

引用格式:

张朝阳, 陈娥, 马世龙, 胡百顺. HPLC 法测定藤茶中 5 种黄酮类物质的含量[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 54–61.

ZHANG C Y, CHEN E, MA S L, HU B S. Determination of five flavonoids contents in vine tea by HPLC[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(6): 54–61.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



HPLC 法测定藤茶中 5 种黄酮类物质的含量

张朝阳, 陈娥, 马世龙, 胡百顺*

(恩施土家族苗族自治州农业科学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇为流动相 A、0.1%磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱, (2R,3R)-二氢杨梅素的检测波长为 290 nm, (2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷和杨梅素的检测波长为 290 nm (0~<21 min)和 255 nm(21~30 min), 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 测定 5 种黄酮类物质的含量。结果表明: (2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量的线性回归方程分别为 $Y=0.5031X+0.6028$, $R^2=0.9992$; $Y=0.5904X+0.0720$, $R^2=0.9991$; $Y=0.4334X-0.0077$, $R^2=0.9995$; $Y=0.5077X-0.0207$, $R^2=0.9988$; 线性范围分别为 10.60~106.00、2.50~50.00、2.65~53.00、1.06~26.50 μg/mL; 单波长(290 nm)测定(2R,3R)-二氢杨梅素含量, 双波长(290、255 nm)测定花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量和(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积的方法系统适用性、线性关系、重复性、稳定性和加标回收率良好, 精密度高; 5 种黄酮类物质色谱峰分离度均大于 1.5, (2R,3R)-二氢杨梅素色谱峰理论塔板数大于 5 000, (2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素色谱峰理论塔板数均大于 20 000, 且单个样品检测时间为 30 min; 此方法可用于检测藤茶中黄酮类物质的含量。

关键词: 藤茶; 黄酮; 高效液相色谱; 二氢杨梅素

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)06-0054-08

Determination of five flavonoids contents in vine tea by HPLC

ZHANG Chaoyang, CHEN E, MA Shilong, HU Baishun*

(Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol(A)-0.1%-phosphoric acid solution(B) as the mobile phase for gradient elution was used in the HPLC to measure the contents of five flavonoids. The detection wavelength of (2R,3R)-dihydromyricetin was 290 nm, and the detection wavelength of (2S,3S)-dihydromyricetin, taxifolin, myricitrin and myricetin was 290 nm before 21 min and 255 nm from 21 to 30 min. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was maintained at 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The results showed that the linear regression equations of the contents of (2R,3R)-dihydromyricetin, taxifolin, myricitrin and myricetin were $Y=0.5031X+0.6028$, $R^2=0.9992$, $Y=0.5904X+0.0720$, $R^2=0.9991$, $Y=0.4334X-0.0077$, $R^2=0.9995$, $Y=0.5077X-0.0207$, $R^2=0.9988$, and the linear ranges were 10.6-106, 2.50-50.00, 2.65-53.00, 1.06-26.50 μg/mL, respectively. The single-wavelength(290 nm) method for the determination of (2R,3R)-dihydromyricetin content, and the dual-wavelengths(290, 255 nm) method for the determination of the contents of taxifolin, myricitrin, myricetin and the peak area of (2S,3S)-dihydromyricetin were superior for system application, linear relationship, repeatability, stability and standard recovery with high precision. The chromatographic peak separations of 5 flavonoids were greater than 1.5, the theoretical plate numbers of (2R,3R)-dihydromyricetin was greater than 5 000, the theoretical plate numbers of (2S,3S)-dihydromyricetin, taxifolin, myricitrin, myricetin were greater than 20 000, and the detection time of single sample was 30 min. This method could be used for the analysis and detection of flavonoids contents in vine tea.

Keywords: vine tea; flavone; HPLC; dihydromyricetin

收稿日期: 2023-11-23

修回日期: 2024-10-25

基金项目: 湖北省标准化试点示范项目(HUBS-A-N-10-2023); 湖北省地方标准制修订项目(T-X-01-2023224)

作者简介: 张朝阳(1989—), 男, 河南许昌人, 硕士, 副研究员, 主要从事藤茶品质评价与开发研究, 316631555@qq.com; *通信作者, 胡百顺, 硕士, 副研究员, 主要从事藤茶生产、加工研究, 279814350@qq.com

藤茶, 俗称莓茶、龙须茶、端午茶、神仙草等, 是葡萄科蛇葡萄属木质藤本植物显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*(Hand.-Mazz.) W. T. Wang) 茎叶经摊青、杀青、揉捻、自然堆放、烘干等工艺加工而成的代用茶。此茶外披“白霜”, 汤色黄亮, 回甘快而持久, 富含黄酮类物质^[1], 具有抗菌消炎^[2-3]、清咽利喉、保肝护肝^[4-5]、降血糖血脂^[6]、改善睡眠等功效, 是一种典型的药食两用植物资源。

藤茶中黄酮类物质的测定多采用紫外分光光度法^[7-8]和高效液相色谱法^[9-11]。紫外分光光度法测定总黄酮含量耗时短, 但专属性不强; 高效液相色谱法能够测定单一黄酮类物质含量。有研究人员利用高效液相色谱法测定藤茶中二氢杨梅素、杨梅苷、杨梅素等物质含量^[12-14], 但多组分同时测定存在检测时间长、色谱峰间分离度低等问题。由于二氢杨梅素含量约占藤茶总黄酮含量的 80%^[15-16], 远高于其他单一黄酮类物质含量, 进样浓度将影响检测结果的准确性, 目前尚未见根据不同检测目的选择不同进样浓度的研究报道。

研究团队前期利用紫外分光光度计, 在 200 ~ 500 nm 范围内对(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素进行波长扫描, 发现(2R,3R)-二氢杨梅素在 220、290 nm 附近有较大吸收峰, 花旗松素在 210、290 nm 附近有较大吸收峰, 杨梅苷在 210、255、355 nm 附近有较大吸收峰, 杨梅素在 210、255、375 nm 附近有较大吸收峰, 同时(2R,3R)-二氢杨梅素和花旗松素在 255 nm 附近吸收响应值较低, 杨梅苷和杨梅素在 290 nm 附近吸收响应值较

低。考虑到 200 nm 附近可能存在杂质干扰^[12], 如果在单一检测波长 255、290、355、375 nm 条件下同时测定 4 种黄酮类物质含量, 结果的准确度将大大降低。参考相关研究^[17]和团队前期试验结果可知, 在流动相为甲醇(A)、0.1%磷酸溶液(B)系统条件下, 4 种黄酮类物质保留时间由短到长依次为(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素。甘小娜等^[18]研究发现(2S,3S)-二氢杨梅素的最高吸收波长为 290 nm。优化检测波长条件, 最终确定(2R,3R)-二氢杨梅素、(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素的检测波长为 290 nm, 杨梅苷、杨梅素的检测波长为 255 nm。本研究参考相关研究^[19-22]及团队前期试验结果, 考察了流动相洗脱方式、流动相比例、洗脱时间等对藤茶样品色谱峰数量、保留时间、分离度、理论塔板数的影响, 同时采用外标一点法考察了提取溶剂、料液比、超声提取时间对藤茶样品(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量和(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积的影响, 最终确定适宜的流动相洗脱条件和样品提取条件, 以期对藤茶黄酮类物质含量的测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2022 年收集湖北省恩施州来凤县各乡镇企业、合作社的藤茶样品, 粉碎过筛(孔径 0.25 mm), 密封避光保存, 样品信息见表 1。

表 1 藤茶样品信息

Table 1 Sample information of vine tea

样品编号	样品类型	样品来源	加工时间	收集时间
T01	须茶	湖北省来凤县大河镇	2022-08-15	2022-08-24
T02	须茶	湖北省来凤县三胡乡	2022-07-13	2022-08-25
T03	须茶	湖北省来凤县大河镇	2022-08-02	2022-08-24
T04	须茶	湖北省来凤县百福司镇	2022-07-25	2022-08-26
T05	须茶	湖北省来凤县三胡乡	2022-08-17	2022-08-25
T06	须茶	湖北省来凤县旧司镇	2022-08-15	2022-08-24
T07	须茶	湖北省来凤县绿水镇	2022-08-16	2022-08-24
T08	须茶	湖北省来凤县革勒车镇	2022-08-22	2022-08-25
T09	普叶	湖北省来凤县三胡乡	2022-08-21	2022-08-25
T10	普叶	湖北省来凤县大河镇	2022-08-16	2022-08-24
T11	普叶	湖北省来凤县旧司镇	2022-08-19	2022-08-24

(2R,3R)-二氢杨梅素对照品(纯度 \geq 98%)、杨梅苷对照品(纯度 \geq 98%)、杨梅素对照品(纯度 \geq 98%)

均购自上海源叶生物科技有限公司; 花旗松素对照品(纯度 \geq 98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限

公司。

1.2 主要仪器与设备

UltiMate 3000 高效液相色谱仪购自赛默飞世尔科技公司; TU-1810PC 紫外可见分光光度计购自上海普析通用仪器有限责任公司; Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)购自月旭科技股份有限公司; HC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)购自安捷伦科技有限公司; Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 购自赛默飞世尔科技公司。

1.3 色谱条件

采用 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱, 以甲醇为流动相 A, 0.1%磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱: 0~15 min, 25%~35%A; 15~23 min, 35%~50%A; 23~25 min, 50%~25%A; 25~30 min, 25%A。(2R,3R)-二氢杨梅素的检测波长为 290 nm, 其他黄酮类物质的检测

波长为: 0~21 min, 290 nm; 21~30 min, 255 nm。流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 各物质理论塔板数应不低于 5 000。

1.4 溶液制备

1.4.1 (2R, 3R)-二氢杨梅素对照品溶液的制备

称取(2R,3R)-二氢杨梅素对照品 5.3 mg, 以甲醇为溶剂, 溶解并稀释成质量浓度分别为 10.6、21.2、42.4、63.6、84.8、106 μg/mL 的系列对照品溶液。

1.4.2 花旗松素、杨梅苷、杨梅素混合对照品溶液的制备

分别称取花旗松素、杨梅苷、杨梅素对照品 5.0、5.3、5.3 mg, 以甲醇为溶剂, 溶解并稀释成系列混合对照品溶液(表 2)。

表 2 系列混合对照品溶液

Table 2 Series mixed standard solution

编号	混合对照品
HB-1	2.50 μg/mL 花旗松素+2.65 μg/mL 杨梅苷+1.06 μg/mL 杨梅素
HB-2	5.00 μg/mL 花旗松素+5.30 μg/mL 杨梅苷+2.65 μg/mL 杨梅素
HB-3	15.00 μg/mL 花旗松素+15.90 μg/mL 杨梅苷+5.30 μg/mL 杨梅素
HB-4	25.00 μg/mL 花旗松素+26.50 μg/mL 杨梅苷+10.60 μg/mL 杨梅素
HB-5	40.00 μg/mL 花旗松素+42.40 μg/mL 杨梅苷+15.90 μg/mL 杨梅素
HB-6	50.00 μg/mL 花旗松素+53.00 μg/mL 杨梅苷+26.50 μg/mL 杨梅素

1.4.3 供试品溶液的制备

取藤茶样品约 0.5 g, 精密称定后, 置于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 60% 甲醇溶液, 混匀, 称定质量, 超声提取 30 min, 取出后冷却至室温, 称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 混匀, 5 000 r/min 离心 10 min。

量取上清液 0.1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜即得(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液。

量取上清液 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜即得(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定供试品溶液。

1.5 (2R,3R)-二氢杨梅素含量测定的方法学考察

1.5.1 系统适用性考察

取 T01 号样品, 按“1.4.3”节的方法制备(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液; 另取 42.4 μg/mL

(2R,3R)-二氢杨梅素对照品溶液, 按“1.3”节色谱条件分别进样。

1.5.2 线性关系及定量限考察

取(2R,3R)-二氢杨梅素对照品溶液, 按“1.3”节的色谱条件分别进样, 以对照品质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归分析, 同时以信噪比 10:1 确定方法定量限。

1.5.3 精密度试验

取 T01 号样品, 按“1.4.3”节的方法制备(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液, 按“1.3”节的色谱条件连续进样 6 次, 记录(2R,3R)-二氢杨梅素峰面积。

1.5.4 重复性试验

取 T01 号样品, 按“1.4.3”节的方法制备(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液 6 份, 按“1.3”节的色谱条件分别进样, 记录(2R,3R)-二氢杨梅素峰面积, 并代入“1.5.2”节下的线性回归方程, 计算(2R,3R)-二氢杨梅素含量。

1.5.5 稳定性试验

取 T01 号样品,按“1.4.3”节的方法制备(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液,室温下保存,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“1.3”节的色谱条件进样分析,记录(2R,3R)-二氢杨梅素峰面积。

1.5.6 加标回收率试验

取已知(2R,3R)-二氢杨梅素含量的 T01 号样品 6 份,每份约 0.1 g,精密称定后,加入样品中 1/2 当量的(2R,3R)-二氢杨梅素对照品,按“1.4.3”节的方法制备(2R,3R)-二氢杨梅素含量测定供试品溶液,按“1.3”节的色谱条件分别进样,计算(2R,3R)-二氢杨梅素加标回收率及相对标准偏差(RSD 值)。

1.6 (2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定的方法学考察

1.6.1 系统适用性考察试验

取 T01 号样品,按“1.4.3”节的方法制备(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定供试品溶液,另取“1.4.2”节下 HB-5 混合对照品溶液,按“1.3”项下的色谱条件分别进样。

1.6.2 线性关系及定量限考察试验

取“1.4.2”节下系列混合对照品溶液,按“1.3”节下色谱条件分别进样,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归分析,同时以信噪比 10:1 确定方法定量限。

1.6.3 精密度试验

取 T01 号样品,按“1.4.3”节的方法制备(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定供试品溶液,按“1.3”节下色谱条件连续进样 6 次,分别记录(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素峰面积。

1.6.4 重复性试验

取 T01 号样品,按“1.4.3”节的方法制备(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定供试品溶液 6 份,按“1.3”节的色谱条件分别进样,记录(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素峰面积,并代入“1.6.2”节的线性回归方程,计算花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量。

1.6.5 稳定性试验

取 T01 号样品,按“1.4.3”节的方法制备(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定

供试品溶液,室温下保存,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“1.3”节的色谱条件进样分析,记录(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素峰面积。

1.6.6 加标回收率试验

取已知花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量的 T01 号样品 6 份,每份约 0.5 g,精密称定后,分别加入样品中 1.0 倍当量的花旗松素、杨梅苷对照品及 2.5 倍当量的杨梅素对照品,按“1.4.3”节下方法制备(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定供试品溶液,按“1.3”节下色谱条件分别进样,计算花旗松素、杨梅苷、杨梅素加标回收率及 RSD 值。

1.7 不同色谱柱重现性考察试验

取(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素对照品适量,精密称定后,以甲醇为溶剂配制成(2R,3R)-二氢杨梅素 80 $\mu\text{g/mL}$ 、花旗松素 20 $\mu\text{g/mL}$ 、杨梅苷 15.9 $\mu\text{g/mL}$ 、杨梅素 10.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,在 Ultimate XB C₁₈、HC C₁₈、Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱条件下,按“1.3”节下色谱条件分别进样,记录(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素色谱峰的保留时间、峰面积、分离度和理论塔板数。

1.8 文献方法对比考察

取 T01 号样品,按本研究及相关文献^[17,23]方法制备供试品溶液并进样分析,计算(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量。

1.9 样品含量测定

取 T02 至 T11 号样品,按“1.4.3”节下方法制备供试品溶液,按“1.3”节下色谱条件分别进样,计算(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量和(2S,3S)-二氢杨梅素的峰面积。

1.10 数据处理

采用 Excel 2010 进行统计分析,运用 Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 (2R,3R)-二氢杨梅素含量测定的方法学考察结果

2.1.1 系统适用性考察结果

由图 1 可知,对照品和供试品溶液中(2R,3R)-

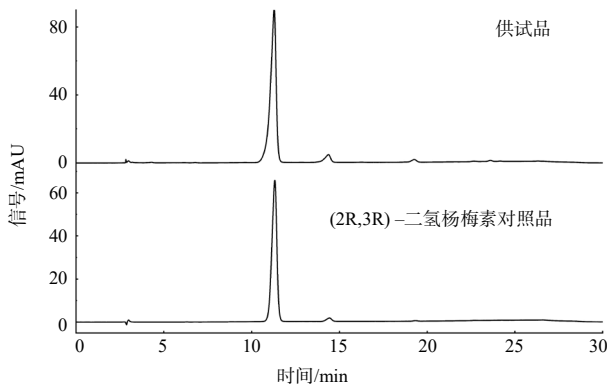


图1 (2R,3R)-二氢杨梅素对照品与供试品液相图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of (2R,3R)-dihydromyricetin standard sample and test sample

二氢杨梅素色谱峰保留时间分别为 11.322、11.284 min, 且色谱峰分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 5 000, 说明系统适用性及专属性良好。

2.1.2 线性关系及定量限考察结果

由表 3 可以看出: (2R,3R)-二氢杨梅素含量的线性回归方程为 $Y=0.5031X+0.6028$, $R^2=0.9992$, 线性范围为 10.60 ~ 106.00 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.47 $\mu\text{g/mL}$, 说明(2R,3R)-二氢杨梅素在线性范围内线性关系良好。

表 3 黄酮类物质含量的线性关系($n=6$)

Table 3 Linear relationship of flavonoids contents($n=6$)

黄酮类物质	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	含量的线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回归方程	R^2
(2R,3R)-二氢杨梅素	0.47	10.60 ~ 106.00	$Y=0.5031X+0.6028$	0.9992
花旗松素	0.30	2.50 ~ 50.00	$Y=0.5904X+0.0720$	0.9991
杨梅苷	0.49	2.65 ~ 53.00	$Y=0.4334X-0.0077$	0.9995
杨梅素	0.32	1.06 ~ 26.50	$Y=0.5077X-0.0207$	0.9988

2.1.3 精密度试验结果

(2R,3R)-二氢杨梅素峰面积的 RSD 值为 0.52%(样品数 $n=6$), 说明仪器精密度高。

2.1.4 重复性试验结果

6 份样品的(2R,3R)-二氢杨梅素含量平均值为 36.41%, RSD 值为 1.06%($n=6$), 说明方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验结果

(2R,3R)-二氢杨梅素峰面积随供试品溶液放置

时间的增加呈缓慢下降趋势, 24、12、8 h 内峰面积 RSD 值分别为 3.62%($n=6$)、2.27%($n=5$)、1.75%($n=4$), 说明供试品溶液室温条件下宜在 8 h 内完成进样分析。

2.1.6 加标回收率试验结果

由表 4 可知, (2R,3R)-二氢杨梅素加标回收率为 96.00% ~ 98.90%, 平均回收率为 97.37%, RSD 值为 1.13%($n=6$), 说明方法准确性良好。

表 4 藤茶中黄酮类物质加标回收率测定结果($n=6$)

Table 4 Determination results of recovery of flavonoids in vine tea($n=6$)

黄酮类物质	样品中的质量/mg	加标量/mg	测得量/mg	加标回收率/%	平均回收率/%	RSD 值/%
(2R,3R)-二氢杨梅素	36.08	18.19	54.07	98.90	97.37	1.13
	36.15	20.52	56.17	97.56		
	36.26	22.53	57.95	96.27		
	36.21	20.76	56.59	98.17		
	36.18	18.36	54.50	97.33		
	36.22	19.27	54.72	96.00		
	36.22	19.27	54.72	96.00		
花旗松素	2.34	2.15	4.47	99.07	97.60	0.98
	2.35	2.20	4.48	96.82		
	2.33	3.03	5.29	97.69		
	2.34	3.09	5.34	97.09		
	2.34	2.35	4.61	96.60		
	2.32	2.42	4.70	98.35		

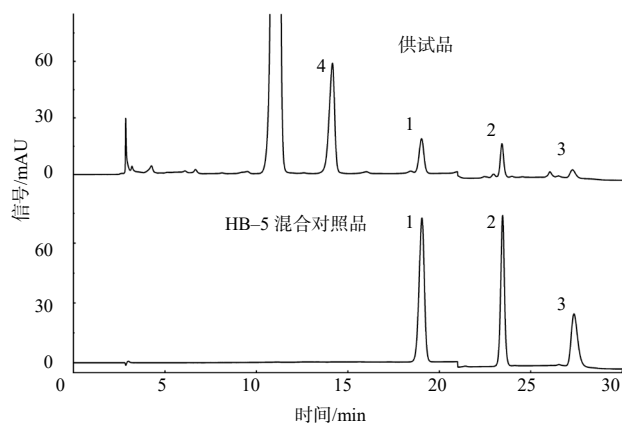
表 4(续)

黄酮类物质	样品中的质量/mg	加标量/mg	测得量/mg	加标回收率/%	平均回收率/%	RSD 值/%
杨梅苷	2.30	2.65	4.94	99.62	97.36	1.50
	2.31	2.62	4.88	98.09		
	2.30	2.47	4.68	96.36		
	2.30	2.49	4.73	97.59		
	2.33	2.38	4.60	95.38		
	2.29	2.42	4.64	97.11		
杨梅素	0.77	2.01	2.77	99.50	98.16	1.28
	0.77	2.02	2.73	97.03		
	0.77	2.14	2.86	97.66		
	0.77	2.19	2.93	98.63		
	0.78	2.06	2.77	96.60		
	0.77	2.11	2.87	99.53		

2.2 (2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量测定的方法学考察结果

2.2.1 系统适用性考察结果

由图 2 可知, HB-5 混合对照品溶液中花旗松素、杨梅苷、杨梅素各色谱峰保留时间分别为 19.052、23.460、27.362 min, 供试品溶液中花旗松素、杨梅苷、杨梅素各色谱峰保留时间分别为 19.032、23.425、27.276 min, 且对照品与供试品溶液各色谱峰分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 20 000, 说明系统适用性及专属性良好。



1 花旗松素; 2 杨梅苷; 3 杨梅素; 4 (2S,3S)-二氢杨梅素。

图 2 混合对照品与供试品液相图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed standard sample and test sample

2.2.2 线性关系及定量限考察结果

由表 3 可以看出花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量的线性范围分别为 2.50 ~ 50.00、2.65 ~ 53.00、1.06 ~ 26.50 $\mu\text{g/mL}$, 定量限分别为 0.30、0.49、0.32 $\mu\text{g/mL}$, 说明花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量在各自线性范

围内线性关系良好。

2.2.3 精密度试验结果

(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素峰面积的 RSD 值分别为 1.88%($n=6$)、0.42%($n=6$)、1.69%($n=6$)、1.24%($n=6$), 说明仪器精密度高。

2.2.4 重复性试验结果

6 份样品的(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积平均值为 26.31 mAU·min, RSD 值为 1.90%($n=6$), 花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量平均值分别为 0.466%、0.459%、0.154%, RSD 值分别为 1.30%($n=6$)、1.94%($n=6$)、1.29%($n=6$), 说明方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验结果

(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积随供试品溶液放置时间的增加呈缓慢上升趋势, 24、12、8、4 h 内峰面积 RSD 值分别为 12.11%($n=6$)、9.88%($n=5$)、7.25%($n=4$)、1.98%($n=3$); 花旗松素 24、12、8、4 h 内峰面积 RSD 值分别为 2.29%($n=6$)、1.78%($n=5$)、1.24%($n=4$)、1.09%($n=3$); 杨梅苷 24、12、8、4 h 内峰面积 RSD 值分别为 2.46%($n=6$)、1.95%($n=5$)、1.72%($n=4$)、0.98%($n=3$); 杨梅素 24、12、8、4 h 内峰面积 RSD 值分别为 2.83%($n=6$)、2.51%($n=5$)、1.92%($n=4$)、0.75%($n=3$)。因此, 若同时测定藤茶样品中(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷和杨梅素含量, 供试品溶液室温条件下宜在 4 h 内完成进样分析。

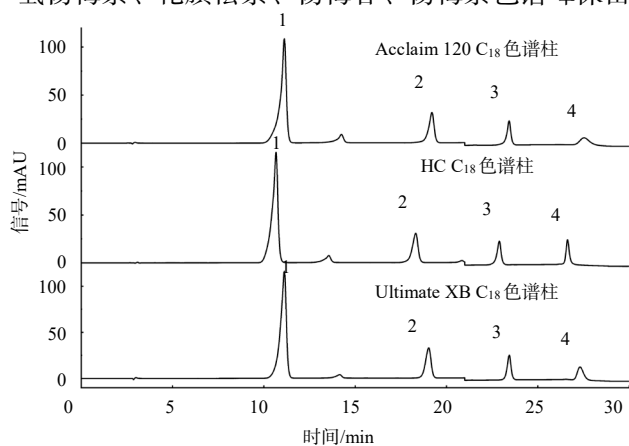
2.2.6 加标回收率试验结果

由表 4 可知, 花旗松素、杨梅苷、杨梅素加标

回收率分别在 96.60%~99.07%、95.38%~99.62%、96.60%~99.53%，平均回收率分别为 97.60%、97.36%、98.16%，RSD 值分别为 0.98%($n=6$)、1.50%($n=6$)、1.28%($n=6$)，说明方法准确性良好。

2.3 不同色谱柱重现性考察结果

由图 3 可知，不同色谱柱条件下，(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素色谱峰保留



1 (2R,3R)-二氢杨梅素; 2 花旗松素; 3 杨梅苷; 4 杨梅素。

图 3 不同 C₁₈ 色谱柱液相图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of different C₁₈ columns

时间略有差异，但各色谱峰分离度均大于 1.5，理论塔板数均大于 5 000，峰面积的 RSD 值分别为 1.16%($n=3$)、0.73%($n=3$)、1.42%($n=3$)、1.38%($n=3$)，说明方法在不同色谱柱条件下重现性良好。

2.4 文献方法对比考察结果

不同方法测得(2R,3R)-二氢杨梅素含量的 RSD 值为 1.55%，花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量的相对平均偏差分别为 0.90%、1.25%、1.33%，说明方法准确性良好。

2.5 样品含量测定结果

由表 5 可知，T02 至 T11 号藤茶样品中(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量分别为 18.61%~34.75%、0.019%~0.546%、0.250%~0.839%、0.083%~0.462%，(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积为 5.59~14.68 mAU·min。

表 5 藤茶样品中黄酮类物质含量测定结果

Table 5 Determination results of flavonoids contents in vine tea

样品编号	(2R,3R)-二氢杨梅素 含量/%	(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积 /(mAU·min)	花旗松素含量/%	杨梅苷含量/%	杨梅素含量/%
T02	30.38	11.17	0.357	0.316	0.330
T03	32.17	9.84	0.273	0.268	0.160
T04	33.21	12.11	0.308	0.357	0.155
T05	33.87	10.03	0.506	0.321	0.258
T06	33.38	13.57	0.342	0.250	0.143
T07	34.75	14.68	0.546	0.347	0.462
T08	32.55	13.91	0.392	0.339	0.221
T09	19.16	5.59	0.025	0.707	0.089
T10	22.29	6.21	0.111	0.836	0.096
T11	18.61	5.79	0.019	0.839	0.083

3 结论

本研究采用 C₁₈ 色谱柱，建立了以甲醇为流动相 A，0.1%磷酸溶液为流动相 B，梯度洗脱 0~15 min，25%~35%A；15~23 min，35%~50%A；23~25 min，50%~25%A；25~30 min，25%A，单波长(290 nm)测定(2R,3R)-二氢杨梅素含量，双波长(290、255 nm)测定花旗松素、杨梅苷、杨梅素含量和(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积的方法，方法系统适用性、线性关

系、重复性、稳定性良好，精密度和加标回收率高，与相关研究^[13,24-25]相比，本方法 5 种黄酮类物质色谱峰分离度均大于 1.5，(2R,3R)-二氢杨梅素色谱峰理论塔板数大于 5 000，(2S,3S)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅苷、杨梅素色谱峰理论塔板数均大于 20 000，且单个样品检测时间为 30 min，低于相关指纹图谱或质量评价研究的色谱运行时间，可为藤茶黄酮类物质的测定提供参考。

研究团队在对藤茶样品进行含量测定时发现，

须茶样品中(2R,3R)-二氢杨梅素、花旗松素、杨梅素含量及(2S,3S)-二氢杨梅素峰面积普遍高于普叶样品的,杨梅苷含量普遍低于普叶样品的,且普叶样品中的花旗松素、杨梅素浓度低于相应对照品的线性范围,同时由于(2S,3S)-二氢杨梅素对照品不易购得,故本研究仅通过比较峰面积对(2S,3S)-二氢杨梅素进行了半定量研究。未来,本团队将扩大样品类型范围,进一步优化普叶样品花旗松素、杨梅素含量测定进样浓度,深入研究(2R,3R)-二氢杨梅素和(2S,3S)-二氢杨梅素之间的转化规律。

参考文献:

- [1] 胡百顺,刘瑶,杜兴媛,等.不同采收期和发育阶段的藤茶品质分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2023,49(3):304-312.
 - [2] QIAN J N, WANG X, CAO J, et al. Dihydromyricetin attenuates D-galactose-induced brain aging of mice via inhibiting oxidative stress and neuroinflammation[J]. Neuroscience Letters, 2021, 756: 135963.
 - [3] WANG Z J, JIANG Q, LI P P, et al. The water extract of *Ampelopsis grossedentata* alleviates oxidative stress and intestinal inflammation[J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 547.
 - [4] LIU C Y, SUN Y Y, WANG S Q, et al. Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* and its derivatives: structural characterization and anti-hepatocellular carcinoma activity[J]. Journal of Molecular Structure, 2022, 1258: 132677.
 - [5] GAO J, SHI N, GUO H J, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics approach to reveal the hepatotoxicity of emodin and detoxification of dihydromyricetin[J]. ACS Omega, 2021, 6(8): 5348-5358.
 - [6] HU Y L, LI M, DING L, et al. *Ampelopsis grossedentata* improves type 2 diabetes mellitus through modulating the gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 107: 105622.
 - [7] 袁桥玉,刘新桥.藤茶中总黄酮的含量测定[J].内蒙古中医药,2014,33(30):126-127.
 - [8] 秦亚茹,张友胜,张凯,等.藤茶总黄酮检测方法的对比研究[J].现代食品科技,2019,35(12):302-309.
 - [9] 雷华平,冯纪南,任名新,等.不同季节的显齿蛇葡萄中二氢杨梅素和总黄酮的含量测定[J].中国野生植物资源,2017,36(1):37-39.
 - [10] 郑琳,高士伟,刘盼盼,等.藤茶中二氢杨梅素的研
- 究[J].湖北农业科学,2020,59(24):133-134.
 - [11] 张学英.显齿蛇葡萄叶代用茶总黄酮以二氢杨梅素计的试验验证[J].湖南农业科学,2021(5):84-90.
 - [12] 陈图锋,高文华,唐敏.高效液相色谱法测定藤茶中二氢杨梅素和杨梅素含量[J].亚太传统医药,2015,11(1):28-30.
 - [13] 冯淳,张妮,周大颖,等.HPLC测定显齿蛇葡萄叶中4种黄酮类化合物的含量[J].食品工业科技,2018,39(24):240-245.
 - [14] 张学英.HPLC法同步测定莓茶中二氢杨梅素、杨梅苷、杨梅素含量[J].湖南农业科学,2021(4):100-104.
 - [15] 杨冰慧,李兵,马金龙,等.药用植物藤茶的研究进展[J].大连民族大学学报,2023,25(3):199-203.
 - [16] 张朝阳,马世龙,秦邦,等.野生藤茶资源的鉴别及指纹图谱评价[J].山东农业大学学报(自然科学版),2022,53(2):188-196.
 - [17] 汪秋兰,王文清,万青,等.基于HPLC-PDA指纹图谱、化学模式识别及多成分定量分析评价藤茶药材的质量[J].中国药师,2021,24(8):558-565.
 - [18] 甘小娜,李廷钊,李波.二氢杨梅素异构体手性分析及其在线抗氧化活性研究[J].分析科学学报,2023,39(1):87-92.
 - [19] 陈科力,姚琪.基于siPLS法建立藤茶中二氢杨梅素近红外定量分析方法[J].中南民族大学学报(自然科学版),2018,37(1):41-45.
 - [20] 黄建华,谢思敏,彭清华,等.基于感官审评与HPLC-DAD法不同月份藤茶质量研究[J].中国野生植物资源,2020,39(4):7-10.
 - [21] 孙睿,付丽,雷雨.不同产地藤茶中二氢杨梅素含量及其与牛蒡子配伍的药效学研究[J].药学实践杂志,2021,39(3):255-258.
 - [22] 陈文生,洪亮,褚洪潮,等.HPLC测定不同方法提取野生藤茶中的二氢杨梅素[J].贵州师范大学学报(自然科学版),2013,31(5):72-75.
 - [23] 陈倩,张雨林,刘赫男,等.藤茶不同部位制茶后功能性成分的含量比较[J].中国现代应用药学,2017,34(11):1542-1545.
 - [24] 石依姗.特色民族药材藤茶质量评价及其袋泡茶工艺研究[D].武汉:华中科技大学,2020.
 - [25] 范莉,侯小龙,王文清,等.指纹图谱结合一测多评模式在藤茶质量评价中的应用研究[J].中草药,2016,47(22):4076-4081.

责任编辑:毛友纯
英文编辑:柳正