

程 佳,王发啟,李小双,等. 酚酸类化感物质种类、提取、分离和检测研究进展[J]. 江苏农业科学,2022,50(6):8-15.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.06.002

酚酸类化感物质种类、提取、分离和检测研究进展

程 佳,王发啟,李小双,杜亚东,谢 越

(安徽科技学院资源与环境学院,安徽凤阳 233100)

摘要:酚酸类物质是导致作物产生连作障碍问题的重要原因之一。对连作土壤中酚酸类物质进行有效提取和快速检测,是酚酸类物质研究的重要前提,也是农业行业和技术需求。对酚酸类化感物质的种类结构、提取工艺、分离纯化和检测手段 4 个方面进行梳理总结,并对酚酸类物质的研究进行展望,以期土壤中酚酸类物质的科学研究提供理论和技术参考,为缓解因酚酸类化感物质产生的土壤连作障碍问题提供新的思路。

关键词:化感作用;酚酸类物质;提取;分离纯化;定性定量分析

中图分类号: S184;S344.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)06-0008-08

化感作用是由 Molish 在 1937 年首次提出^[1],后来国际化感作用学会将其定义为植物在生长发育过程中,将自身次生代谢的化学物质释放到周围环境,改变周围微生态环境,影响自身或周围其他植物的生长发育,导致植物间相互排斥或促进的现象^[2-3]。众多研究表明,酚酸类物质为植物微生态环境中被鉴定最多、活性最强的一类化感物质^[4-5]。国内外研究发现酚酸类化感物质释放到环境中有 4

种途径,即植物被雨水淋洗、植物残体分解(如凋落物)、根系渗出和挥发^[6-7]。研究发现,这类化感物质是导致植物连作障碍的一个重要原因,在连作土壤中检测出的酚酸类物质含量明显增加。例如:在连作绥阳小米辣根际土壤中发现酚酸类物质数量从最初的 1 种增长到 10 种,其质量分数增加 44.8%^[8]。连作 3 年的甜瓜土壤与未连作的土壤比较,土壤中 7 种酚酸总含量显著增加,连作 3 年后干土中 7 种酚酸的总量较未连作土壤增加了 96.80%^[9]。

目前,酚酸类物质能够通过多种检测手段进行定性定量研究^[10-13],但是这些方法均较为繁琐且检测条件有限,检测灵敏度较低,不适合连作田间土壤中酚酸物质的快速分析,因此,探究土壤样品中酚酸的前处理和酚酸类物质高灵敏、简便、快捷的检测方法已成为农业行业和产业普遍亟待解决的问题。本文综合国内外相关文献,从酚酸类物质的

收稿日期:2021-05-14

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2008085MC81);安徽省重点研发计划面上项目(编号:201904a06020042);企业横向委托项目(编号:2020QX001)。

作者简介:程 佳(1997—),女,安徽歙县人,硕士研究生,主要从事农业资源高效利用研究。E-mail:chengj8067@163.com。

通信作者:谢 越,博士,教授,硕士生导师,主要从事环境污染控制研究。E-mail:yorke@126.com。

[75] Bloom P R, Skyllberg U L, Sumner M E. Chemical processes in soils [M]. Madison: SSSA, 2005: 411-460.

[76] Tamir G, Afik G, Zilkah S, et al. The use of increasing proportions of N - NH₄⁺ among the total applied inorganic N to improve acidification and the nutritional status and performance of blueberry plants in soilless culture [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 276: 109754.

[77] 李根柱, 张自川, 娄 鑫, 等. 缓释膜调酸改良土壤对蓝莓生长的影响[J]. 中国南方果树, 2017, 46(2): 127-131.

[78] 付 燕, 杨 芩, 张 杰, 等. 几种物质对蓝莓土壤 pH 及有效 N、P、K 的影响[J]. 北方园艺, 2016(12): 179-182.

[79] 李 琪, 於 虹, 王支虎, 等. 醋糟对土壤改良及兔眼蓝浆果幼苗生长的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(4): 25-31.

[80] 付 燕, 杨 芩, 姚许思民. 淘米水对蓝莓土壤 pH 和主要营养

物质含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(20): 165-168.

[81] Tsuda H, Kunitake H, Aoki Y, et al. Efficient *in vitro* screening for higher soil pH adaptability of intersectional hybrids in blueberry [J]. HortScience, 2014, 49(2): 141-144.

[82] Yang W Q, Andrews H E, Baisey A. Blueberry rootstock: selection, evaluation, and field performance of grafted blueberry plants [J]. Acta Horticulturae, 2016(1117): 119-124.

[83] Darnell R L, Williamson J G, Bayo D C, et al. Impacts of *Vaccinium arboreum* rootstocks on vegetative growth and yield in two southern highbush blueberry cultivars [J]. HortScience, 2020, 55(1): 40-45.

[84] Li Q S, Yu P, Lai J R, et al. Micropropagation of the potential blueberry rootstock - *Vaccinium arboreum* through axillary shoot proliferation [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 280(2): 109908.

种类结构、提取分离纯化、检测方法及定性定量检测方面进行了归纳总结,以期为酚酸类物质引起的连作障碍问题的缓解提供技术参考。

1 酚酸类物质种类及结构特征

酚酸类化合物是一类结构简单、含有芳香酚环、酚羟基和羧基的有机酸。具有化感作用的酚酸类物质主要是苯甲酸为母核的 C₆ - C₁ 型酚酸和以

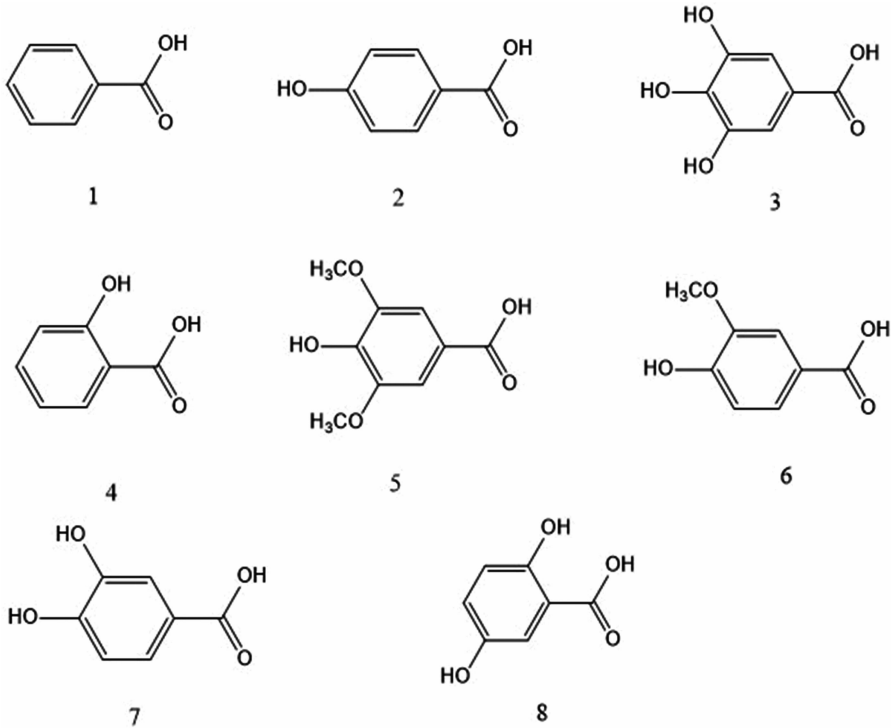
苯丙烯酸为母核的 C₆ - C₃ 型酚酸。

1.1 以苯甲酸为母核的 C₆ - C₁ 型酚酸

具有化感作用的酚酸类化合物中,大部分属于母核为 C₆ - C₁ 型的苯甲酸类酚酸。目前研究显示,具有化感作用的物质主要有苯甲酸、对羟基苯甲酸、没食子酸、水杨酸、丁香酸、香草酸、原儿茶酸、龙胆酸等^[10,14-15],其分子式和化学结构式详见表 1、图 1。

表 1 以苯甲酸为母核的 C₆ - C₁ 型酚酸类化合物

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子量
1	苯甲酸	benzoic acid	65 - 85 - 0	C ₇ H ₆ O ₂	122. 12
2	对羟基苯甲酸	<i>p</i> - hydroxybenzoic acid	99 - 96 - 7	C ₇ H ₆ O ₃	138. 13
3	没食子酸	gallic acid	149 - 91 - 7	C ₇ H ₆ O ₅	170. 12
4	水杨酸	salicylic acid	69 - 72 - 7	C ₇ H ₆ O ₃	138. 12
5	丁香酸	syringic acid	530 - 57 - 4	C ₉ H ₁₀ O ₅	198. 17
6	香草酸	vanillic acid	121 - 34 - 6	C ₈ H ₈ O ₄	168. 15
7	原儿茶酸	3,4 - dihydroxybenzoic acid	99 - 50 - 3	C ₇ H ₆ O ₄	154. 12
8	龙胆酸	2,5 - dihydroxybenzoic acid	490 - 79 - 9	C ₇ H ₆ O ₄	154. 12



1~8 对应表 1 中的序号

图1 以苯甲酸为母核的 C₆-C₁ 型酚酸类化合物结构式

在药用植物连作障碍的研究中发现,没食子酸、水杨酸、丁香酸、香草酸、原儿茶酸等是导致三七、地黄、西洋参、人参、太子参、丹参、半夏等这些常用大宗道地药材产生化感作用的主要酚酸物质^[16]。梁薇薇等通过室内模拟试验,阐明了苯甲

酸、丁香酸及香草酸对红松种子萌发存在抑制作用,且对种子萌发的抑制作用强于对胚轴及胚根长的影响^[14]。谢越等在研究 5 种酚酸对滁菊扦插幼苗的生长影响时,发现对羟基苯甲酸、水杨酸等苯甲酸类外源酚酸对根长度、可溶性糖含量、可溶性

蛋白含量、叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量均有显著抑制作用,其中对羟基苯甲酸的抑制作用最强^[17]。鲁晓峰等研究发现,对羟基苯甲酸与邻苯二甲酸 2 种酚酸能显著影响植株根系 $H^{+}-ATPase$ 、 $K^{+}/Na^{+}-ATPase$ 及 $Ca^{2+}/Mg^{2+}-ATPase$ 活性,阻碍细胞内外各离子的运转能力^[18]。

1.2 以苯丙烯酸为母核的 C₆-C₃ 型酚酸

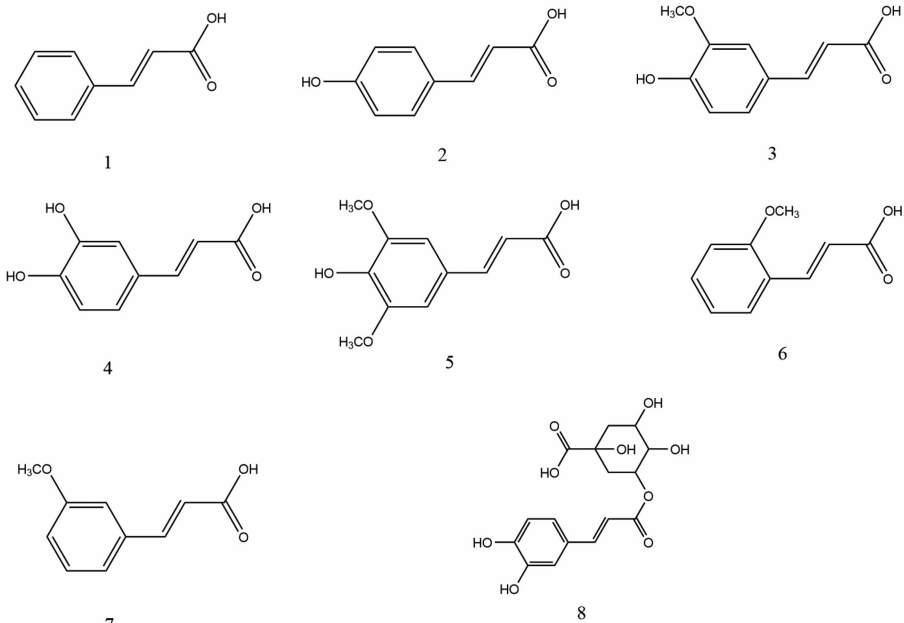
以苯丙烯酸为母核的 C₆-C₃ 型酚酸是具有化感作用的酚酸类化合物另一类主要构型,主要以肉桂酸及其衍生物的形式存在。目前研究表明,具有化感作用的苯丙烯酸类化合物包括肉桂酸、对香

豆酸、阿魏酸、咖啡酸、芥子酸、2-甲氧基肉桂酸、3-甲氧基肉桂酸、绿原酸等^[10,15,19],其分子式和化学结构式详见表 2、图 2。

研究发现,低浓度的香豆素会对种子的萌发与生长产生很强的抑制作用,绿原酸对植物细胞壁的建立与根的生成则具有胁迫作用^[20]。Abenavoli 等研究表明,反式肉桂酸、对香豆酸、阿魏酸不同程度地抑制了玉米幼苗对硝酸盐的吸收,影响了植物体内氮素营养情况,其抑制程度与酚酸浓度和其芳香环中取代基的结构有关^[21]。

表 2 以苯丙烯酸为母核的 C₆-C₃ 型酚酸类化合物

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子量
1	肉桂酸	trans - cinnamic acid	140 - 10 - 3	C ₉ H ₈ O ₂	148. 16
2	对香豆酸	<i>p</i> - coumaric acid	501 - 98 - 4	C ₉ H ₈ O ₃	164. 16
3	阿魏酸	ferulic acid	1135 - 24 - 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194. 19
4	咖啡酸	3,4 - dihydro xycinnamic acid	331 - 39 - 5	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194. 19
5	芥子酸	sinapic acid	530 - 59 - 6	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224. 21
6	2 - 甲氧基肉桂酸	2 - methoxycinnamic acid	6099 - 03 - 2	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178. 18
7	3 - 甲氧基肉桂酸	3 - methoxycinnamic acid	6099 - 04 - 3	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178. 18
8	绿原酸	chlorogenic acid	327 - 97 - 9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354. 31



1~8 对应表 2 中的序号

图2 以苯丙烯酸为母核的 C₆-C₃ 型酚酸类化合物结构式

2 酚酸类物质提取

酚酸类物质酚羟基是其主要活性基团,但该基团容易受到光照、温度等外界因素的影响,大多易被氧化成羰基而失去活性^[22]。因此,在酚酸的提取

中须要注意光照、试验温度、试验时间等试验条件的影响。

2.1 溶剂提取法

酚酸类物质在植物中通常以氢键和疏水键形式与其他大分子物质形成稳定的分子复合物,所以

对提取溶剂要求是对酚酸具有很好的溶解性,但不应与酚酸发生化学反应;有氢键断裂的作用,但浸出杂质少^[23-24]。

常规溶剂提取法操作简单、成本低廉,不需要昂贵精密的仪器就能达到提取效果,被实验室作为最为常用的提取方法。杨泽良等通过应用不同提取溶剂提取细叶旱芹地上部化感物质,用其提取液处理蔬菜种子,发现乙醇提取液对蔬菜种子的萌发抑制效果最强,其次是甲醇提取物^[25]。

除了常规的溶剂提取法,研究者还发现了新型绿色溶剂,在保证化合物高提取率的前提下,增加了环保、可持续性等功能。Alañón 等提出了以氯化胆碱衍生物为基础的深共晶溶剂作为橄榄叶中酚类化合物的新型绿色替代溶剂,其提取率与传统溶剂相似^[26]。深共晶溶剂具有热稳定性好、毒性低、可持续性、减少有机溶剂的使用和制备廉价等优点,被称为“21 世纪的新型绿色溶剂”^[27-28]。

2.2 超声波辅助提取法

超声辅助提取法提取样品中的有效成分是利用超声波具有的机械效应、空化效应和热效应作用,增大孔径从而加速化合物的扩散^[29],超声波辅助提取条件有温度、溶剂、提取时间及料液比例等^[30]。

超声波辅助提取法作为一种快速提取技术,能在短时间内提取高酚类、黄酮类和糖苷类化合物,减少溶剂消耗^[31]。薛宏坤等提取万寿菊花多酚成分,采用二阶速率模型评价热回流提取法、超声波辅助提取法和微波辅助提取法 3 种提取方法,结果得出超声波辅助提取的总酚含量高于其他 2 种提取方法^[32]。有学者研究超声辅助提取枸杞中绿原酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸和阿魏酸等 5 种酚酸,采用 4 因素 3 水平 Box - Behnken 设计探讨出最优提取方法,即在 33% 的乙醇溶液:样品体积比为 40:1 的比例下,采用 100 W 超声功率,提取 30 min,有利于酚类化合物的提取、分离和药物分析,为枸杞作为保健食品和药物的进一步研究奠定了基础^[33]。

2.3 微波辅助提取法

微波辅助提取是采用非接触式热源,能量传递更快,可选择性加热减少热梯度,快速达到反应过程,使提取时间缩短、减少溶剂消耗^[34]。

微波辅助提取法与超声波辅助提取法和溶剂提取法相比,该方法可以避免酚酸类物质的降解,

同时在较短的时间内获得了所有组分的最高回收率,消耗的溶剂和能量更少^[35]。Chiremba 等用微波辅助提取不同硬度高粱和玉米麸皮和面粉中的结合酚酸,避免了咖啡酸随 pH 值的增加发生的不可逆的化学转化,同时也减少了羟基肉桂酸和羟基苯甲酸衍生物因高温产生的降解^[36]。Pellati 等在提取蜂胶原料中的酚酸类物质时,其回收率为 95.3% ~ 98.1%,并且没有降解产物生成^[37]。Molina 等比较不同方法提取酚酸和黄酮类化合物,结果表明,微波辅助提取的含量分别比索氏提取法和超声波提取法高 34.54%、31.95%。利用微波提取的方法比其他方法提取时间短得多,是一种不需要有机溶剂就能获得酚酸类化合物的有效方法^[38]。

3 酚酸类物质分离纯化

3.1 大孔树脂分离纯化

大孔吸附树脂的吸附性能与其表面性能、孔结构以及吸附剂的溶解度有关^[39]。钟方丽等研究 D-101、LX-28、LX-1、LSA-21、LX-36、AB-8 这 6 种不同类型大孔树脂对覆盆子总酚酸的静态吸附及解吸附效率,结果得出,AB-8 型大孔树脂效果最好,吸附率达到 89.56%,解吸率为 90.69%,通过正交试验调整最佳纯化条件,其提取干浸膏中总酚酸含量提高为原来的 3.5 倍^[40];这与刘兴赋等得出的结果^[41]类似,AB-8 分离蜘蛛香中总酚酸的效果最好,吸附率为 92.93%,解吸率为 84.24%。谢越等利用 D-101 大孔树脂柱富集纯化连作 5 年滁菊土壤样品中的阿魏酸,得到的 100 份校正样品经过近红外光谱法测定,其校正相关系数达到 0.991 4^[11]。

3.2 萃取分离纯化

土壤中酚酸含量低,须要进行富集纯化,与其他物质分离,常用于富集酚酸的技术有液-液萃取^[30]、固相萃取^[42]、膜萃取^[43]等。

有研究表明,在液-液萃取过程中进行强烈的振动,将极性相似的化合物转移到有机相中进行分离,正己烷和三氯甲烷馏分可以提取相对非极性的化合物,乙酸乙酯和丙酮可以提取相对极性的化合物,其余高极性的化合物则作为残留物留在水相中^[30]。固相萃取的效果由固相萃取柱的组成以及吸附、解吸原理决定,张晓华等用 HLB、PSD 和 MAX 这 3 种不同的固相萃取柱对模拟蜂蜜中酚酸类物质检测进行前处理,结果表明,经 HLB 柱处理的 10 种

酚酸类物质的平均回收率为 70.9% ~ 102.2%; 经 PSD 柱处理的平均回收率为 55.7% ~ 85.5%; 经 MAX 柱处理的平均回收率为 1.8% ~ 102.1%, 表明不同的萃取柱组成导致的萃取效果不同^[42]。

含极性或者极性较强的酸性有机物在高效气相色谱或高效气相色谱-质谱联用检测前须要进行衍生化才能实现, 张莉等检测水中酚酸采用聚苯乙烯-二乙烯苯膜萃取, 萃取完成后, 将膜片移入衍生瓶中, 采用超声技术对酸性有机物进行洗脱和衍生, 可以有效节省溶剂的使用和预处理时间^[44]。Asadi 等采用凝胶电膜法利用电辅助有效提取苹果、橘子和猕猴桃汁中酚酸类化合物, 以最佳参数对提取方法进行了验证, 得出较高的线性及回收率^[43], 具有操作简便、成本低、环境友好等优点。

4 酚酸类物质的检测方法

4.1 福林酚(Folin-Ciocalteu)比色法

福林酚比色法多酚含量测定的原理为在碱性条件下, 酚类化合物的酚羟基与 Folin-Ciocalteu 试剂中钨钼酸的 W^{6+} 反应, 将其还原成 W^{5+} , 生成蓝色络合物^[45], 在一定波长范围内可测定其吸光度。

福林酚比色法适合较为简单的总酚测定, 可以准确稳定测出总酚含量, 林倩等采用响应面法优化福林酚法测定冬枣中总酚含量, 优化后 Folin-Ciocalteu 试剂浓度为 0.8 mol/L、20% 碳酸钠溶液取 0.6 mL、反应温度为 40 °C, 测得的总酚含量与预估吻合度达 98.4%^[46]。但是福林酚比色法会受到其他氧化物质的干扰, 对酚类物质不具有特异性, 在较复杂的植物样品的测定前需要注意其他易氧化物质的干扰^[47]。Padma 等测定甘薯总酚时比较 Folin-Denis、Folin-Ciocalteu 2 种试剂测出的总酚含量, 发现 Folin-Ciocalteu 试剂受还原糖及抗坏血酸等其他易氧化物质的干扰更大, 导致 Folin-Ciocalteu 试剂测出的总酚含量偏高^[48]。这与 Showkat 等在研究菊芋酚酸时的结论一致, 福林酚比色法测出的总酚含量偏高^[49]。

4.2 高效液相色谱(HPLC)法

利用高效液相色谱研究土壤中的化感自毒物质酚酸类物质文献报道很多。大部分文献报道中色谱柱采用十八烷基键合硅胶色谱柱, 流动相体系均为有机相——水, 调节 pH 值使流动相体系成弱酸性, 减少了苯酚、酚羟基和羧基的电离^[50], 有利于酚酸物质的分离。谢越等选用 Symmetry C₁₈ 色谱柱

同时测定滁菊样品中的 9 种酚酸, 色谱条件为流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为以冰醋酸调节至 pH 值为 2.8 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, 柱温设为 25 °C, 在 280 nm 检测波长下运行 30 min, 结果表明, 其检出限介于 0.01 ~ 0.08 mg/L, 达到痕量检测要求^[10]。González-González 等建立了高选择性、高灵敏度、高精确度的高效液相色谱-二极管阵列检测器同时测定龙葵水提取物及其水解产物中 6 种酚酸的含量, 该方法在浓度范围内呈良好的线性关系 ($r > 0.999$), 回收率为 88.07% ~ 109.17%, 基质效应均小于 5%, 可作为药用植物提取液的检测^[51]。Nian 等则利用 HPLC 快速、高准确度等特点在 30 min 内检测出茶叶中 20 种化合物, 其中包括酚酸类化合物^[52]。

现在对高效液相色谱法检测酚酸物质的方法越来越成熟, 越来越多研究者们结合其他方法或条件, 使检测结果更加准确。比如, 超高压液相色谱法与小粒径色谱柱结合, 可以达到高效、快速的分离目的, 中药虎杖中的 34 种化合物可以在 10 min 内分析完成^[53]。还有结合数学方法, 利用数字色谱结合普通色谱或质谱的方法将重叠难区分的谱图分辨为纯物质的谱图, 从而实现化合物的快速检测, 比如利用高效液相色谱法结合交替三线性分解算法(ATLD), 可实现蜂蜜中 10 种酚酸类物质快速定性和定量分析^[42]。

4.3 毛细管电泳法

毛细管电泳法具有分辨率高、模式多、分析时间短、操作成本低、污染物去除容易等优点, 可以高效地进行提取物的分离与测定^[54]。Martí 等通过响应面法优化在 20 min 内实现了番茄中 9 种多酚的分离, 经过方法验证, 该方法回收率为 77% ~ 106%, 日内、日间的峰面积相对标准偏差分别 < 3.1%、< 3.7%, 保留时间的相对标准偏差分别 < 0.2%、< 1.4%, 检出限浓度为 0.8 ~ 3.8 mg/kg, 满足了毛细管电泳法分析番茄中多酚类物质的要求^[12]。

电动增压毛细管电泳是瞬间等速电泳和场放大进样结合的在线富集方法, 可同时分析植物中常见的 10 种酚酸, 该方法验证结果表明, 回归曲线的相关系数大于 0.997, 相对标准偏差和相对误差分别小于 9.63%、4.70%, 检出限(LOD)为 0.01 ~ 2.5 ng/mL, 与传统的毛细管区带电泳方法相比, 该方法对酚酸的灵敏度可提高 2.5 万倍^[55]。毛细管

电泳-化学发光法可以快速分离并定量检测出中药中阿魏酸、绿原酸、水杨酸这 3 种酚酸类物质,在优化条件下,可在 7 min 内达到化合物的分离并快速检测^[56]。毛细管电泳法是一种比 HPLC 法样品消耗量和溶剂消耗量低的绿色方法,符合环境友好的环保要求。

4.4 红外吸收光谱法

近年来,红外吸收光谱法作为一种快速检测分析的方法,而且可以对化合物基团进行准确鉴别,逐渐进入研究者的视野。红外吸收光谱法测出各物质的数据较复杂,可能出现非线性关系且含量差异大,因此需要结合化学计量学对复杂的数据进行统计分析,偏最小二乘法就是常用的与红外吸收光谱结合的常用方法^[57]。偏最小二乘傅里叶变换红外光谱法测定药用植物提取物中酚酸含量,测得的酚酸含量与 Folin-Ciocalteu 比色法测得的酚酸含量在相同范围内,通过不同波段比较,其中红外法测得的结果最为准确^[58]。谢越等快速检测连作土壤中阿魏酸含量,测出数据采用偏最小二乘法分析,结果表明,模型校正集和验证集与高效液相色谱法测定的参考值之间均呈现良好的相关关系,校正相关系数与交叉验证相关系数均大于 0.99^[11]。Vivar-Quintana 等利用近红外光谱法测定蜂胶中的酚酸物质,得出结果^[59]也与高效液相色谱法一致。

也有学者认为近红外光谱法需要通过数学模型进行二次拟合,才能得到被测化合物的含量,其准确度不足以取代传统的高效液相色谱法,且建立近红外光谱的识别和定量模型需要大量的时间、成本和精力,但模型建立后,近红外光谱具有非破坏性和测量时间短(约 5 min)的巨大优势^[60]。近红外光谱作为一种快速、无损的方法,在不使用试剂的情况下,制备样品较少或不需要制备样品,是未来酚酸类检测的可行性方法。

4.5 超高效液相色谱-串联质谱联用法(UPLC-MS/MS)

超高效液相色谱在高效液相色谱的基础上对分离效果和灵敏度进一步提高^[61-62],但是对分离化学分子质量、结构相近的化合物以及含量较低的游离酚酸分离效果和灵敏度还存在不足^[63]。Fang 等采用 UPLC-MS 对全国各地的金莲花汤剂中化学成分进行鉴定,共鉴定出 89 种化合物,除个别化合物外,其他化合物的精密度、重复性、稳定性和回收率均符合测定要求,定量限低至 0.05~4.67 ng/mL^[64],可用于

中药制剂痕量成分的相关研究。

优化色谱柱、流动相组成和流速等色谱条件,使相邻峰得到最佳分离,避免了峰拖尾,可以得到更好的检测结果。Wabaidur 等优化 UPLC-MS 建立了一种简便、灵敏、准确的 UPLC-MS 方法,用于蜂蜜中 9 种酚酸类、9 种黄酮类、4 种酚类物质的同时分离、鉴定和定量^[13]。对于复杂的样品,UPLC 与 MS 联用可以同时多种酚酸类物质在较短的时间里进行定性分析与定量分析,具有高选择性与高灵敏度,可节约试验时间以及试验能源,UPLC-MS 越来越被科研工作者青睐。

5 展望

酚酸类物质已经被证明是单一体系连作的重要化感物质。然而,其产生机制尚不完全明确,与植物生长的相互作用还需要深入研究,进行这些科学研究工作的前提是酚酸类物质从土壤环境中有效分离和快速分析,这对于快速发展的现代农业行业和产业来说,是急迫的技术需求。

另外,有研究发现酚酸物质在田间土壤中的浓度,明显低于实验室试验抑制种子发芽和幼苗生长的浓度,田间条件下酚酸自毒的作用是如何发挥的?各种酚酸结构中的不同官能团,是否在化感自毒过程中扮演不同作用?酚酸类物质性质不稳定,其酚羟基在光照、温度等自然环境下会造成氧化失活,发生降解等反应,因此,温室效应下气温升高与二氧化碳浓度升高是否会对酚酸类物质产生和降解产生影响?在农田自然条件下可以采取哪些措施,促进酚酸类物质降解?这些科学问题关系到田间土壤体系中酚酸物质自毒机理,以及能否通过改变环境因素,改变酚酸形态,降低酚酸浓度,甚至在田间土壤环境中,原位降解酚酸,减少酚酸类物质的自毒效应,从而缓解作物的连作障碍问题。上述这些问题关系到农业的绿色高质量发展,都值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Molish H B. Der einfluss einer pflanze auf die andere, allelopathie [J]. Nature, 1938, 141 (3568): 493.
- [2] Macías F A, Mejías F J, Molinillo J M. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications [J]. Pest Management Science, 2019, 75 (9): 2413-2436.
- [3] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S, et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions [J].

- Science,2003,301(5638):1377–1380.
- [4] Li Q A, Wu Y H, Wang J Y, et al. Linking short – chain N – acyl homoserine lactone – mediated quorum sensing and replant disease: a case study of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 787.
 - [5] Li J Y, Lin S X, Zhang Q, et al. Phenolic acids and terpenoids in the soils of different weed – suppressive circles of allelopathic rice [J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2020, 66(2): 266–278.
 - [6] Zhang Z J, Liu Y J, Yuan L, et al. Effect of allelopathy on plant performance: a meta – analysis [J]. *Ecology Letters*, 2021, 24(2): 348–362.
 - [7] 谢星光, 陈 晏, 卜元卿, 等. 酚酸类物质的化感作用研究进展 [J]. *生态学报*, 2014, 34(22): 6417–6428.
 - [8] 袁 圆, 张爱民, 王永平, 等. 连作辣椒根围化学成分鉴定与动态分析 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(21): 139–144.
 - [9] 张 璐, 杨瑞秀, 王 莹, 等. 甜瓜连作土壤中酚酸类物质测定及降解研究 [J]. *北方园艺*, 2017(9): 18–23.
 - [10] 谢 越, 俞 浩, 汪建飞, 等. 高效液相色谱法同时测定滁菊样品中的 9 种酚酸 [J]. *分析化学*, 2013, 41(3): 383–388.
 - [11] 谢 越, 周 成, 涂 从, 等. 近红外光谱技术定量分析连作滁菊土壤中的阿魏酸含量 [J]. *分析化学*, 2017, 45(3): 363–368.
 - [12] Martí R, Valcárcel M, Herrero – Martínez J M, et al. Simultaneous determination of main phenolic acids and flavonoids in tomato by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 439–446.
 - [13] Wabaidur S M, Ahmed Y B H, Alothman Z A, et al. Ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry method for the simultaneous determination of phenolic constituents in honey from various floral sources using multiwalled carbon nanotubes as extraction sorbents [J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(15): 2597–2606.
 - [14] 梁薇薇, 陈立新, 段文标, 等. 酚酸物质对红松种子萌发及苗木生长和生理特性的影响 [J]. *生态学报*, 2021, 41(4): 1583–1592.
 - [15] Gulzar A, Siddiqui M B, Bi S. Phenolic acid allelochemicals induced morphological, ultrastructural, and cytological modification on *Cassia sophera* L. and *Allium cepa* L. [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(5): 1211–1221.
 - [16] 吴红森, 林文雄. 药用植物连作障碍研究评述和发展透视 [J]. *中国生态农业学报(中英文)*, 2020, 28(6): 775–793.
 - [17] 谢 越, 肖 新, 周 毅, 等. 5 种酚酸物质对滁菊扦插幼苗生长及酶活性的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(6): 19–24.
 - [18] 鲁晓峰, 杜国栋, 邵 静, 等. 草莓根线粒体对外源酚酸胁迫的生理响应 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54(5): 1029–1042.
 - [19] 鄢邵斌, 王 朋. 化感物质对植物根系形态属性影响的 meta 分析 [J]. *应用生态学报*, 2020, 31(7): 2168–2174.
 - [20] Wojtania A, Dziurka M, Skrzypek E. *In vitro* rooting response of yellow – flowered magnolia in relation to the phenolic acids content [J]. *Agronomy*, 2020, 10(12): 1880.
 - [21] Abenavoli M R, Lupini A, Oliva S, et al. Allelochemical effects on net nitrate uptake and plasma membrane H⁺ – ATPase activity in maize seedlings [J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(1): 149–153.
 - [22] Rocchetti G, Blasi F, Montesano D, et al. Impact of conventional/ non – conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves [J]. *Food Research International*, 2019, 115: 319–327.
 - [23] 张东明. 酚酸化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
 - [24] Roselló – Soto E, Martí – Quijal F J, Cilla A, et al. Influence of temperature, solvent and pH on the selective extraction of phenolic compounds from tiger nuts by – products: triple – TOF – LC – MS – MS characterization [J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 797.
 - [25] 杨泽良, 黄良伟, 向书琴, 等. 细叶旱芹地上部不同溶剂浸提液对 3 种蔬菜种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *中国瓜菜*, 2020, 33(9): 57–62, 78.
 - [26] Alañón M E, Ivanović M, Gómez – Caravaca A M, et al. Choline chloride derivative – based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13(1): 1685–1701.
 - [27] Huang J, Guo X Y, Xu T Y, et al. Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products [J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1598: 1–19.
 - [28] Yang L L, Li L, Hu H, et al. Natural deep eutectic solvents for simultaneous extraction of multi – bioactive components from Jinqi Jiangtang preparations [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(1): 18.
 - [29] 夏 婷, 赵超亚, 杜 鹏, 等. 食品中多酚类化合物种类、提取方法和检测技术研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(5): 231–238.
 - [30] Chan H P, Chua L S, Abdullah F I. Ultrasound assisted extraction and solvent partition for polyhydroxylated and polymethoxylated flavones and phenolic acids from *Orthosiphon aristatus* [J]. *Separation Science Plus*, 2021, 4(2): 60–67.
 - [31] Pezeshkpour V, Khosravani S A, Ghaedi M, et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic acids from broccoli vegetable and using sonochemistry for preparation of MOF – 5 nanocubes: Comparative study based on micro – dilution broth and plate count method for synergism antibacterial effect [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 40: 1031–1038.
 - [32] 薛宏坤, 戴 宁, 谭佳琪, 等. 不同提取方法对万寿菊花中总多酚和总花色苷动力学模型对比研究 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 6–13.
 - [33] Chen S S, Zeng Z, Hu N, et al. Simultaneous optimization of the ultrasound – assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology [J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 1–8.
 - [34] Vlačić J, Janković T, Živković J, et al. Comparative study of subcritical water and microwave – assisted extraction techniques impact on the phenolic compounds and 5 – hydroxymethylfurfural content in pomegranate peel [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2020, 75(4): 553–560.
 - [35] Fang X S, Wang J H, Hao J F, et al. Simultaneous extraction, identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave – assisted extraction combined with HPLC – DAD – ESI – MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 527–536.

- [36] Chiremba C, Rooney L W, Beta T. Microwave – assisted extraction of bound phenolic acids in bran and flour fractions from sorghum and maize cultivars varying in hardness[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4735 – 4742.
- [37] Pellati F, Prencipe F P, Bertelli D, et al. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave – assisted extraction combined with high – performance liquid chromatography using the fused – core technology [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2013, 81/82: 126 – 132.
- [38] Molina G A, González – Fuentes F, Loske A M, et al. Shock wave – assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *Eysenhardtia polystachya* heartwood: a novel method and its comparison with conventional methodologies [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 61: 104809.
- [39] Wang X Y, Wang S S, Huang S S, et al. Purification of polyphenols from distiller’ s grains by macroporous resin and analysis of the polyphenolic components[J]. Molecules, 2019, 24(7): 1284.
- [40] 钟方丽, 徐秀杰, 王晓林. 覆盆子总酚酸纯化工艺研究[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 155 – 159.
- [41] 刘兴赋, 程盛勇, 陈 慧, 等. 大孔树脂对蜘蛛香总酚酸的吸附热力学和动力学研究[J]. 离子交换与吸附, 2020, 36(5): 443 – 450.
- [42] 张晓华, 吕敏明, 郑晶晶, 等. 化学计量学二阶校正方法结合高效液相色谱用于蜂蜜中 10 种酚酸类物质的快速定量分析[J]. 色谱, 2020, 38(5): 572 – 580.
- [43] Asadi S, Nojavan S, Behpour M, et al. Electromembrane extraction based on agarose gel for the extraction of phenolic acids from fruit juices[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1159: 122401.
- [44] 张 莉, 张辰凌, 桂建业, 等. 固相膜萃取 – 膜上超声衍生法测定水中酸性有机物[J]. 分析化学, 2013, 41(11): 1709 – 1713.
- [45] 刘玉明, 李珂娴, 何 颖, 等. 枇杷花水提液总酚含量的 Folin – Ciocalteu 法测定[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4): 838 – 840.
- [46] 林 倩, 吴 昊, 刘芊辰, 等. 响应面法优化福林酚法测定冬枣中总酚含量[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 86 – 90.
- [47] Ainsworth E A, Gillespie K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin – Ciocalteu reagent[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 875 – 877.
- [48] Padda M S, Picha D H. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(7): 412 – 416.
- [49] Showkat M M, Falck – Ytter A B, Strætkvern K O. Phenolic acids in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.): plant organ dependent antioxidant activity and optimized extraction from leaves [J]. Molecules, 2019, 24(18): 3296.
- [50] Liu A H, Li L E, Xu M, et al. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC – DAD method[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(1): 48 – 56.
- [51] González – González R M, Barragán – Mendoza L, Peraza – Campos A L, et al. Validation of an HPLC – DAD method for the determination of plant phenolics [J]. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2019, 29(5): 689 – 693.
- [52] Nian B, Chen L J, Yi C, et al. A high performance liquid chromatography method for simultaneous detection of 20 bioactive components in tea extracts [J]. Electrophoresis, 2019, 40(21): 2837 – 2844.
- [53] 潘智然, 梁海龙, 梁朝晖, 等. 基于诊断离子策略的超高压液相色谱 – 线性离子阱 – 轨道离子阱质谱联用技术解析中药虎杖的化学成分[J]. 色谱, 2015, 33(1): 22 – 28.
- [54] Xu L Y, Chang R M, Chen M, et al. Quality evaluation of Guan – Xin – Ning injection based on fingerprint analysis and simultaneous separation and determination of seven bioactive constituents by capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2017, 38(24): 3168 – 3176.
- [55] Lin Y H, Huang H C, Hsu W L. Application of capillary electrophoresis with electrokinetic supercharging and sweeping for the on – line preconcentration of phenolic acids[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(23): 7093 – 7100.
- [56] Chen X, Mao J X, Wen F Y, et al. Determination of phenolic acids in botanical pharmaceutical products by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection[J]. Analytical Letters, 2021, 54(5): 817 – 829.
- [57] 范林宏, 范文翔, 韦志强, 等. 近红外光谱技术结合化学计量学在中药分析中的应用现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 205 – 210.
- [58] Bensemmane N, Bouzidi N, Daghbouche Y, et al. Quantification of phenolic acids by partial least squares Fourier – transform infrared (PLS – FTIR) in extracts of medicinal plants[J]. Phytochemical Analysis, 2021, 32(2): 206 – 221.
- [59] Vivar – Quintana A M, González – Martín M I, Revilla I, et al. Determination and quantification of phenolic acids in raw propolis by reversed phase high performance liquid chromatography. Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy [J]. Journal of Apicultural Research, 2018, 57(5): 648 – 656.
- [60] Li W L, Qu H B. Rapid quantification of phenolic acids in *Radix salvia Miltiorrhiza* extract solutions by FT – NIR spectroscopy in transreflective mode[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 52(4): 425 – 431.
- [61] 张 帅, 丛海林, 于 冰. 超高效液相色谱的发展及在分析领域的应用[J]. 分析仪器, 2017(6): 16 – 27.
- [62] 吴 哲, 李赵嘉, 冯 薇, 等. 蒲公英酚酸综合提取技术优化及质量评价[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(23): 190 – 195.
- [63] Zhao X Q, Guo S, Yan H, et al. Analysis of phenolic acids and flavonoids in leaves of *Lycium barbarum* from different habitats by ultra – high – performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Biomedical Chromatography, 2019, 33(8): e4552.
- [64] Fang M Y, Liu S Y, Wang Q Q, et al. Qualitative and quantitative analysis of 24 components in Jinlianhua decoction by UPLC – MS/MS[J]. Chromatographia, 2019, 82(12): 1801 – 1825.