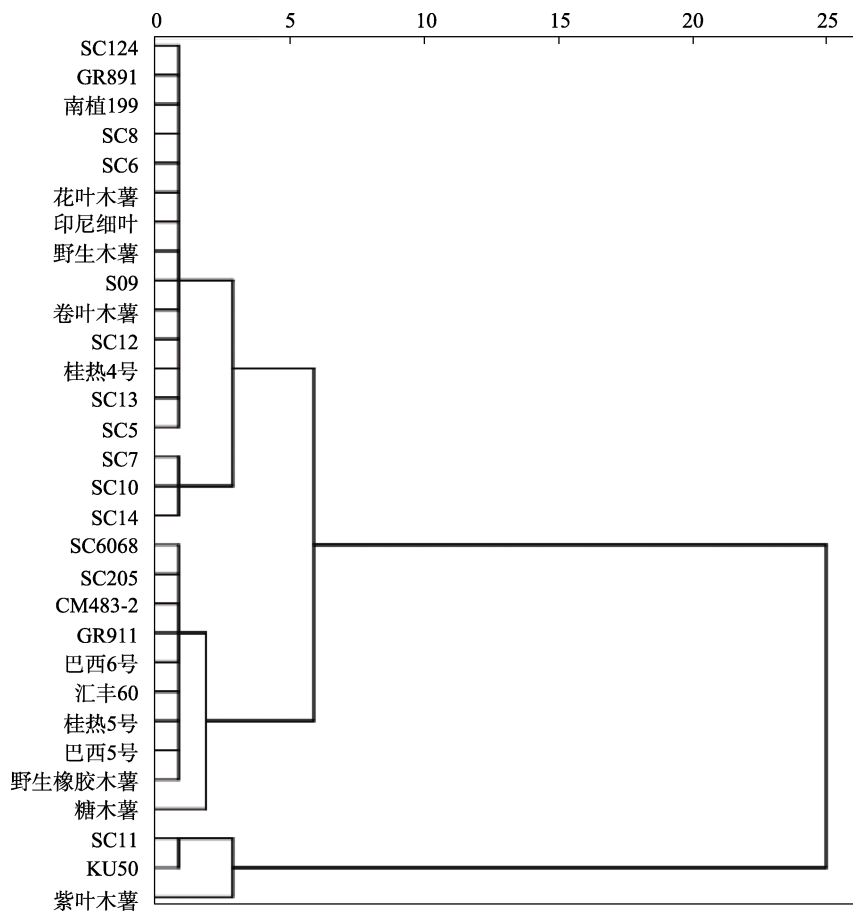


图 6 聚类分析谱系图

Fig. 6 Cluster analysis dendrogram

烟花苷和水仙苷含量高于第 180 天，第 270 天采收的第一类种质（紫叶木薯和 SC11）中黄酮醇含量均高于第二类和第三类；在第 180 天采收时，第二类和第三类部分种质（如 SC9、印尼细叶、SC205）的杨梅苷含量显著高于第 270 天采收的，但芦丁占黄酮醇总含量的 90%，表明不同采收时期种质间黄酮醇总含量高低由芦丁含量决定。因此，可选择不同种植时间采收木薯叶，以获得相对含量较高的黄酮醇目标物质。

通过分析种植 180 d 不同成熟度木薯叶中 4 种黄酮醇含量（图 8）结果表明，不同木薯种质中，除 SC9 种质幼叶期的杨梅苷含量略低于嫩叶期和老叶期外，其他 6 个木薯种质幼叶期的杨梅苷、芦丁和烟花苷含量均高于嫩叶期和成熟叶，而前期研究发现嫩叶期芦丁和烟花苷含量较高^[19]，这可能与采收时间和考察品种有关，如 SC9 嫩叶期和幼叶期的芦丁和烟花苷含量无显著差异。除花叶木薯外，其余种质成熟叶中的水仙苷含量均高

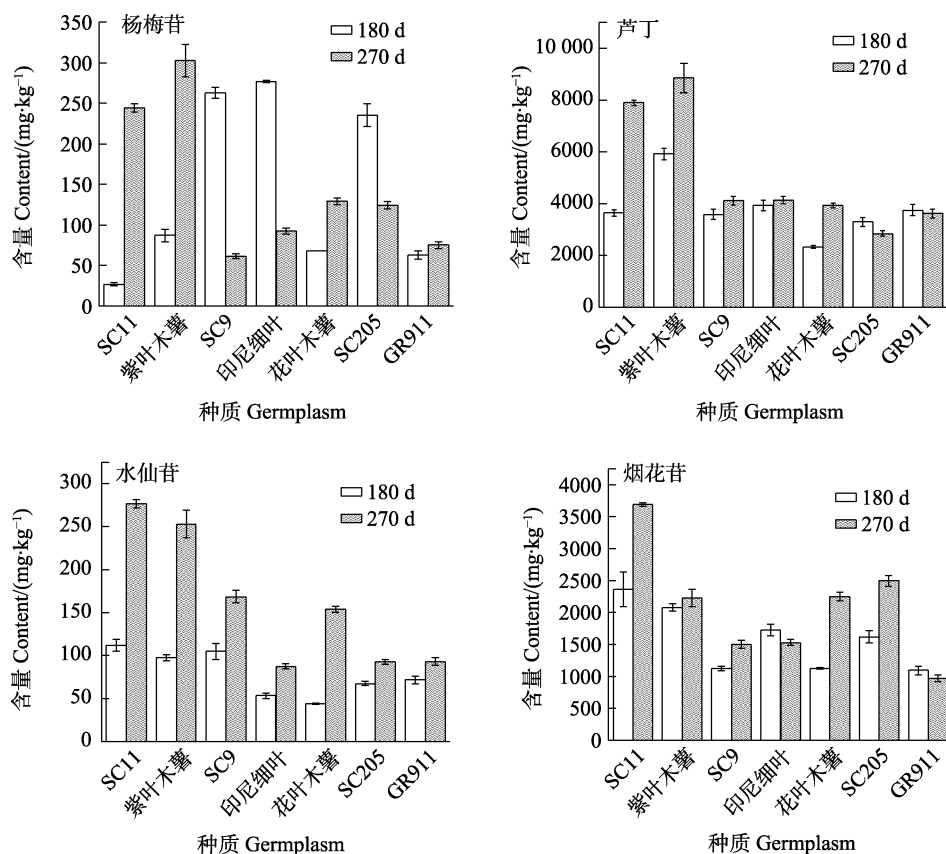


图 7 不同采收期木薯叶中 4 种黄酮醇含量

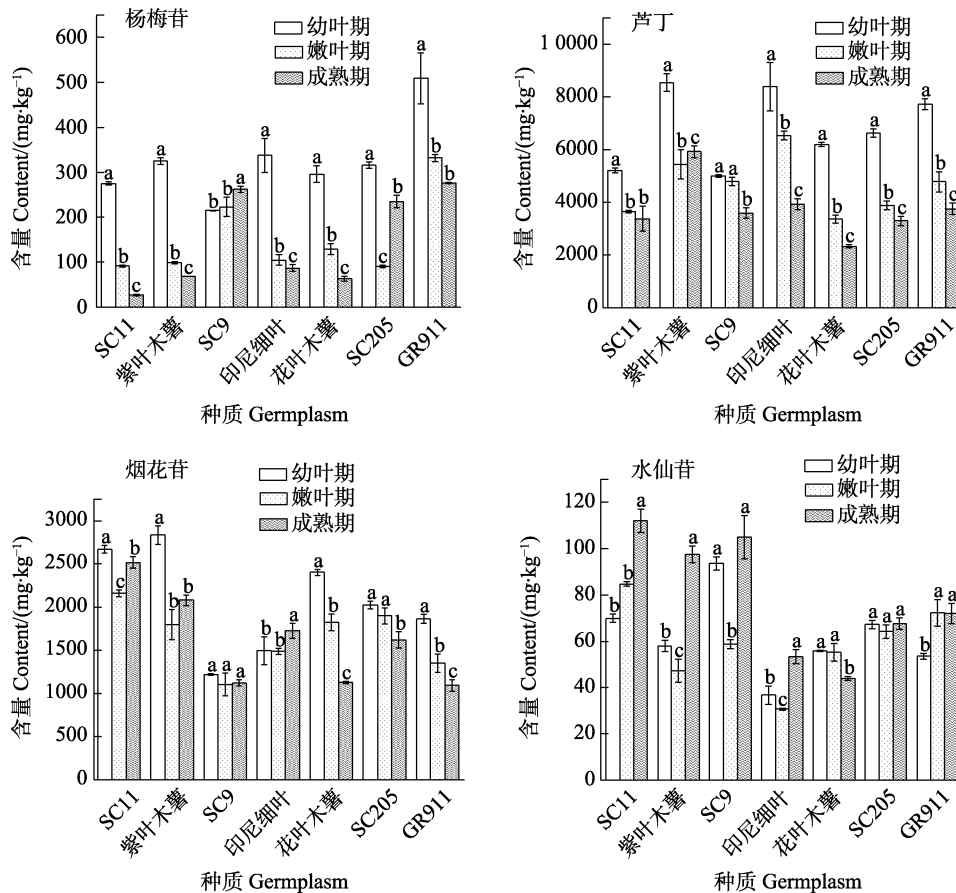
Fig. 7 Contents of four flavonols in cassava leaves at different harvesting stages

于幼叶期和嫩叶期。考察的 3 类 7 个种质中，杨梅苷、芦丁和烟花苷含量在幼叶期或嫩叶期较高，水仙苷在成熟叶中含量较高。

3 讨论

黄酮类化合物的提取多采用醇提或水提的方法^[13, 23-24]，木薯叶中黄酮类化合物较多，研究显示，木薯叶中主要的黄酮醇化合物为芦丁和烟花苷^[6]，前期研究者主要根据化合物组成选择提取方法，并证明乙醇溶液超声辅助方法可以有效提取芦丁^[24]。课题组前期试验结果^[19]也表明，乙醇浓度和料液比会影响黄酮醇的提取率，以 40% 和 80% 乙醇水溶液分步提取可以有效获得木薯叶中芦丁、烟花苷、槲皮素、山柰酚 4 种黄酮醇，其中槲皮素和山柰酚并不是木薯叶中的主要黄酮醇化合物。本研究通过优化乙醇浓度和料液比，明确了利用 40%~60% 乙醇溶液均可有效提取 4 种黄酮醇（芦丁、烟花苷、水仙苷和杨梅苷），但由于关注的主要黄酮醇化合物不同，料液比与前期结果^[19]存在差异，其超声温度和时间对其提取效果并无显著影响，这与 CHAHYADI 等^[14]的研究结果

一致。因此，选择 4 种黄酮醇总含量提取率较高的 50% 乙醇水溶液，料液比 1 : 50 (g/mL) 进行后续试验。同时，试验也证实醇提可以提高黄酮醇化合物的提取效率，在适宜料液比的前提下，提取效率不受样品量和提取次数的影响。通过对检测波长进行扫描，对流动相比比例和系统程序、色谱柱的选择进行了优化，建立了木薯叶中黄酮醇的 HPLC 分析方法。多数黄酮醇在 280 nm 和 360 nm 左右会有 2 个吸收峰，从吸收波长扫描显示，360 nm 左右是黄酮醇的最大吸收峰。有研究表明，多数类黄酮物质在 280 nm 有最大吸收峰^[25]，为避免部分黄酮类物质对黄酮醇检测的干扰，选择 360 nm 波长更有利于黄酮醇的检测。甲醇-磷酸水溶液和乙腈-乙酸水溶液流动相系统一直是分析类黄酮物质的最佳选择^[23]，但在分析过程中发现，乙腈-乙酸水溶液作为流动相更适合分析黄酮类物质；甲醇-磷酸水流动相经过优化，在进行黄酮醇类物质分析过程中，能避免其他黄酮化合物的干扰，并完全分离黄酮醇物质；另外，C18 色谱柱是分析黄酮类化合物常用的色谱柱类型，但不同品牌的 C18 色谱柱价格不同，通过比较发



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 8 不同成熟度木薯叶中 4 种黄酮醇含量差异

Fig. 8 Contents of four flavonols in cassava leaves with different maturity

现, 考察的 C18 色谱柱均可以有效分离木薯叶中的 4 种黄酮醇, 选择合适的色谱柱可为后期大量样品的分离和定量分析节约成本。

参考《中国药典》(2020 版) 分析方法验证指导原则进行方法学验证, 结果表明, 建立的检测方法线性相关性较好, R^2 均在 0.9998 以上; 检测限和定量限分别在 6.0~10.0 mg/kg 和 20.0~32.0 mg/kg 之间; 检测方法系统适应性也较好, 回收率较高, 完全可用于实际样品的测定, 并发现样品中黄酮醇在不同的样品状态下日内、日间和月间稳定性较好, 这为后期样品的保存提供了参考。利用建立的提取和检测方法, 分析了 30 个木薯种质中 4 种黄酮醇含量, 种质间黄酮醇总含量差异较大, 芦丁和烟花苷含量占 4 种黄酮醇总量的 93.5%~99.3%, 这与 TAO 等^[6]的研究结果一致; 而王定美等^[18]、詹春莲等^[25]的研究认为, 木薯叶中主要的黄酮物质是芦丁、二氢黄酮醇和穗花杉双黄酮, 在质谱定性检测过程中也发现了 2 种含

量较高的双黄酮化合物, 通过光谱和色谱图比较发现, 王定美等^[18]在检测中并未对烟花苷进行定量分析, 詹春莲等^[25]在进行木薯叶类黄酮指纹图谱建立过程中, 仅考察了 270 nm 波长下的色谱峰, 而本研究中烟花苷的紫外最大吸收峰在 350 nm 处, 由此导致了结果差异。虽然黄酮醇总含量由芦丁和烟花苷决定, 但相关性分析表明, 种质间黄酮醇总含量高低的相关性顺序为芦丁 > 水仙苷 > 烟花苷 > 杨梅苷; 选择聚类分析对 3 类 7 个木薯种质不同采收期和不同成熟度叶片进行分析表明, 在多数木薯种质中第 270 天时采收的叶片中芦丁、烟花苷和水仙苷含量高于第 180 天采收的, 少部分种质的叶片第 270 天时采收杨梅苷含量高于第 180 天; 但不同木薯种质 (除 SC09 外) 幼叶期的杨梅苷、芦丁和烟花苷含量均高于嫩叶期和成熟期; 成熟期水仙苷含量 (除花叶木薯外) 均高于幼叶期和嫩叶期。研究表明, 黄酮醇作为次生代谢产物可通过与生长素、细胞分裂

素和活性氧共同调控植物向光性生长及发育, 槲皮素和山奈酚(或其衍生物)等黄酮醇很可能通过限制分生区细胞分化, 加速细胞伸长进而调控植物组织的生长, 幼叶和嫩叶期细胞分裂旺盛, 并且不同的黄酮醇合酶基因调控着不同的黄酮醇积累^[26-28], 芦丁和烟花苷分别是槲皮素和山奈酚糖苷类代谢物, 因此, 在幼叶期或嫩叶期积累较多。各种黄酮醇物质在植物不同组织、不同发育阶段以及不同环境条件下扮演的精细角色, 激素和环境因子均影响其合成^[29]。但木薯叶中黄酮醇是否受植物激素等协同调控、黄酮醇合酶基因的调控, 各种黄酮醇合成的机制揭示等问题仍有待于进一步深入探讨。

总之, 建立高效的提取和分析方法是了解木薯叶片中黄酮醇化合物组成和含量的基础, 木薯叶中黄酮醇含量受品种、采收期和成熟度的共同影响, 为获得高含量黄酮醇植物源, 开发利用好木薯叶中黄酮醇物质, 进一步研究木薯叶中黄酮醇合酶基因的调控机制, 有助于更深入地了解 4 种黄酮醇积累与木薯品种、采收期和成熟度的关系, 为揭示木薯叶中黄酮醇物质积累规律奠定基础。

参考文献

- [1] CHAIAREEKITWAT S, LATIF S, MAHAYOTHEE B, KHUWIJITJARU P, NAGLE M, AMAWAN S, MÜLLER J. Protein composition, chlorophyll, carotenoids, and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age, and leaf position[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131173.
- [2] LATIF S, MÜLLER J. Potential of cassava leaves in human nutrition: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 44(2): 147-158.
- [3] LEGUIZAMÓN A J, ROMPATO K M, HOYOS R E, AUDISIO M C. Nutritional evaluation of three varieties of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) grown in formosa, argentina[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 101: 103986.
- [4] LI M, ZHOU H, XU T, ZI X. Effect of cassava foliage on the performance, carcass characteristics and gastrointestinal tract development of geese[J]. Poultry Science, 2019, 98(5): 2133-2138.
- [5] NGUYEN T H L, NGOAN L D, BOSCH G, VERSTEGEN M W A, HENDRIKS W H. Ileal and total tract apparent crude protein and amino acid digestibility of ensiled and dried cassava leaves and sweet potato vines in growing pigs[J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 172(3/4): 171-179.
- [6] TAO H, CUI B, ZHANG H, BEKHIT A E, LU F. Identification and characterization of flavonoids compounds in cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) by HPLC/FTICR-MS[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1134-1145.
- [7] LAYA A, KOUBALA B B. Polyphenols in cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) and their stability in antioxidant potential after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Heliyon, 2020, 6(3): e03567.
- [8] 范雁婷, 樊若楠, 张辉, 李保珠. 植物黄酮醇生物合成及功能研究进展[J]. 中国农学通报, 2020, 36(33): 95-101.
- [9] FAN Y T, FAN R N, ZHANG H, LI B Z. Biosynthesis and function of flavonol in plants: a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(33): 95-101. (in Chinese)
- [9] 王定美, 陈新富, 麦力文, 杨霞, 林蕊, 李勤奋. 木薯叶抗氧化能力与总黄酮含量及其关系研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 37-43.
- [10] WANG D M, CHEN X F, MAI L W, YANG X, LIN R, LI Q F. Study on the relationship between antioxidant capacity and total flavonoids contents of cassava leaves[J]. Food Research and Development, 2021, 42(2): 37-43. (in Chinese)
- [10] CUTRIM C S, CORTEZ M A S. A review on polyphenols: classification, beneficial effects and their application in dairy products[J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71(3): 564-578.
- [11] MIR-CERDÀ A, NUÑEZ O, GRANADOS M, SENTELLAS S, SAURINA J. An overview of the extraction and characterization of bioactive phenolic compounds from agri-food waste within the framework of circular bioeconomy[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 161: 1-12.
- [12] KELLY N P, KELLY A L, O'MAHONY J A. Strategies for enrichment and purification of polyphenols from fruit-based materials[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83(18): 248-258.
- [13] 雍梁敏, 刘畅, 刘石生. 响应面法优化木薯叶中黄酮类化合物的浸提条件[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(10): 63-67.
- [14] YONG L M, LIU C, LIU S S. Optimization of extraction conditions of flavonoids from cassava leaves by response surface method[J]. Food Research and Development, 2017, 38(10): 63-67. (in Chinese)
- [14] CHAHYADI A. The influence of extraction methods on rutin yield of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020, 28(11): 1466-1473.
- [15] CHAIAREEKITWAT S, LATIF S, MAHAYOTHEE B, PRAMOTE, KHUWIJITJARU, NAGLE M, AMAWAN S, MÜLLER J. Protein composition, chlorophyll, carotenoids,

- and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age and leaf position[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372(15): 1-9.
- [16] KIM G, JANG H. Flavonol content in the water extract of the mulberry (*Morus alba* L.) leaf and their antioxidant capacities[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(6): 869-873.
- [17] MAROUN R G, RAJHA H N, DARRA N E, KANTAR S E, CHACAR S, DEBS E, VOROBIEV E, LOUKA N. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources[M]//CHARIS M G. Polyphenols: properties, recovery, and applications. Duxford: Woodhead Publishing, 2018: 265-293.
- [18] 王定美, 王伟, 麦力文, 杨霞, 李勤奋. HPLC 法同时测定不同采收期木薯叶中 6 种类黄酮的含量[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(18): 132-137, 210.
- WANG D M, WANG W, MAI L W, YANG X, LI Q F. Simultaneous determination of 6 flavonoids in cassava leaves from different harvest time by HPLC[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(18): 132-137, 210. (in Chinese)
- [19] 王琴飞, 吴秋妃, 徐缓, 林立铭, 张振文. 木薯叶片中黄酮醇类物质的提取与检测[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(8): 1694-1699.
- WANG Q F, WU Q F, XU H, LIN L M, ZHANG Z W. Extraction and detection of flavonols from cassava leaves[J]. 2018, 31(8): 1694-1699. (in Chinese)
- [20] 吴秋妃. 木薯叶提取液制备及其抗氧化作用研究[D]. 海口: 海南大学, 2019.
- WU Q F. Study on the preparation and its antioxidant function of cassava leaf[D]. Haikou: Hainan University, 2019. (in Chinese)
- [21] 仲玉梅. 木薯叶成熟过程中营养成分的变化[J]. *食品工业科技*, 1989(6): 24-27.
- ZHONG Y M. Changes in nutritional components of cassava leaves during maturation[J]. *Food Industry Technology*, 1989(6): 24-27. (in Chinese)
- [22] SUAREZ L M, FAN H, ZAPATA J E, WU J. Optimization of enzymatic hydrolysis for preparing cassava leaf hydrolysate with antioxidant activity[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2021, 14(12): 2181-2194.
- [23] 何翠薇, 覃洁萍, 黄俏妮. HPLC 法测定木薯叶中芦丁的含量[J]. *中国药房*, 2011, 22(23): 2160-2161.
- HE C W, QIN J P, HUANG Q N. Content determination of rutin in *Manihot esculenta* leaves by HPLC[J]. *China Pharmacy*, 2011, 22(23): 2160-2161. (in Chinese)
- [24] 叶亚茹, 马霞, 姜紫含, 徐京克, 马秋玲. 木薯叶不同溶剂提取物中芦丁含量测定及抗氧化活性研究[J]. *中国处方药*, 2022, 20(8): 30-33.
- YE Y R, MA X, JIANG Z H, XU J K, MA Q L. Determination of rutin content and antioxidant activity in different solvent extracts from cassava leaves[J]. *Journal of China Prescription Drug*, 2022, 20(8): 30-33. (in Chinese)
- [25] 詹春莲, 陈新富, 麦力文, 杨霞, 王定美. 基于 HPLC 指纹图谱的木薯叶类黄酮质量研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 240-246.
- ZHANG C L, CHEN X F, MAI L W, YANG X, WANG D M. Cassava leaf flavonoids quality investigation based on HPLC fingerprint[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(15): 240-246. (in Chinese)
- [26] JIANG X, SHI Y, FU Z, LI W, LAI S, WU Y, WANG Y, LIU Y, GAO L, XIA T. Functional characterization of three flavonol synthase genes from *Camellia sinensis*: roles in flavonol accumulation[J]. *Plant Science*, 2020, 300: 1-11.
- [27] SILVA-NAVAS J, MORENO-RISUENO M A, MANZANO C, TÉLLEZ-ROBLEDO B, NAVARRO-NEILA S, CARRASCO V, POLLMANN S, GALLEGO F J, DEL POZO J C. Flavonols mediate root phototropism and growth through regulation of proliferation-to-differentiation transition[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(6): 1372-1387.
- [28] TOHGE T, FERNIE A R. Specialized metabolites of the flavonol class mediate root phototropism and growth[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(12): 1554-1555.
- [29] 方芳, 王凤忠. 植物黄酮醇生物合成关键基因研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 335-340.
- FANG F, WANG F Z. Research progress on key genes of flavonol biosynthesis in plants[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(14): 335-340. (in Chinese)