

# 不同茶类中黄酮醇苷酸水解条件的优化及 酸水解前后 3 种黄酮醇含量的测定

汪 汇, 温明椿, 姜宗德, 查旻昱, 张 梁\*

(安徽农业大学, 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 230036)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定不同茶类中黄酮醇的含量, 并优化茶叶中黄酮醇苷酸水解成黄酮醇(杨梅素、槲皮素、山柰酚)的条件。**方法** 样品经 70% 甲醇水(V:V)提取后, 用盐酸(16%)-甲醇溶液进行酸水解, 再经乙酸乙酯萃取、浓缩、复溶至相同体积; 酸水解前后的样品溶液均用 HPLC 对黄酮醇进行定量分析并用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对黄酮醇苷进行定性分析。**结果** 3 种黄酮醇在 3.125~100.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内具有良好的线性关系( $r^2 \geq 0.9976$ ), 优化后的方法的重复性、稳定性、精密度较好(相对标准偏差不大于 0.04%)。六大茶类中黄酮醇苷的最佳酸水解条件为: 水解时间为 1 h、水解温度为 80  $^{\circ}\text{C}$ 、盐酸(16%)-甲醇溶液最佳比例为 1:2 (V:V)。**结论** 本研究优化了茶叶中黄酮醇苷酸水解的条件, 并建立 HPLC 测定了六大茶类酸水解前后黄酮醇的含量。该方法处理简单、结果准确可靠, 适用于茶叶中黄酮醇及其苷类物质的分析。

**关键词:** 茶叶; 黄酮醇; 黄酮醇苷; 酸水解; 高效液相色谱法

## Optimization of the acid hydrolysis conditions of flavonoid glycosides in different teas and determination for the content of 3 kinds of flavonols before and after acid hydrolysis

WANG Hui, WEN Ming-Chun, JIANG Zong-De, ZHA Min-Yu, ZHANG Liang\*

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the simultaneous determination of flavonols in different teas by high performance liquid chromatography (HPLC), and optimize the conditions for the hydrolysis of flavonoid glycosides into flavonols (myricetin, quercetin and kaempferol). **Methods** The sample was extracted with 70% methanol water (V:V), acid hydrolyzed with hydrochloric acid (16%)-methanol solution, and then extracted, concentrated and redissolved with ethyl acetate to the same volume; the sample solutions before and after acid hydrolysis were quantitatively analyzed by HPLC, and the flavonoid glycosides were qualitatively analyzed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results** Three kinds of flavonols had good linear relationships ( $r^2 \geq 0.9976$ ) within the concentration range of 3.125–100.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the repeatability, stability and precision of the optimized method were good (the relative standard deviations were no

\*通信作者: 张梁, 博士, 教授, 主要研究方向为茶叶品质化学。E-mail: zhli2091@sina.com

\*Corresponding author: ZHANG Liang, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230026, China. E-mail: zhli2091@sina.com

more than 0.04%). The optimum acid hydrolysis conditions of flavonoid glycosides in 6 kinds of teas were as follows: Hydrolysis time was 1 h, hydrolysis temperature was 80 °C, hydrochloric acid (16%)-methanol solution was 1:2 (V:V). **Conclusion** In this study, the conditions of acid hydrolysis of flavonoid glycosides in tea were optimized, and HPLC was established to determine the content of flavonol before and after acid hydrolysis of 6 kinds of tea. The method is simple, accurate and reliable, and is suitable for the analysis of flavonol and its glycosides in tea.

**KEY WORDS:** tea; flavonols; flavonoid glycosides; acid hydrolysis; high performance liquid chromatography

## 0 引 言

茶起源于中国的云贵高原, 因其健康效益(降糖、降脂、抗氧化等)及独特的口感盛行于全世界, 且与可可、咖啡并列为世界三大无酒精饮料<sup>[1-2]</sup>。按照加工方式及发酵程度的差异可以分为六大茶类: 绿茶(非发酵茶)、白茶和黄茶(轻发酵茶)、乌龙茶(半发酵茶)、红茶(全发酵茶)、黑茶(后发酵茶)。多酚类化合物是茶叶中主要的次生代谢产物, 包括儿茶素类、黄酮及黄酮苷类、花青素和花白素类、酚酸和缩酚酸类, 其中黄酮类化合物在茶叶中多以其苷类物质的形式存在<sup>[3-4]</sup>。

黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一类黄色色素, 其基本结构是 2-苯基色原酮, 现在则泛指两个具有酚羟基的苯环(A 环和 B 环)通过中央三碳原子相互连接而成的一系列化合物<sup>[5-6]</sup>。2004 年, HOFMANN 等<sup>[7]</sup>通过分子感官科学的研究发现茶叶中含有黄酮类物质, 特别是黄酮醇苷类物质是一类涩味阈值极低, 且对于红茶涩味贡献较大的多酚类物质。同年, SCHARBERT 等<sup>[8]</sup>研究发现, 黄酮醇苷物质是红茶的主要涩味来源, 且黄酮醇苷物质还对咖啡因的苦涩味有增强作用。2001 年, 杨伟丽<sup>[9]</sup>发现随着加工过程的进行, 炒青绿茶浸出物中黄酮醇苷类物质的含量显著下降, 苦涩味也显著降低, 一定程度上证明了黄酮类化合物是绿茶中的苦涩味物质之一。然而, 鲜有系统性地研究六大茶类中的黄酮苷类化合物。在目前的研究中, 对茶叶中黄酮醇苷类物质的定量分析一般用三氯化铝比色法<sup>[10]</sup>, 其原理是黄酮醇苷类物质与三氯化铝可以发生反应生成黄色络合物, 在 420 nm 处测得其吸光度后与标准曲线对比即可对茶叶中黄酮醇苷类物质进行定量分析, 这种方法由于其方便、快捷的特性而被广泛使用, 但比色法并不能有效区分黄酮、黄酮醇和异黄酮等, 而其他常用的检测方法也存在着因黄酮醇苷类物质种类多但标准品少导致的难以准确定量的问题。在这种背景下, 通过酸性条件将黄酮醇苷类物质水解, 对相应的黄酮醇进行定性和定量分析间接地对黄酮醇苷类物质进行分析, 很快成为新的研究方向。何丽梅等<sup>[11]</sup>通过正交实验法优化了样品的水解条件, 利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)有效分离了芦丁、杨梅素、槲皮素和山柰酚。林佳媛等<sup>[12]</sup>建立了银杏叶提取物注射液中异鼠李糖等黄酮醇

苷和总黄酮醇苷的 HPLC 测定方法, 优化了黄酮醇苷类化合物酸水解条件。本研究结合前人的研究, 通过单因素实验探究了茶叶中黄酮醇苷类物质酸水解成黄酮醇的影响因素<sup>[13-15]</sup>; 优化了茶叶中黄酮醇苷类物质的酸水解条件; 建立了 HPLC 测定茶叶中黄酮醇物质含量的分析方法, 并测定了六大茶类中酸水解前后的黄酮醇含量。此外, 还通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析了茶叶中主要的黄酮醇苷类物质, 以期对茶叶涩味物质的分析和风味研究提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

样品来源及相关信息详见表 1。

表 1 茶叶样品信息  
Table 1 Information of tea samples

茶样	茶样来源
凤凰单枞	广东省潮州市饶平县潮乡茶叶加工厂
祁红	安徽省祁雅茶业有限责任公司
宁红	江西省宁红集团有限公司
六堡茶	梧州中茶茶业有限公司
铁观音	福建八马茶业有限公司
宜红	五峰土家族自治县渔洋关竹青茶厂
政和白茶	福建政和县春绽东和茗茶厂
特级白牡丹	福建省德化县春绽东和茗茶厂
六安瓜片	安徽省徽六有限公司
霍山黄芽	安徽省抱儿钟秀茶业股份有限公司
泾渭茯砖	咸阳泾渭茯茶有限公司
碧螺春	苏州东山茶厂股份有限公司
庐山云雾	江西公和厚茶业有限公司
普洱	云南大益茶业集团-勐海茶厂
大红袍	福建武夷山王信记茶业有限公司
白毫银针	福建省安溪县好如誉生物科技有限公司
蒙顶黄芽	四川蒙顶山茶业有限公司
君山银针	湖南省君山银针茶业股份有限公司

山柰酚、槲皮素、杨梅素(纯度均>98%, 上海源叶有限公司); 甲醇、甲酸、乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 磷酸(色谱纯)、浓盐酸、乙酸乙酯(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 蒸馏水(香港屈臣氏集团)。

## 1.2 仪器与设备

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪、Agilent Infinity 1290 UPLC-G6545 四级杆-飞行时间质谱仪(美国 Agilent 科技有限公司); IKA<sup>®</sup>A11 basic 分析研磨机(德国 IKA 集团); ML204 万分之一电子天平(美国 Mettler Toledo 公司); EYELA N-1100 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社); JK-5200B 超声波清洗器(合肥金尼克机械制造有限公司); Sorvall LYNX 4000 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 科技公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品前处理

称取 1.000 g 干茶粉(200 目), 置于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 70%甲醇水(V:V), 涡旋混匀后常温(25 °C)超声提取 20 min, 之后常温下 8000 r/min 离心 10 min。上清液置于 10 mL 容量瓶中, 重复上述操作。合并 2 次上清液, 用 70%甲醇水(V:V)定容。

### 1.3.2 黄酮醇苷定性分析实验

#### (1) 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC shield RP-18 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 278 nm; 进样体积 3 μL。A 相为水+0.1%甲酸, B 相为乙腈, 梯度洗脱条件见表 2。

表 2 梯度洗脱条件  
Table 2 Gradient elution conditions

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	95	5
5	85	15
8	70	30
13	70	30
23	12	88
28	5	95
30	5	95
33	95	5
35	95	5

#### (2) 质谱条件

电喷雾离子源, 负离子模式检测。扫描速度 2.00 sec, 干燥气温度 320 °C, 干燥气流速 8 L/min, 喷雾电压 3500 V, 喷雾气压力 35 V, 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 11 L/min, 鞘气、辅气、碰撞气均为高纯氮气, 离子扫描范围为

100~1500 *m/z*。

### 1.3.3 茶样中黄酮醇苷的酸水解实验

考察了茶叶提取液酸水解过程中温度、水解时间及盐酸(16%)-甲醇比例对黄酮醇苷酸水解程度的影响, 相关因素及水平见表 3。具体酸水解流程如下: 取上述茶样提取液 2 mL 置于 50 mL 具塞玻璃试管中, 加入不同比例的盐酸(16%)-甲醇溶液共 3 mL, 充分混匀后于不同温度下水浴若干小时。待样品冷却至室温后, 减压浓缩。之后加入 10 mL 纯水复溶, 再加入等量乙酸乙酯萃取 3 次, 合并所有乙酸乙酯层并减压浓缩。最后加入 70%甲醇溶液(V:V)复溶并且定容至 5 mL。HPLC 分析前, 用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤, 收集滤液待用。

表 3 茶样提取液的酸水解的因素与水平  
Table 3 Factors and levels of acid hydrolysis for tea extract

水平	A 水解时间/h	B 水解温度/°C	C 盐酸(16%)-甲醇比例(V:V)
1	3	70	1:2
2	2	80	2:1
3	1	90	3:0

### 1.3.4 茶叶酸水解前后黄酮醇的 HPLC 分析实验

#### (1) 色谱条件

参考文献<sup>[16-17]</sup>并优化液相检测条件为: 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-Aq C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1%磷酸水(V:V), B 为甲醇; 进样体积 5 μL; 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 370 nm; 洗脱梯度(优化后)如下: 0~3 min, 40% B; 3~8 min, 40%~60% B; 8~20 min, 60%~80% B; 20~25 min, 80%~40% B; 25~30 min, 40% B。

#### (2) 杨梅素、槲皮素及山柰酚标准曲线的建立

准确称取杨梅素、槲皮素及山柰酚各 1.000 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 70%甲醇溶液(V:V)溶解并定容, 作为混合标准溶液。将上述混合标准溶液梯度稀释至 50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 μg/mL, 依据上述液相色谱条件进行分析。

#### (3) 方法学验证

##### ① 重复性实验

称取 6 份黄大茶茶样各 1.000 g, 采用 1.3.1 方法制备供试品溶液, 按 1.3.4 液相色谱条件进样分析, 测定茶样酸水解后黄酮醇的含量, 并计算相应的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)值。

##### ② 加标回收率实验

根据黄大茶酸水解后黄酮醇的含量, 加入黄酮醇含量的 1/2、1、3/2 倍的标准品, 按照 1.3.3 中的方法进行酸水解, 并且按照 1.3.4 的液相色谱方法进行定量分析。计算加标回收率, 计算公式如式(1):

加标回收率(%)=(加入标样后的含量-未加标的含量)/未加标的含量×100% (1)

## 2 结果与分析

### 2.1 茶叶中黄酮醇及其苷类化合物的鉴定

黄酮醇及其苷类化合物是茶叶中重要的活性物质,干茶中黄酮醇苷的含量大约为 5 mg/g, 其中槲皮素-3-*O*-云香糖苷含量最高, 槲皮素-鼠李糖-葡萄糖苷次之。本研究利用 UPLC-MS/MS 鉴定了干茶(黄大茶为代表样)中的黄酮醇及其苷类化合物, 在干茶中测得几种以槲皮素、山柰酚、杨梅素为苷元的单糖、二糖及三糖苷, 结果如表 4 所示。依据前人的研究报道<sup>[18-19]</sup>, 茶叶中还存在以这 3 种黄酮醇为苷元的四糖苷。茶叶中主要黄酮苷类物质的苷元是杨梅素、槲皮素和山柰酚, 因此本研究通过酸水解的方式, 将茶叶中的黄酮醇苷水解后利用 HPLC 测定 3 种黄酮醇的含

量, 以此测定各黄酮醇的苷类化合物的总量。

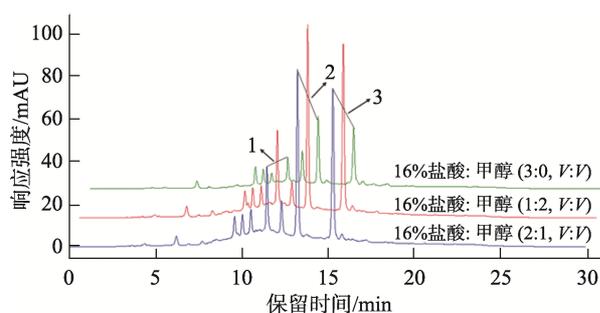
### 2.2 酸水解条件的优化

#### 2.2.1 盐酸(16%)-甲醇比例对茶叶中黄酮醇苷酸水解的影响

研究报道<sup>[20-22]</sup>发现盐酸及甲醇浓度均会影响黄酮苷的水解程度。本研究综合考虑了盐酸及甲醇浓度对黄酮醇苷水解的影响, 配制了不同比例的盐酸(16%)-甲醇体系, 以此考察黄酮醇苷酸水解的程度。结果如图 1 所示, 在相同的水解时间(3 h)和温度(90 °C)下, 盐酸(16%)与甲醇比例为 3:0 (V:V)时, 测得的 3 种黄酮醇含量最低, 而逐渐增加甲醇的比例能够促进水解的程度。当盐酸(16%)与甲醇比例为 1:2 (V:V)时, 水解后的茶叶提取液中黄酮醇含量最高。这些结果表明, 黄酮醇苷酸水解需要在甲醇含量较高的体系中进行, 最终选择盐酸(16%)与甲醇的比例为 1:2 (V:V)。

表 4 黄酮醇及其苷类物质的分析结果  
Table 4 Analysis results of flavonols and its glycosides

化合物名称	保留时间/min	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	碰撞能量/V
山柰酚-葡萄糖/半乳糖苷	7.72、7.89	447	284.03、255.03	30
槲皮素-葡萄糖/半乳糖苷	7.32	463	300.02、301.03	25
杨梅素-3- <i>O</i> -半乳糖苷	6.57、6.67	479	316.02	25
山柰酚-3- <i>O</i> -云香糖苷	7.68	593	284.03、285.04	35
芦丁	7.18	609	300.02	35
杨梅素-鼠李糖-葡萄糖/半乳糖苷	6.50	625	316.02	40
山柰酚-葡萄糖-鼠李糖-半乳糖苷	7.13、7.40	755	285.04	40
槲皮素-葡萄糖-鼠李糖-半乳糖苷	6.80、7.03	771	300.00	50
杨梅素	8.50	317	178.99、164.00	35
槲皮素	9.90	301	149.02、109.03	25
山柰酚	13.10	285	93.03、159.04	40



注: 1. 杨梅素; 2. 槲皮素; 3. 山柰酚; 下同。

图 1 盐酸(16%)-甲醇对黄酮醇苷酸水解的影响

Fig.1 Effects of hydrochloric acid (16%)-methanol on the acid hydrolysis of flavonoid glycosides

#### 2.2.2 水解时间对茶叶中黄酮醇苷酸水解的影响

本研究设置了 3 个酸水解的时间(1、2、3 h), 结果如图 2 所示, 在相同的盐酸(16%)-甲醇体系(1:2, V:V)和相同水解温度(90 °C)下, 茶叶提取液经若干个小时酸水解后, 黄酮醇的含量并没有随着水解时间的延长而增加, 反而较短的水解时间有利于黄酮醇苷的水解。这些结果表明, 水解时间对黄酮醇苷的水解程度影响较小, 最终确定水解时间为 1 h。

#### 2.1.3 水解温度对茶叶中黄酮醇苷酸水解的影响

本研究还考察了水解温度(70、80、90 °C)对黄酮醇苷酸水解的影响, 结果如图 3 所示, 在相同的盐酸(16%)-甲醇体系(1:2, V:V)和相同水解时间(1 h)下, 茶叶提取液在不同温度下进行酸水解, 黄酮醇苷的水解程度差异较大。黄酮醇

苷的水解程度也不是随着温度的增加而增加, 70 °C下, 茶叶中黄酮醇苷的水解程度最低, 表现为水解后溶液中的黄酮醇含量最低, 当将温度提高至 90 °C时, 溶液中黄酮醇的含量反而较 80 °C的低, 因此最终选择 80 °C作为水解温度。

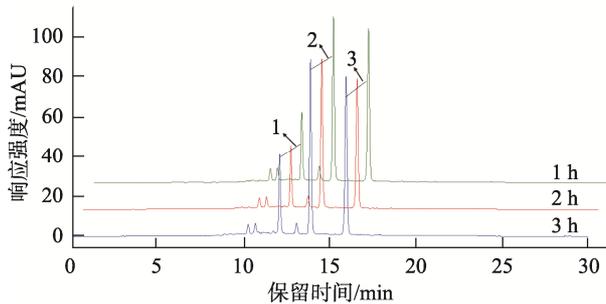


图 2 不同水解时间对黄酮醇苷酸水解的影响

Fig.2 Effects of different hydrolysis times on the acid hydrolysis of flavonoid glycosides

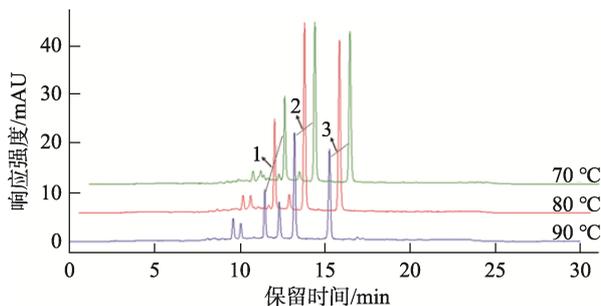


图 3 不同水解温度对黄酮醇苷酸水解的影响

Fig.3 Effects of different hydrolysis temperatures on the acid hydrolysis of flavonoid glycosides

以上结果表明茶叶中黄酮醇苷的酸水解主要受水解温度及盐酸-甲醇的比例的影响, 水解时间的影响较小。茶叶中黄酮醇苷酸水解的最优条件为: 盐酸(16%):甲醇=1:2 (V:V), 水解温度 80 °C, 水解时间 1 h。本研究基于此条件, 对六大茶类进行了酸水解, 建立并优化了 HPLC 测定茶叶酸水解前后黄酮醇含量的分析方法。

### 2.3 茶叶酸水解前后黄酮醇的 HPLC 检测方法

#### 2.3.1 液相色谱条件的优化

如图 4 所示, 3 种黄酮醇在磷酸体系中能达到基线分离, 且在 17 min 之前全部出峰, 分析时间短。相比于其他 2 个黄酮醇, 杨梅素在 B 环中具有连三羟基结构, 在反相体系中早于其他 2 个黄酮醇出峰, 其次是槲皮素, 因为其具有 B 环上的连二羟基结构。

#### 2.3.2 高效液相色谱法的方法学论证

本研究对建立的液相色谱分析方法进行了方法学论证。3 种黄酮醇的线性方程如表 5 所示, 在 3.125~100.000  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 3 种黄酮醇具有良好的线性关系, 三者线性方程的相关系数( $r^2$ )均大于 0.9976。

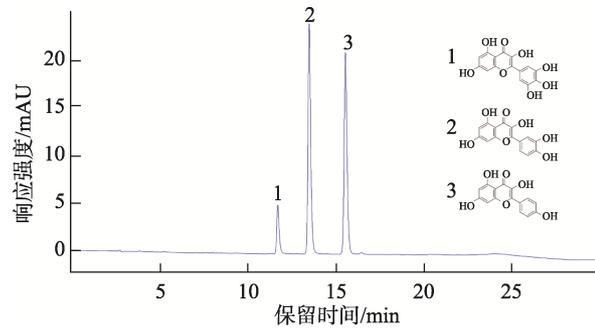


图 4 3 种黄酮醇标准品的液相色谱图

Fig.4 Chromatograms of 3 kinds of flavonol standards

表 5 3 种黄酮醇的线性方程

Table 5 Linear equations of 3 kinds of flavonols

成分	线性方程
杨梅素	$Y=13.099X-55.869$
槲皮素	$Y=17.142X-58.509$
山柰酚	$Y=19.957X-66.400$

本研究在 3 个浓度水平考察了 3 种黄酮醇的加标回收率。依据茶叶水解后 3 种黄酮醇的含量, 在茶叶样品中加入低(1/2), 中(1), 高(3/2) 3 个浓度的标准品, 经酸水解后进 HPLC 分析。结果如表 6 所示, 3 种黄酮醇的加标回收率在 72.6%~100.0%之间, 且 RSDs 在 0.00~0.04%之间, 表明该方法具有良好的回收率及重复性。本研究还对酸水解方法的可重复性进行了考察, 结果表明茶叶经 6 次重复酸水解, 3 种黄酮醇含量的 RSDs 均在 0.024%~0.029%之间, 酸水解方法重复性良好。

表 6 加标回收率实验

Table 6 Standard addition recovery experiment

成分	添加浓度/ $\mu\text{g/mL}$	平均回收率/%	RSDs/%
杨梅素	0.83	97.2	0.03
	1.25	97.5	0.00
	2.50	95.9	0.00
槲皮素	1.57	100.0	0.03
	2.35	98.0	0.00
	4.70	94.3	0.00
山柰酚	1.53	81.2	0.04
	2.30	77.7	0.00
	4.60	72.6	0.00

### 2.4 六大茶类酸水解前后的黄酮醇含量测定

依据已建立的黄酮醇 HPLC 定量方法以及优化后的黄

黄酮醇苷酸水解方法, 本研究测定了六大茶类(每一类各 3 种茶)酸水解前后黄酮醇的含量。结果如表 7 所示, 六大茶类中游离的黄酮醇(即水解前)含量相近而杨梅素的含量较其他 2 种黄酮醇的含量高, 18 个茶样中杨梅素的含量在  $(116.6\pm 0.4)\sim(262.2\pm 0.8)$   $\mu\text{g/g}$  之间而槲皮素和山柰酚的含量分别在  $(87.1\pm 0.0)\sim(307.0\pm 0.9)$ 、 $(87.2\pm 0.2)\sim(147.0\pm 0.6)$   $\mu\text{g/g}$  之间。茶叶经酸水解后黄酮醇含量明显增加, 18 个茶样酸水解后杨梅素、槲皮素及山柰酚的含量分别在  $(149.1\pm 0.4)\sim(925.3\pm 10.3)$ 、 $(170.0\pm 0.3)\sim(1368\pm 1.0)$ 、 $(188.9\pm 0.2)\sim(1500.4\pm 3.8)$   $\mu\text{g/g}$  之间。由 18 个茶样酸水解前后 3 种黄酮醇含量差异可知, 水解后槲皮素及山柰酚含量明显增加, 较杨梅素的含量高, 表明六大茶类中以槲皮素和山柰酚为苷元的苷类物质占比较杨梅素的高。六大茶类中, 绿茶和乌龙茶黄酮醇苷含量较高, 其中多为槲皮素和山柰酚类的黄酮醇苷。

### 3 结论与讨论

本研究探究了茶叶中黄酮醇苷类物质酸水解的影响因素[水解时间、温度及盐酸(16%)-甲醇比例], 发现盐酸

(16%)-甲醇比例及水解温度对黄酮醇苷类物质的水解程度影响较大, 最佳的酸水解条件为: 水解温度  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、水解时间 1 h、盐酸(16%)-甲醇的比例为 1:2 (V:V)。本研究还建立并优化了 HPLC 对 3 种黄酮醇(杨梅素、槲皮素和山柰酚)的分析方法, 并且通过优化后的 HPLC 及酸水解的方法对六大茶类(共 18 个茶样)中的黄酮醇进行了分析, 定量结果表明六大茶类中游离的黄酮醇含量相近, 其中杨梅素含量较高; 水解前后含量差异对比结果表明六大茶类中黄酮醇苷类物质多以槲皮素和山柰酚为基础苷元, 其中绿茶和乌龙茶黄酮醇苷含量高于其他茶类(水解前后黄酮醇含量差异大)。

本研究建立了一种 HPLC 分析茶叶中黄酮醇苷物质的前处理方法—酸水解法, 以间接的方式测定了六大茶类中黄酮醇苷物质的组成, 该方法为茶叶中黄酮醇苷类物质的解析提供了新思路。但是该方法也存在一些不足之处, 如只能定量以杨梅素、槲皮素和山柰酚为苷元的一类黄酮醇苷的总量, 无法具体测定单一黄酮醇苷的含量。可能继续优化酸水解的条件能够控制不同黄酮醇苷的水解顺序及水解程度, 从而达到精准测定单一黄酮醇苷的含量的目的。

表 7 不同茶叶酸水解前后 3 种黄酮醇的含量  
Table 7 Content of 3 kinds of flavonols in different teas before and after acid hydrolysis

茶样类型	茶样名称	杨梅素/ $(\mu\text{g/g})$		槲皮素/ $(\mu\text{g/g})$		山柰酚/ $(\mu\text{g/g})$	
		水解前	水解后	水解前	水解后	水解前	水解后
绿茶	碧螺春	197.6 $\pm$ 0.1	634.7 $\pm$ 1.3	90.0 $\pm$ 0.1	1095.2 $\pm$ 2.4	90.7 $\pm$ 0.2	1500.4 $\pm$ 3.8
	庐山云雾	246.3 $\pm$ 0.1	609.6 $\pm$ 12.3	100.9 $\pm$ 0.2	943.1 $\pm$ 2.1	91.9 $\pm$ 0.1	1197.1 $\pm$ 2.9
	六安瓜片	242.0 $\pm$ 0.4	925.3 $\pm$ 10.3	108.1 $\pm$ 0.5	1502.7 $\pm$ 5.0	88.7 $\pm$ 0.1	1126.5 $\pm$ 2.1
白茶	白牡丹	140.6 $\pm$ 0.3	244.0 $\pm$ 0.3	88.5 $\pm$ 1.0	433.6 $\pm$ 0.8	88.4 $\pm$ 0.8	514.7 $\pm$ 1.1
	白毫银针	116.6 $\pm$ 0.4	210.3 $\pm$ 11.1	87.9 $\pm$ 0.3	170.0 $\pm$ 0.3	87.2 $\pm$ 0.2	200.6 $\pm$ 0.4
	政和白茶	123.9 $\pm$ 0.3	195.0 $\pm$ 0.2	87.1 $\pm$ 0.0	286.1 $\pm$ 0.3	86.0 $\pm$ 0.3	350.1 $\pm$ 0.5
黄茶	蒙顶黄芽	262.0 $\pm$ 0.8	267.0 $\pm$ 0.4	115.4 $\pm$ 1.5	302.9 $\pm$ 3.0	99.0 $\pm$ 0.2	1029.3 $\pm$ 2.2
	君山银针	145.5 $\pm$ 0.3	239.6 $\pm$ 0.1	88.3 $\pm$ 0.2	371.2 $\pm$ 3.2	88.5 $\pm$ 0.5	702.1 $\pm$ 0.5
	霍山黄芽	190.0 $\pm$ 0.0	403.7 $\pm$ 0.9	87.9 $\pm$ 0.1	500.6 $\pm$ 1.2	94.6 $\pm$ 0.3	824.0 $\pm$ 2.3
乌龙茶	大红袍	168.0 $\pm$ 0.1	265.6 $\pm$ 0.3	119.7 $\pm$ 0.3	644.3 $\pm$ 2.0	99.1 $\pm$ 0.3	408.2 $\pm$ 1.0
	凤凰单枞	164.6 $\pm$ 2.2	534.5 $\pm$ 12.5	93.0 $\pm$ 0.2	696.9 $\pm$ 9.7	89.8 $\pm$ 0.4	1431.1 $\pm$ 6.0
	铁观音	142.4 $\pm$ 0.4	784.2 $\pm$ 0.1	100.7 $\pm$ 0.2	1368.0 $\pm$ 1.0	87.4 $\pm$ 0.1	598.7 $\pm$ 0.5
红茶	祁红	155.3 $\pm$ 0.2	182.7 $\pm$ 1.6	95.1 $\pm$ 0.8	456.8 $\pm$ 6.8	102.3 $\pm$ 0.9	867.5 $\pm$ 14.8
	宜红	233.7 $\pm$ 1.2	441.3 $\pm$ 8.8	96.5 $\pm$ 0.3	1069.0 $\pm$ 8.8	107.9 $\pm$ 0.6	853.0 $\pm$ 6.7
	宁红	153.8 $\pm$ 0.2	209.0 $\pm$ 0.6	93.5 $\pm$ 0.1	803.3 $\pm$ 2.0	96.2 $\pm$ 1.3	1107.2 $\pm$ 2.9
黑茶	泾渭茯砖	214.0 $\pm$ 0.6	382.2 $\pm$ 27.9	307.0 $\pm$ 0.9	1052.2 $\pm$ 10.6	147.0 $\pm$ 0.6	434.1 $\pm$ 1.4
	六堡茶	128.1 $\pm$ 0.1	149.1 $\pm$ 0.4	90.6 $\pm$ 0.3	275.2 $\pm$ 0.3	84.6 $\pm$ 0.2	188.9 $\pm$ 0.2
	普洱	173.6 $\pm$ 0.0	234.4 $\pm$ 0.9	245.9 $\pm$ 0.6	526.9 $\pm$ 1.1	130.4 $\pm$ 1.3	264.2 $\pm$ 1.0

## 参考文献

- [1] 刘莉. 浅谈茶叶主要功效成分及其生物活性[J]. 南方农业, 2018, 12(24): 132-133, 141.  
LIU L. Discussion on the main functional components of tea and their biological activities [J]. Southern Agric, 2018, 12(24): 132-133, 141.
- [2] 孟晓娟, 陈宇. 茶叶中营养成分和药效成分研究[J]. 福建茶叶, 2020, 42(11): 27-28.  
MENG XJ, CHEN Y. Study on nutrient and pharmacodynamic constituents of tea [J]. Fujian Tea, 2020, 42(11): 27-28.
- [3] 宛晓春. 茶叶生物化学(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.  
WAN XC. Tea Biochemistry (Third Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003.
- [4] 郭莹莹, 刘庆静, 杨光, 等. 茶、红茶菌与人类健康[J]. 现代食品, 2021, (10): 119-123, 128.  
GUO YY, LIU QJ, YANG G, et al. Tea, kombucha fungi and human health [J]. Mod Food, 2021, (10): 119-123, 128.
- [5] LIU J, LI CC, DING GJ, et al. Artificial intelligence assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from *Rosa sterilis* [J]. Molecules, 2021, 26(13): 3835.
- [6] 刘海燕, 曹藩荣. 茶叶中黄酮类化合物对肠道的保护作用的研究概况[J]. 广东茶业, 2021, (3): 2-7.  
LIU H, CAO FR. The protective effect of flavonoids in tea on intestinal tract: A review [J]. Guangdong Tea, 2021, (3): 2-7.
- [7] SCHARBERT S, JEZUSSEK M, HOFMANN T. Evaluation of the taste contribution of theaflavins in black tea infusions using the taste activity concept [J]. Eur Food Res Technol, 2004, 218(5): 442-447.
- [8] SCARBERT S, HOLZMANN N, HOFMANN T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(11): 3498-3508.
- [9] 杨伟丽. 主要生化成分与炒青绿茶滋味形成的关系[J]. 中国茶叶加工, 2001, (1): 32-33.  
YANG WL. Relationship between main biochemical components and taste formation of fried green tea [J]. Chin Tea Process, 2001, (1): 32-33.
- [10] 龙跃, 寇娟, 程素霞, 等. 三氯化铝比色法测定中草药雀儿舌头中总黄酮研究[J]. 郑州大学学报(工学版), 2010. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6833.2010.04.029  
LONG Y, KOU X, CHENG SX, et al. Determination of total flavonoids in the tongue of Chinese herbal finch by aluminum trichloride colorimetric method [J]. J Zhengzhou Univ (Eng Sci Ed), 2010. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6833.2010.04.029
- [11] 何丽梅, 郑德勇, 叶乃兴, 等. 白茶黄酮醇类物质的 HPLC 测定及水解工艺优化[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2014, 43(6): 579-584.  
HE LM, ZHENG DY, YE NX, et al. Determination of flavonols in white tea by HPLC and optimization of hydrolysis process [J]. J Fujian Agric Fore (Nat Sci Ed), 2014, 43(6): 579-584.
- [12] 林佳媛, 张鹏, 蔡卫民, 等. 银杏叶提取物注射液中槲皮素、山柰酚、异鼠李素及总黄酮醇苷的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2012, (12): 1016-1019.  
LIN JY, ZHANG P, CAI WM, et al. Determination of quercetin, kaempferol, isorhamnetin and their total flavonol glycosides in *Ginkgo biloba* extract injection by HPLC [J]. Chin J Pharm, 2012, (12): 1016-1019.
- [13] 朱博, 夏涛, 高丽萍, 等. 绿茶茶汤中黄酮醇及其苷类的测定方法以及对茶汤色度的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 146-150.  
ZHU B, XIA T, GAO LP, et al. Study on the determination of flavonols and its glycosides and their effects on the color of green tea infusion [J]. Food Ferment Ind, 2009, 35(2): 146-150.
- [14] 吴春燕, 须海荣, Julien Héritier, 等. 不同茶树品种中黄酮醇苷含量的测定[J]. 茶叶科学, 2012, 32(2): 122-128.  
WU CY, XU HR, JULIEN H, et al. Determination of the flavonol glycosides in various tea cultivars [J]. J Tea Sci, 2012, 32(2): 122-128.
- [15] FANG ZT, YANG WT, LI CY, et al. Accumulation pattern of catechins and flavonol glycosides in different varieties and cultivars of tea plant in China [J]. J Food Compos Anal, 2021, 97: 103772.
- [16] 卢邦俊, 范必威, 甄云鹏, 等. 高效液相色谱法测定中国茶中的黄酮醇[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 160-164.  
LU BJ, FAN BW, ZHEN YP, et al. Determination of flavonols in Chinese tea by high performance liquid chromatography [J]. Nat Prov Res Dev, 2006, 18(6): 160-164.
- [17] WANG HF, KEITH H. Determination of flavonols in green and black leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography [J]. Food Res Int, 2001, 34: 223-227.
- [18] ZHANG L, HO CT, ZHOU J et al. Chemistry and biological activities of processed *Camellia sinensis* teas: A comprehensive review [J]. Comp Rev Food Sci Food Saf, 2019, 18(5): 1474-1495.
- [19] 张梁, 陈琪, 宛晓春, 等. 中国茶叶生物化学研究 40 年[J]. 中国茶叶, 2019, 41(9): 1-10.  
ZHANG L, CHEN Q, WAN XC et al. 40 years of tea biochemistry research in China [J]. J Chin Tea, 2019, 41(9): 1-10.
- [20] 迪里木拉提·毛里明, 郭玉娟, 程煜凤, 等. HPLC 法测定新疆阿尔泰锦鸡儿根、茎、叶、花中 3 种黄酮类化合物的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(10): 1346-1348, 1353.  
DILIMURATI MLM, GUO YJ, CHENG YF, et al. Content determination of three flavonoids in roots, stems, leaves and flowers of *Caragana altaica* Kom. Pojark by HPLC method [J]. J Xinjiang Med Univ, 2017, 40(10): 1346-1348, 1353.
- [21] HU J, ZHAO YN, MA C, et al. Acid hydrolytic method for determination of Ginkgo Biloba total flavonoids in rat plasma by HPLC for pharmacokinetic studies [J]. Tsinghua Sci Technol, 2010, 15(4): 452-459.
- [22] BARDAKCI H, ACAR ET, KIRMIZI BEKMEZ H. Simultaneous quantification of six flavonoids in four *Scutellaria taxa* by HPLC-DAD method [J]. Rev Bras Farmacogn, 2019, 29(1): 17-23.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

## 作者简介



汪 汇, 硕士研究生, 主要研究方向为茶叶滋味化学。

E-mail: wangh98@yeah.net



张 梁, 博士, 教授, 主要研究方向为茶叶品质化学。

E-mail: zhli2091@sina.com