

国家标准  
《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液  
相色谱法》

编  
制  
说  
明

起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所

二〇二二年二月

# 目录

1.标准制定背景及任务来源 .....	3
1.1 标准制定背景 .....	3
1.2 任务来源 .....	4
<b>2.工作概况.....</b>	<b>5</b>
2.1 起草单位和主要起草人 .....	5
2.2 起草单位情况 .....	5
2.3 验证单位.....	6
<b>2.4 主要起草过程.....</b>	<b>7</b>
2.4.1 资料收集 .....	7
2.4.2 收集典型样品，确定目标物质范围.....	7
2.4.3 实验验证.....	8
2.4.4 标准起草过程 .....	8
<b>3.标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....</b>	<b>9</b>
3.1 标准编制原则 .....	9
3.1.1 科学性 .....	9
3.1.2 先进性 .....	9
3.1.3. 适用性 .....	9
3.1.4 通用性 .....	9
3.2 主要技术内容确定的依据.....	10
3.2.1 标准主要内容 .....	10
3.3 方法研究报告.....	10
3.3.1 样品制备 .....	10
3.3.2 样品提取 .....	10
3.3.3 超声提取条件优化.....	11
3.3.4 色谱分离条件优化.....	14
3.3.5 方法学验证 .....	15
<b>3.3.6 实际样品的测定 .....</b>	<b>30</b>
3.3.7 对本标准方法的基本评价.....	30
<b>4. 采用国际标准.....</b>	<b>31</b>
<b>5. 与现行法律法规和强制性标准的关系 .....</b>	<b>31</b>
<b>6. 重大分歧意见的处理经过和依据 .....</b>	<b>31</b>
<b>7. 标准作为强制性或推荐性标准发布的意见 .....</b>	<b>31</b>
<b>8. 贯彻标准的要求和措施建议 .....</b>	<b>31</b>
<b>9. 废止现行有关标准的建议 .....</b>	<b>31</b>
<b>10 主要参考文献.....</b>	<b>31</b>

# 1.标准制定背景及任务来源

## 1.1 标准制定背景

木薯(*Manihot esculenta* Crantz, Cassava) 属热带和亚热带的块根作物,与甘薯、马铃薯并称之为世界三大薯类,且木薯有“淀粉之王”和“能源作物”之美誉。据统计(FAO, 2020), 2020 年世界木薯的产量达到了 3.04 亿吨,木薯种植主要是为了获取其根茎部分,而地上部分的木薯秆和木薯叶很少利用;统计数据表明,全世界每年木薯茎秆和木薯叶产量约是 2.0 亿吨,20%左右茎秆用做种茎繁殖,其他种茎和叶片都被丢弃。这不仅浪费资源,且对环境造成严重污染。

木薯叶中含有丰富的黄酮类化合物,该物质是自然界药用植物中主要的抗氧化活性成分之一,同时具有抗过敏、抗炎症和抗癌性能等<sup>[1]</sup>。木薯叶中黄酮类化合物以黄酮醇类物质为主,黄酮醇类是指含有 2-羟基-3-氧(或含氧取代)苯并-γ-吡喃酮(2-羟基-3-氧-色原酮)类化合物,是各类黄酮化合物中数量最多、分布最广泛的一类,已发现约有 1700 多种,常以不同的苷类稳定存在。大量的研究证明,黄酮醇类化合物具有消除氧自由基、调节血脂、抗肿瘤、抗病毒等生理活性。木薯叶具有丰富的蛋白和类胡萝卜素,经捣烂煮熟后不仅可以作为蔬菜食用,还可以治疗膀胱炎,并且孕妇和哺乳期的妇女都可以食用,因此推测木薯叶的药效与其活性物质有关<sup>[2]</sup>。目前为止,在木薯叶中发现了 8 种黄酮醇化合物,分别是芦丁、烟花苷、槲皮素、山奈酚、杨梅苷、金丝桃苷、刺槐苷、水仙苷<sup>[3]</sup>。项目承担单位在研究过程中发现,木薯叶中主要含有芦丁、烟花苷、杨梅苷、水仙苷、槲皮素和山奈酚 6 种黄酮醇,芦丁和烟花苷两种黄酮醇占总量的 90%左右,其他 4 种黄酮醇较少,其中槲皮素和山奈酚在鲜叶中检测不到,其 4 种主要的黄酮醇化学结构式见图 2。但不同的木薯品种、不同的生育期和种植环境,木薯叶片中黄酮醇类物质组成和含量差异较大<sup>[4, 5]</sup>。因此,获得高含量稳定的黄酮类物质是木薯叶片提高利用价值的重要途径。因此,制定木薯叶中黄酮醇类物质的检测方法,可为木薯叶的利用及质量评价提供检测依据,对提高木薯的附加值具有重要的意义。

目前,已有的国内关于黄酮类物质的检测标准,产品主要涉及有枸杞、茶叶、葡萄酒、大豆、柑橘、荞麦及其制品等。黄酮类化合物的测定有很多种方法,对于黄酮类化合物的相互分离以及单一成分的定量分析,常采用高效液相色谱法,

而对于总黄酮的测定，常采用分光光度比色法<sup>[6]</sup>。发布的现行有效的标准主要有《粮油检验 大豆异黄酮含量测定 高效液相色谱法》（GB/T26625-2011）、《保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法》（GB/T23788-2009）、《蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法》（GB/T20574-2006）、《饲料添加剂 4、7-二羟基异黄酮》（GB/T25174-2010）以及进出口检验标准《出口食品中总黄酮的测定》（SNT4592-2016）等。关于木薯叶片中总黄酮和黄酮醇化合物的检测方法国内外标准尚是空白。

HPLC 可以快速对植物成分中化合物进行定性定量，灵敏度高，是植物成分分析的常用设备之一，并且已有很多研究报道，高效液相色谱法可以同时测定多种黄酮类物质<sup>[4, 7, 8]</sup>，为了使黄酮醇的测定方法具有广泛适应性，我们选择高效液相色谱法测定木薯鲜叶和木薯叶粉中的 4 种黄酮醇。

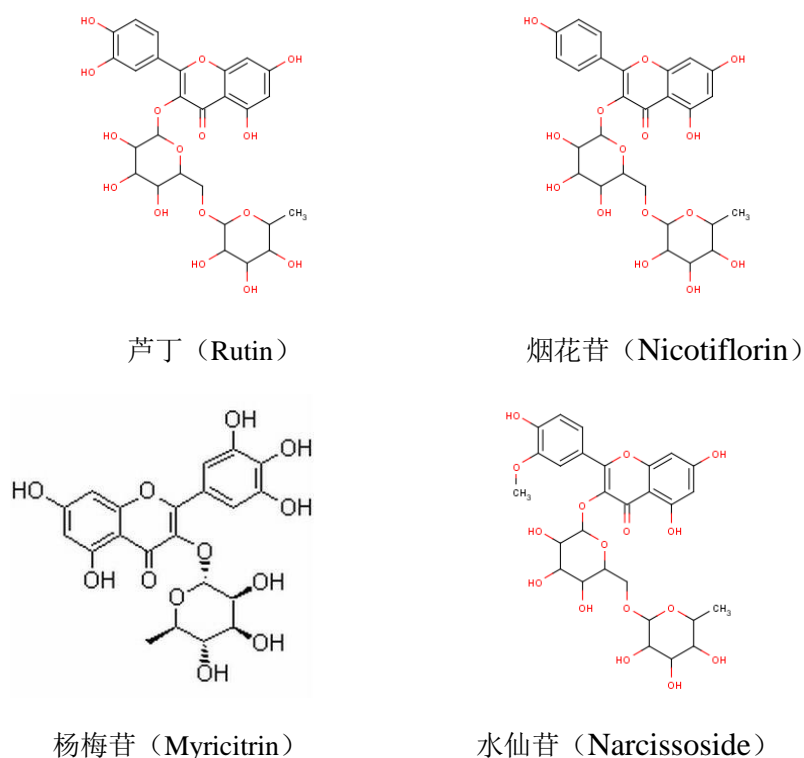


图 1 4 种黄酮醇结构式

## 1.2 任务来源

本标准列入国家标准化委员会《关于下达 2021 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2021〕23 号），立项项目名称

为《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法》（计划号：20213496-T-424）。

## 2.工作概况

### 2.1 起草单位和主要起草人

本标准由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所、浙江省农业科学研究院、中国标准化研究院等单位共同起草。

本标准主要起草人：王琴飞、张振文、孙彩霞、杨丽、李开棉、陆柏益、林立铭、余厚美、陆小静、韦卓文、吴若娜。

### 2.2 起草单位情况

#### 起草单位 1：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所（简称“品资所”）隶属农业农村部，单位类型为公益二类事业单位。主要承担热带、南亚热带作物应用基础研究、应用研究和重大关键技术研究；热带作物种质资源收集、保存、鉴定、评价与创新利用；热带农业科技成果转化和技术集成、示范与推广；热带作物种植业有关标准和技术规范制定；热带、南亚热带农业国际合作与交流；热带牧草、热带畜牧健康养殖的科研与示范等职责。业务范围主要有：热带作物种质资源研究，农业资源与环境利用研究，栽培与耕作学研究，畜牧学研究，植物新品种保护测试，相关技术开发与专业培训。截止目前，“品资所”已承担农业行业标准项目 75 项，制定农业行业标准 68 项，其中包括种子种苗、审定规范、技术规程、操作规范、测试指南等方面。

#### 起草单位 2：浙江省农业科学研究院

浙江省农业科学院是浙江省人民政府直属的公益性农业综合研究机构。创建于 1908 年，全院设有畜牧兽医、作物与核技术利用、植物保护与微生物、农村发展、农产品质量与安全营养等 18 个研究所。建有“省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室(筹)”、“观赏作物资源开发国家地方联合工程研究中心(浙江)”等 2 个国家级平台；“农业农村部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心(杭州)”等 19 个部级平台。主要承担着浙江省农业

应用基础研究、高新技术应用及开发研究和科技兴农服务。业务范围：主要开展农业农村领域的应用基础研究，涵盖作物、蔬菜、蚕桑、果树、茶叶、水产、畜牧等农业传统技术领域的育种和种植（养殖）技术研究，以及农产品质量安全、农业农村标准化、农业农村发展规划、环境保护与土壤等领域研究。建有国家水稻区域标准化服务与推广平台、浙江省标准信息与质量安全公共科技创新服务平台、浙江省技术标准研究创新基地等平台。

### **起草单位 3：中国标准化研究院**

中国标准化研究院隶属于国家市场监督管理总局，是开展基础性、通用性、综合性标准化科研和服务的社会公益类科研机构。中国标准化研究院围绕支撑国家经济社会高质量发展，重点开展标准化发展战略、基础理论、原理方法和标准体系研究。开展相关领域的标准制修订和宣贯工作。承担相关领域的标准化科学实验研究、验证、测试评价、开发及其科研成果推广应用。承担相关领域的全国专业标准化技术委员会、分技术委员会秘书处工作。承担标准文献资源建设与社会化服务工作。还支撑国家市场监督管理总局以及国家标准化管理委员会的相关管理职能，包括我国缺陷产品召回管理、国家标准评估、工业品质量安全监管、产品质量国家监督抽查等工作。业务范围包括资源环境标准化研究、质量标准化研究、农业食品标准化研究、服务标准化研究、理论战略标准化研究、基础标准化研究、公共安全标准化研究、工业产品质量标准化研究、标准化评估研究、政府管理创新标准化研究、国家标准馆等。

## **2.3 验证单位**

农业农村部农产品质量监督检验测试中心（北京）、浙江大学农生环测试中心、农业农村部农产品质量监督检验测试中心（海口）、绿城农科检测技术有限公司、农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）共 5 家单位参与方法验证试验。

## 2.4 主要起草过程

### 2.4.1 资料收集

标准起草组查阅了国内外黄酮类物质检测方法的有关标准、论文等资料，包括联合国粮农组织(FAO)、世界卫生组织(WHO)、食品法典委员会(CAC)等相关规定及标准，我国的农业标准和国家标准等资料。

### 2.4.2 收集典型样品，确定目标物质范围

为确保标准的广泛适用性，我们对不同的基因型、不同的木薯品种进行了广谱性分析调查，叶片利用以木薯鲜叶和木薯叶粉为主；通过 30 个不同类型不同来源的木薯种质资源中黄酮醇含量的分析表明（表 1），木薯叶片中主要的黄酮醇类物质有芦丁、烟花苷、杨梅苷和水仙苷，槲皮素和山奈酚少量或检测不到，不同采收时期和品种间含量差异较大，因此，我们后期选择芦丁、烟花苷、杨梅苷、水仙苷 4 种黄酮醇为目标检测物，选择嫩叶其黄酮含量较稳定时采集样品，并利用含量相对居中的品种‘华南 9 号’叶片作为本检测分析方法的验证材料。

表 1 30 份木薯种质资源叶片中黄酮醇含量

序号	品种名称	黄酮醇含量 (mg/kg)					
		杨梅苷	芦丁	烟花苷	水仙苷	槲皮素	山奈酚
1	华南 5 号	670.79	15799.60	4913.83	483.45	75.29	70.22
2	华南 6 号	111.72	13674.71	3889.25	379.51	40.05	42.75
3	华南 7 号	453.64	17581.92	7087.55	647.59	38.73	46.13
4	华南 8 号	529.38	14179.54	5035.76	353.69	123.08	88.62
5	华南 9 号	475.31	14950.34	5424.36	394.23	39.45	0.00
6	华南 10 号	496.32	15956.29	6630.42	755.21	42.58	46.66
7	华南 11 号	702.13	22621.23	10012.55	745.57	-	-
8	华南 12 号	574.54	16363.92	4877.86	302.39	71.77	-
9	华南 13 号	444.75	15449.94	7541.21	343.14	35.07	48.47
10	华南 14 号	596.46	19374.16	4704.04	600.96	-	-
11	华南 124 号	279.94	16425.70	8476.34	574.96	64.53	70.03
12	华南 6068 号	87.29	9592.83	8765.69	419.05	-	-
13	华南 205 号	257.67	12791.47	7507.72	370.18	-	31.07
14	卷叶木薯	319.68	15748.58	8010.26	543.45	-	-
15	印尼细叶	661.14	13606.06	5952.32	289.85	46.16	53.85
16	紫叶木薯	461.05	21527.09	5449.74	546.87	51.26	-
17	花叶木薯	292.00	16927.98	8376.80	698.10	52.73	-
18	野生木薯	98.55	14104.12	1412.20	403.16	35.74	-
19	KU50	901.32	14724.48	3430.14	490.82	-	-

20	南植 199	337.52	14230.59	4282.52	262.07	53.33	59.19
21	桂热 4 号	94.25	7501.44	5656.92	239.81	-	49.17
22	GR891	144.46	12294.78	3714.16	348.33	47.05	56.78
23	GR911	526.32	14928.06	6083.62	321.21	-	-
24	CM483-2	820.81	19482.04	9366.48	287.27	-	-
25	桂热 5 号	847.97	16147.68	6482.84	312.54	-	-
26	野生橡胶木薯	43.43	17088.68	1477.60	396.13	-	-
27	糖木薯	800.13	18087.22	4568.16	200.88	-	-
28	汇丰 60	676.93	16094.86	7325.75	307.48	5.10	-
29	巴西 6 号	23.80	17908.20	3226.12	206.04	-	-
30	巴西 5 号	206.92	16578.22	7353.02	235.36	-	-

注：“-”表示未检测到。

### 2.4.3 实验验证

在查阅了大量国内外相关文献资料和综合调研结果的基础上，确立了《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法》国家标准制定的实验方案，包括前处理条件的优化、色谱条件的优化等，并对方法的系统适应性、基质效应、线性范围、检出限和定量限、准确度、精密度、溶液稳定性等进行了研究，选择木薯鲜叶和木薯叶粉典型样品进行了实验室之间的比对试验。

### 2.4.4 标准起草过程

起草单位 2018 年共同申请立项了国家重点研发计划《农业清洁与循环生产共性技术标准研究》课题五《粮油、果蔬等农产品加工废弃物资源化利用技术及标准研究》（2018YFF0213505）。

2018 年以来，起草单位围绕木薯副产物的饲料化利用和高值化利用开展了系列研究，项目研究内容木薯嫩茎叶饲料化利用技术申报了相关的行业标准。2020 年，在前期研究的基础上，标准起草单位对木薯叶片的高值化技术进行整合，为了准确评价木薯叶副产物黄酮醇类物质的含量，根据国家申报的要求，依据 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分：试验方法标准》所规定的内容和格式，编写完成了《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法》标准草案。

2021 年 8 月-2022 年 2 月，根据 GB/T27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》、GB/T35655-2017《化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 色谱分析方法》与 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度 第 2 部分 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》的规定并参考相关文献，



由农业农村部农产品质量监督检验测试中心（北京）、浙江大学农生环测试中心、农业农村部农产品质量监督检验测试中心（海口）、绿城农科检测技术有限公司、农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）5家实验室对方法的技术参数进行了相关实验、验证和评价。并根据5家实验室的验证结果进行统计分析，编写完成了《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法》标准征求意见稿。

### 3.标准编制原则和主要技术内容确定的依据

#### 3.1 标准编制原则

本标准的制定过程中遵循了以下几项原则：

##### 3.1.1 科学性

在检测方法的选择、技术指标的确定、结果分析判断等方面首先确保科学，在标准适用范围规定的界限内力求完整，在标准文本编制过程中力求做到技术内容的表述科学准确、清晰易懂。

##### 3.1.2 先进性

对标准中有关内容的确定，严格遵循国家有关方针、政策和法规，严格执行强制性国家标准的要求，力求反映本研究领域的国内外先进技术及标准的发展现状与趋势，既体现目前稳定可靠的最新研究成果，又能为未来技术发展提供框架，使标准中所规定的技术内容有利于提高检测结果的准确性和可重复性。

##### 3.1.3. 适用性

在标准方法操作程序的设计、试剂和仪器设备需求方面，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，确保标准的内容便于实施，并且易于被其他标准和文件引用。

##### 3.1.4 通用性

在标准的制定过程中与同体系标准及相关的各种基础标准以及配套使用的取样、试剂规格等标准相衔接，严格按《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1）、《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》（GB/T 1.2）进行编写，遵循了协调统一性原则。

## 3.2 主要技术内容确定的依据

### 3.2.1 标准主要内容

为确保标准制定过程中能严格符合以上四项编制原则，起草工作组成员先后查询、收集、整理了国内外有关农产品中黄酮类化合物含量测定相关技术、方法和标准。目前黄酮类化合物含量测定常用方法为色谱法，如分光光度法、高效液相色谱（HPLC），液质串联质谱法（HPLC-MS/MS）等。其中，高效液相色谱是目前黄酮醇类化合物定量分析的常用方法，具有稳定性好和灵敏度高特点。由此，确定了标准文本主要内容包括范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂和材料、仪器、操作步骤和结果分析与表述 8 个部分。标准的主要技术内容包括样品前处理，木薯鲜叶和木薯叶粉中黄酮醇的提取和 HPLC-UVD/DAD 方法检测等几个方面。其中需要确定的是提取方式和检测方法，需要优化的是提取过程中的溶剂选择、提取料液比，提取时间、提取温度、色谱检测条件等相关参数。

## 3.3 方法研究报告

### 3.3.1 样品制备

木薯叶片采集后分成 2 份，（1）鲜叶样品：液氮速冻后研磨成粉状，密封保存于-40℃冰箱；（2）叶粉样品：鲜叶采集后放入 60℃烘箱中烘干 24h，磨成粉末后，过 0.20 mm 筛，密封保存于 4℃冰箱。

### 3.3.2 样品提取

常用的黄酮醇提取方法有直接浸提法和超声波辅助提取法<sup>[3, 4, 7]</sup>。直接浸提法耗时长、效率低，超声波辅助提取能够加快提取速率、提高提取得率。超声波辅助提取是利用超声波特殊的机械效应、空化效应和热效应，通过增大介质分子的运动速度、增大介质的穿透力以提取生物有效成分。超声波辅助提取法提取天然活性物质有着提取率高、速度快且不改变有效成分等优点。本标准在制定过程中，使用超声波辅助提取法对样品进行提取，参考了 Chahyadi 等（2020）的提取方法并加以改进。同时，在对提取溶液进行选择的过程中，发现 50%的乙醇可以对杨梅苷、芦丁和烟花苷等苷类黄酮醇有效的提取，并获得好的提取效果，因此，我们选择 50%乙醇提取 4 种黄酮醇，具体如下：

**(1) 木薯鲜叶提取：**取木薯新鲜叶置于研钵中，加入液氮研磨至粉末，准确称取木薯鲜叶粉末 0.2g（精确至 0.0001g）于 15.0 mL 离心管中，加入 50 % 的乙醇 8.0 mL，旋涡振荡混匀，超声提取 60 min（50℃，4 kHz），待样品冷却后混匀，样品离心 10 min（10000r/min，25 ℃）；上清液转移至干净的 10mL 容量瓶中，残渣再加入 2.0 mL50 % 的乙醇溶液，旋涡振荡混匀，样品离心 5 min（10000r/min，25 ℃），合并两次离心的上清液，加入 50 % 的乙醇定容至 10.0mL，混匀即为待测液，取 1mL 混合的待测液，通过 0.22 $\mu$  m 微孔滤膜，供高效液相色谱仪测定。

**(2) 木薯叶粉提取：**准确称取木薯叶粉末 0.2g（精确至 0.0001g）于 15mL 离心管中，加入 50 % 的乙醇 8.0 mL，旋涡振荡混匀，超声提取 60 min（50℃，4 kHz），待样品冷却后，样品离心 10 min（10000r/min，25 ℃）；上清液转移至干净的 10ml 容量瓶，残渣再加入 2.0mL50 % 的乙醇溶液，旋涡振荡混匀，样品离心 5 min（10000r/min，25 ℃），合并两次离心的上清液，加入 50 % 的乙醇定容至 10.0mL，混匀即为待测液，取 1mL 混合的待测液，通过 0.22 $\mu$  m 微孔滤膜，供高效液相色谱仪测定。

### 3.3.3 超声提取条件优化

前期实验和文献证明[5, 7]，超声提取是黄酮类物质提取最佳方法，并且提取溶剂的比例、料液比、超声温度和时间都对提取效果有影响，因此对 4 个因素进行了优化。并以 4 种黄酮醇总含量来评价优化结果。

#### 3.3.3.1 乙醇比例的优化

通过6个梯度的乙醇比例提取，发现40%-60%的乙醇比较适合木薯叶黄酮醇类物质的提取，黄酮总含量没有显著差异，木薯鲜叶和叶粉最高含量分别达到 5832.5mg/kg和14641.7mg/kg。但高浓度的乙醇比例不适合单个杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷的提取，因木薯叶中90%以上为芦丁和烟花苷，因此，在提取的时候考虑主成分的影响，选择50%进行后续的提取优化实验。

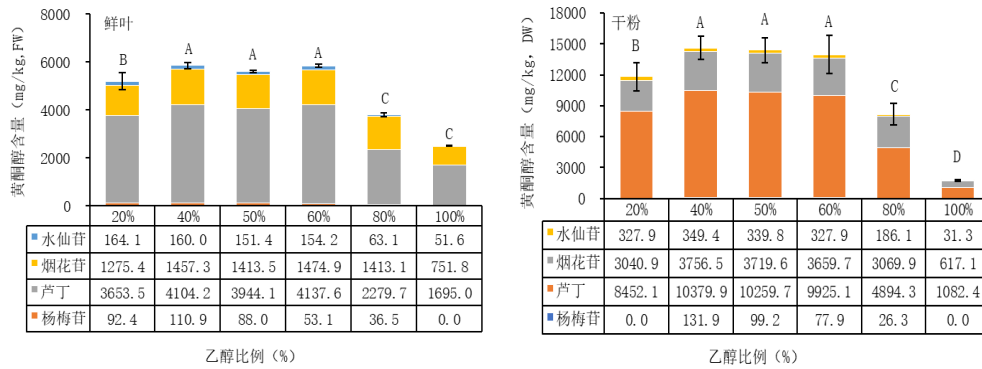


图2 乙醇比例对木薯叶片黄酮醇提取效果的影响

注：①n=3，②采用最小显著差数法（LSD）法进行多重比较，图上的不同大写字母分别表示在  $p < 0.01$  的水平上差异极显著，下同。

### 3.3.3.2 料液比的优化

料液比影响黄酮的提取效率，通过比较发现木薯鲜叶的料液比已 1:30，木薯叶粉以 1:70 最优，总黄酮含量分别为 6657.3 mg/kg 和 14930.4 mg/kg，但鲜叶中 1:30 与 1:50 和 1:70 未达到显著性；叶粉中 1:30 和 1:50 提取含量也未达到显著性差异，因此，根据实验结果，我们选择料液比为 1:50 提取木薯鲜叶和叶粉中黄酮醇。

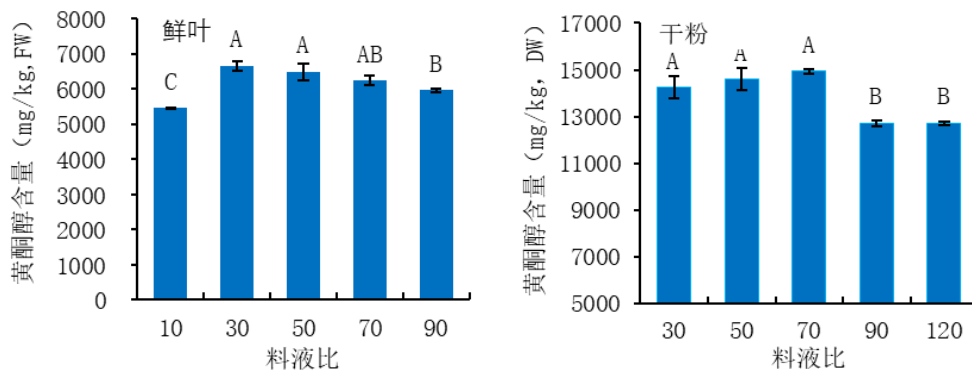


图3 料液比对木薯叶总黄酮含量提取效果的影响

### 3.3.3.3 超声提取时间的优化

通过 10min~120min 提取时间的比较发现，在超声提取时间分别为 10min~120min 条件下，木薯鲜叶和木薯叶粉黄酮提取总量差异不显著，提取效率最高为超声 60min 和 90min，总黄酮含量分别为 5655.2mg/kg 和 13726.6mg/kg，但超声提取时间对提取效果酶显著影响。在木薯鲜叶中，提取时间越长，总黄酮含量有降低趋势，但未达到显著水平。因此，后续采用超声 60min 提取木薯叶中黄酮

物质。

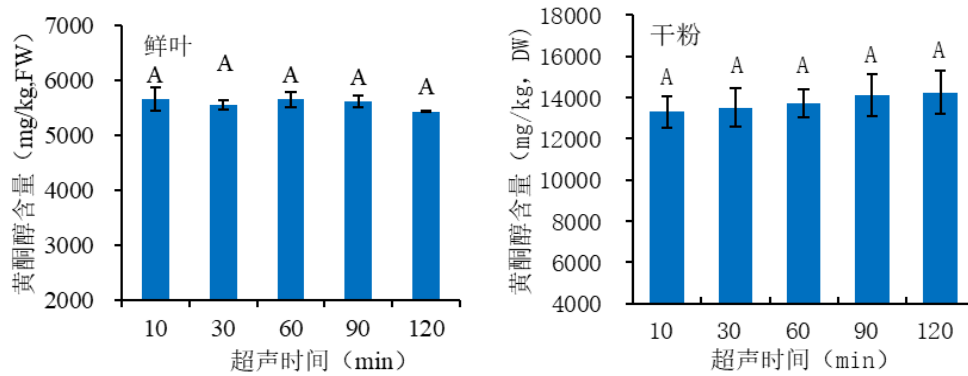


图4 不同超声时间对黄酮醇提取效果的影响

### 3.3.3.4 超声提取温度的优化

通过超声提取温度 30~70℃条件下分析发现，木薯鲜叶和木薯叶粉黄酮提取总量差异不显著，提取效率最高为 50℃，总黄酮含量分别为 5745.5mg/kg 和 14995.4 mg/kg。在木薯叶中，提取温度越高，总黄酮含量有降低趋势，但未达到显著水平。因此，后续采用超声 50℃提取木薯叶中黄酮物质。

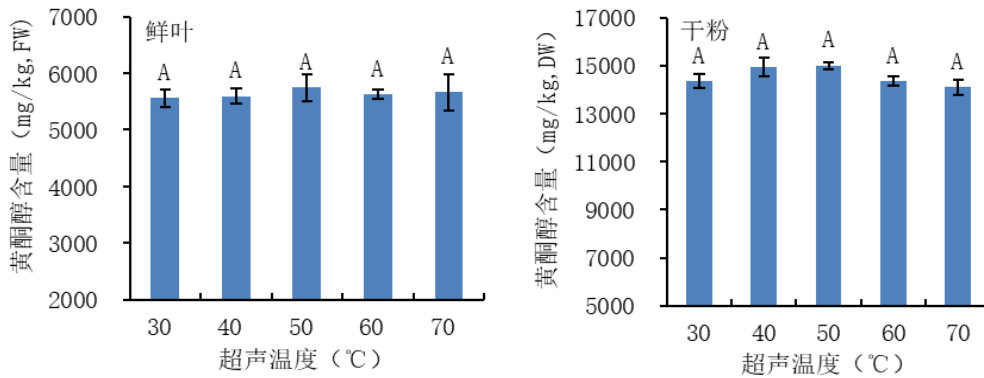


图5 超声提取温度对木薯叶总黄酮含量提取效果的影响

根据提取方法优化实验结果，确定了木薯鲜叶的提取条件为 50%乙醇，料液比为 1:50 (v/v)，超声提取时间为 60min，超声温度为 50℃；木薯叶粉的提取条件为 50%乙醇，料液比为 1:50 (v/v)，超声提取时间为 60min，超声温度为 50℃。

### 3.3.4 色谱分离条件优化

#### 3.3.4.1 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 种黄酮醇物质在此波长范围内有两个特征吸收高峰, 最大吸收峰见表 2, 为同时检测 4 个黄酮醇物质, 选择几个物质相近的 360 nm 为检测波长。

#### 3.3.4.2 流动相的选择及梯度优化

为了获得 4 个物质的最佳分离效果, 在文献报道基础上<sup>[14]</sup>, 实验对流动相比例和磷酸水溶液的酸度进行调节。结果表明, 利用 0.2% 的磷酸水溶液进行样品的分析, 芦丁和烟花苷在样品中出峰不拖尾, 峰形较好。如图 4 所示, 水仙苷、芦丁、烟花苷和水仙苷的保留时间分别为 11.629min、13.776min、15.828min 和 16.243min, 加标样品中 4 种黄酮醇物质出峰时间与标准样品一致。调整流动相梯度使分离效果最优, 优化后的梯度见表 1。色谱参考条件如下:

- a) Eclipse XDB C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5μ m) 或性能相当的色谱柱;
- b) 流动相: 甲醇和 0.2 % 磷酸水, 按表 5 的规定进行梯度洗脱;
- c) 流速: 0.8 mL/min;
- d) 检测波长:360 nm;
- e) 进样量:10 μ L;
- f) 柱温: 40 °C。

表1 流动相及梯度洗脱参考条件

时间/min	甲醇/%	0.2%磷酸水溶液/%
0	25	75
15	58	42
20	80	20
25	100	0
27	25	75
32	25	75

表2 4种黄酮醇保留时间、紫外最大吸收波长

序号	组分名称	保留时间/min	最大吸收波长/nm
1	杨梅苷	11.629	256、358
2	芦丁	13.776	256、356
3	烟花苷	15.826	266、350
4	水仙苷	16.243	254、356

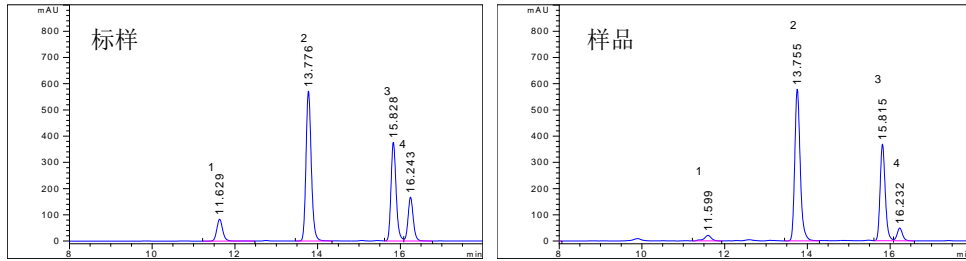


图5 4种黄酮醇高效液相色谱图

### 3.3.5 方法学验证

#### 3.3.5.1 线性方程

(1) 杨梅苷标准储备溶液：准确称取杨梅苷标准样品 10.0mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液，在 -18℃ 下密封保存，有效期 6 个月。

(2) 芦丁标准储备溶液：准确称取芦丁标准样品 60.0mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 6.0 mg/mL 标准储备液，在 -18℃ 下密封保存，有效期 6 个月。

(3) 烟花苷标准储备溶液：准确称取烟花苷标准样品 30.0mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 3.0 mg/mL 标准储备液，在 -18℃ 下密封保存，有效期 6 个月。

(4) 水仙苷标准储备溶液：准确称取水仙苷标准样品 10.0mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液，在 -18℃ 下密封保存，有效期 6 个月。

(7) 标准中间工作溶液：分别移取 1.0mL 的杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷标准储备溶液于 10mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至 10.0mL，获得杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷浓度分别为 100 $\mu$  g/mL、600 $\mu$  g/mL、300 $\mu$  g/mL、100 $\mu$  g/mL、100 $\mu$  g/mL、100 $\mu$  g/mL 标准中间工作溶液，在 -18℃ 下密封保存，有效期 6 个月。

(8) 混合标准工作液：准确吸取一定体积的混合标准中间液，逐渐稀释，配制成芦丁浓度为 1.5  $\mu$  g/mL, 15  $\mu$  g/mL, 30 $\mu$  g/mL, 150  $\mu$  g/mL, 300  $\mu$  g/mL 和 600  $\mu$  g/mL, 烟花苷浓度为 0.75 $\mu$  g/mL, 1.5  $\mu$  g/mL, 7.5 $\mu$  g/mL, 15  $\mu$  g/mL, 75  $\mu$  g/mL, 150 $\mu$  g/mL 和 300  $\mu$  g/mL, 杨梅苷和水仙苷浓度分别为

0.25 $\mu$  g/mL, 2.5  $\mu$  g/mL, 5 $\mu$  g/mL, 25 $\mu$  g/mL, 50 $\mu$  g/mL 和 100 $\mu$  g/mL 的混合标准工作液。标准系列溶液于 4℃ 保存, 有效期 7 天。

以不同梯度的标准样品检测峰面积为纵坐标, 对照溶液的浓度为横坐标, 由峰面积(Y)对溶液浓度(X)线性回归, 得回归方程, 得出相关系数、斜率和截距。试验结果见表 4。由 4 种黄酮醇的回归方程及相关系数  $R^2$  可以得出: 杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷在表 3 的浓度范围内呈现良好的线性关系,  $R^2$  均大于 0.999。

表 3 标准曲线浓度表

序号	化合物	浓度梯度 (mg/L)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	杨梅苷	0.20	0.25	2.5	5	25	50	100
2	芦丁	0.15	1.5	15	30	150	300	600
3	烟花苷	0.15	0.75	7.5	15	75	150	300
4	水仙苷	0.15	0.25	2.5	5	25	50	100

### 3.3.5.2 灵敏度

空白试料按相同的步骤处理后, 测定结果表明: 在相应的保留时间, 空白试料对所测物质无干扰。

检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ): 分别以信噪比  $S/N > 3$  和信噪比  $S/N > 10$  为检出限和定量限, 得到各化合物的检出限和定量限如表 4 所示。

表 4 4 种黄酮醇的回归方程及灵敏度

组分名称	回归方程	$R^2$	线性范围 (mg/L)	LOD(mg/L)	LOQ(mg/L)
杨梅苷	$y = 15.188x - 3.8410$	0.9999	0.20 ~ 100.0	0.07	0.20
芦丁	$y = 15.576x + 13.8990$	0.9999	0.15 ~ 600.0	0.05	0.15
烟花苷	$y = 19.848x - 3.6170$	0.9999	0.15 ~ 300.0	0.05	0.15
水仙苷	$y = 26.890x - 6.4917$	0.9998	0.15 ~ 100.0	0.05	0.15

### 3.3.5.3 回收率试验

采用标准添加法, 在木薯鲜叶和木薯叶粉中添加 3 个不同浓度(低、中、高)的黄酮醇进行回收率试验, 加标浓度设置见表 5。各浓度进行 5 个样品平行试验, 计算平均回收率和相对标准偏差, 计算结果见表 6。从表中试验结果可以看出本方法在样品中进行低、中、高三浓度加标, 回收率均在 85%~125%之间, 相对标准偏差均小于 15%。



表 5 黄酮醇化合物加标浓度一览表

样品类型	组分名称	添加浓度 (mg/kg)		
		低	中	高
木薯鲜叶	杨梅苷	75	150	300
	芦丁	1500	3000	4500
	烟花苷	750	1500	3000
	水仙苷	75	150	300
木薯叶粉	杨梅苷	140	280	490
	芦丁	3500	7000	14000
	烟花苷	2250	4500	9000
	水仙苷	140	280	490

表 6 样品中黄酮醇的加标回收率

样品类型	组分名称	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
木薯鲜叶	杨梅苷	75, 150, 300	96.67, 93.17, 101.59	9.16, 7.88, 10.78
	芦丁	1500, 3000, 4500	100.28, 103.28, 100.63	9.16, 6.34, 6.39
	烟花苷	750, 1500, 3000	99.62, 99.31, 101.50	6.59, 1.51, 1.44
	水仙苷	75, 150, 300	103.38, 108.99, 107.42	9.56, 4.13, 3.15
木薯叶粉	杨梅苷	140, 280, 490	97.55, 94.50, 96.26	6.56, 4.01, 7.31
	芦丁	3500, 7500, 15000	100.72, 102.73, 101.00	8.64, 4.43, 5.83
	烟花苷	2250, 4500, 9000	99.62, 99.31, 101.50	6.59, 1.51, 1.44
	水仙苷	140, 280, 490	104.26, 108.99, 107.42	8.36, 4.13, 3.15

### 3.3.5.4 精密度实验

#### (1) 日内重复性实验

由相同人员使用相同的仪器，在一天内，测定加标样品中 4 种黄酮醇含量，每个样品重复 6 次，见表 7。结果表明在相同条件下，日内重复性测定黄酮醇的相对标准偏差均小于 5%。

表 7 日内测定黄酮醇的重复性结果 (n=6)

样品类型	组分名称	测定值 (mg/kg)						平均值 (mg/kg)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
木薯鲜叶	杨梅苷	857.66	859.33	857.52	860.59	855.49	855.49	857.68	0.24
	芦丁	27153.51	27160.14	27168.93	27184.78	27200.97	26782.22	27108.42	0.59
	烟花苷	15175.55	15176.25	15184.28	15189.72	14782.61	14780.61	15048.17	1.37
	水仙苷	1115.81	1113.86	1116.37	1114.70	1097.55	1087.55	1107.64	1.10
木薯叶粉	杨梅苷	399.78	399.21	399.87	398.29	398.94	389.73	397.64	0.98
	芦丁	8821.17	8828.26	8830.98	8776.63	8757.43	8744.87	8793.22	0.44
	烟花苷	4805.71	4797.64	4809.72	4781.55	4767.72	4677.04	4773.23	1.04
	水仙苷	557.23	546.82	558.72	555.40	553.37	545.38	552.82	1.00

#### (2) 日间重复性实验

由相同人员使用相同的仪器，在一个月内的第 10 天、20 天和 30 天，分别对同一份样品进行测定，每个样品重复 3 次。表 8 结果可以看出，日间重复性测定 4 种黄酮醇的相对标准偏差小于 10%。

表 8 日间测定黄酮醇的重复性结果 (n=3)

样品类型	组分名称	测定值 (mg/kg)			平均值 (mg/kg)	RSD (%)
		第 10 天平均值	第 20 天平均值	第 30 天平均值		
木薯鲜叶	杨梅苷	193.16	193.42	183.52	190.03	2.97
	芦丁	8010.80	8198.50	7957.12	8055.47	1.57
	烟花苷	4125.65	4265.00	4108.24	4166.30	2.06
	水仙苷	424.69	415.62	430.12	423.48	1.73
木薯叶粉	杨梅苷	837.70	807.28	713.77	786.25	8.21
	芦丁	23870.31	23354.68	23181.59	23468.86	1.53
	烟花苷	12627.07	12637.14	12226.55	12496.92	1.87
	水仙苷	841.29	822.28	831.06	831.54	1.14

### (3) 人员比对重复性实验

由两个试验人员使用相同的仪器设备，在一天内，对同一份加标样品进行测定，每个样品重复 3 次，见表 9。结果表明，不同人重复性测定 4 种黄酮醇的相对标准标准偏差小于 10%。

表 9 不同人员测定黄酮醇的重复性结果 (n=3)

样品类型	组分名称	测定值 (mg/kg)						平均值 (mg/kg)	RSD (%)
		人员1			人员2				
		1	2	3	1	2	3		
木薯鲜叶	杨梅苷	194.4	193.0	192.1	193.7	193.6	193.0	193.3	0.39
	芦丁	8012.2	8020.5	7999.7	7974.3	7945.6	7951.4	7984.0	0.40
	烟花苷	4129.3	4124.8	4122.8	4112.6	4104.5	4107.5	4116.9	0.25
	水仙苷	415.0	416.3	415.5	410.5	411.5	411.3	413.3	0.62
木薯叶粉	杨梅苷	773.6	772.1	769.9	738.9	740.0	741.2	756.0	2.31
	芦丁	23310.5	23314.8	23378.8	23086.5	23170.3	23259.8	23253.5	0.46
	烟花苷	12261.3	12317.9	12289.0	12078.0	12109.1	12153.9	12201.6	0.83
	水仙苷	806.4	832.6	812.5	795.9	800.7	801.6	808.3	1.63

### (4) 实验室间的重复性和再现性

根据 GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》的规定，参照 GB/T 6379.2-2004《测试方法与结果的准确度（正确度与精密度）第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》，6 家实验室（见表 10）参加了木薯中黄酮醇的验证试验，对本方法的精密度（重复性和再现性）进行统计分析（见

表 11~表 34)。

表 10 参加精密度试验的实验室名称及编号

实验室 $i$	实验室名称
1	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所
2	农业农村部农产品质量监督检验测试中心（北京）
3	浙江大学农生环测试中心
4	农业农村部农产品质量监督检验测试中心（海口）
5	绿城农科检测技术有限公司
6	农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心（杭州）

表 11 木薯鲜叶杨梅苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 $n$	杨梅苷（添加水平 75mg/kg）					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	69.81	72.43	76.43	75.32	69.91	70.30
2	70.87	71.85	85.73	71.24	65.44	66.42
3	75.80	74.69	82.70	79.89	71.77	73.80
4	70.90	70.58	80.07	78.49	61.34	72.52
5	67.79	76.83	82.15	71.01	69.21	69.71
平均值 $X_i$ (mg/kg)	71.03	73.28	81.42	75.19	67.53	70.55
方差 $s_i^2$	8.69	6.16	11.87	16.52	17.28	8.05
平均值 $X$ (mg/kg)	73.17					
重复性标准偏差 $S_r$	3.381					
重复性相对标准偏差 (%)	4.62					
再现性标准偏差 $S_R$	5.674					
再现性相对标准偏差 (%)	7.756					

表 12 杨梅苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 $n$	杨梅苷（添加水平 150mg/kg）					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	144.37	149.82	132.11	147.88	143.31	142.53
2	147.97	148.57	136.50	141.36	135.07	133.97
3	145.83	150.74	140.76	146.74	136.99	138.32
4	146.06	140.94	133.15	148.04	134.06	143.65
5	142.99	154.90	132.42	144.16	134.08	135.44
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	145.45	148.99	134.99	145.64	136.70	138.78
方差 $s_i^2$	3.52	25.90	13.47	8.12	15.05	18.07
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	141.76					
重复性标准偏差 $S_r$	3.745					
重复性相对标准偏差 (%)	2.642					
再现性标准偏差 $S_R$	6.593					
再现性相对标准偏差 (%)	4.651					

表 13 杨梅苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	杨梅苷 (添加水平 300mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	282.00	294.74	304.47	313.53	270.51	260.11
2	283.17	292.32	303.90	311.63	269.86	261.12
3	281.08	294.83	304.29	317.68	263.72	253.41
4	310.96	295.63	309.27	298.87	234.77	255.23
5	310.00	302.13	309.98	313.95	285.83	274.62
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	293.44	295.93	306.38	311.13	264.94	260.90
方差 $s_i^2$	242.56	13.54	8.86	51.81	350.81	69.25
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	288.79					
重复性标准偏差 $S_r$	11.082					
重复性相对标准偏差 (%)	3.837					
再现性标准偏差 $S_R$	23.321					
再现性相对标准偏差 (%)	8.075					

从表 11-13 中可以看出, 木薯鲜叶杨梅苷的重复性相对标准偏差为 2.642-4.620%, 小于 14%。杨梅苷的再现性相对标准差在 4.651-8.075%, 小于 19%。结果表明, 被测组分含量在 75mg/kg、150mg/kg 和 300 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性, 该方法精密度通过评价要求。

表 14 木薯鲜叶芦丁低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 1500mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	1580.54	1513.25	1593.87	1303.62	1381.32	1355.29
2	1534.82	1509.39	1849.67	1534.82	1416.05	1413.37
3	1571.22	1494.21	1722.87	1571.21	1474.13	1474.05
4	1518.57	1605.73	1897.68	1518.57	1425.35	1364.59
5	1460.93	1488.88	1665.73	1460.93	1342.88	1282.12
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	1533.22	1522.29	1745.97	1477.83	1407.95	1377.88
方差 $s_i^2$	2281.32	2278.84	15969.02	11065.74	2422.93	5091.35
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	1510.86					
重复性标准偏差 $S_r$	80.735					
重复性相对标准偏差 (%)	5.344					
再现性标准偏差 $S_R$	149.226					
再现性相对标准偏差 (%)	9.877					

表 15 木薯鲜叶芦丁中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 3000mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	2759.94	2915.24	2980.90	3008.70	3287.07	3086.87
2	2757.04	2985.81	2939.92	3024.49	3398.08	3049.37
3	3037.12	3073.26	2985.53	3589.62	3420.48	3234.37

4	3068.92	3220.40	3247.00	3259.44	3226.85	2779.47
5	2836.88	3029.39	3231.49	3057.48	3065.63	2895.97
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	2891.98	3044.82	3076.97	3187.95	3279.62	3009.21
方差 $s_i^2$	22763.15	13037.26	22289.39	60579.70	20626.55	30986.17
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	3081.8					
重复性标准偏差 $S_r$	168.465					
重复性相对标准偏差 (%)	5.467					
再现性标准偏差 $S_R$	203.280					
再现性相对标准偏差 (%)	6.596					

表 16 木薯鲜叶芦丁高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 4500mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	4246.05	4409.86	4758.95	5182.97	4693.52	4373.67
2	4316.89	4448.19	4593.78	4598.04	4359.85	4136.17
3	4373.04	4602.12	4518.40	4659.87	4133.26	4252.37
4	4364.78	4240.14	4565.79	5422.70	4729.77	4434.37
5	4474.83	4444.18	4715.72	5334.77	4521.27	4448.27
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	4355.12	4428.90	4630.53	5039.67	4487.54	4328.97
方差 $s_i^2$	7025.66	16650.83	10465.79	148402.17	61014.98	17594.79
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	4545.12					
重复性标准偏差 $S_r$	208.628					
重复性相对标准偏差 (%)	4.590					
再现性标准偏差 $S_R$	324.228					
再现性相对标准偏差 (%)	7.134					

从表 14-16 中可以看出，木薯鲜叶芦丁的重复性相对标准偏差为 4.590-5.467%，小于 14%。芦丁的再现性相对标准差在 6.596-9.877%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 1500mg/kg、3000mg/kg 和 4500mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 17 木薯鲜叶烟花苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 750mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	683.96	711.62	771.87	660.33	774.31	727.90
2	690.44	769.01	844.98	684.82	761.36	760.80
3	724.41	774.34	808.94	700.37	769.93	766.90
4	696.60	809.09	778.25	768.37	772.63	762.60
5	679.93	735.83	844.72	703.45	798.54	777.80
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	695.07	759.98	809.75	703.47	775.35	759.20
方差 $s_i^2$	309.32	1405.30	1222.94	1607.51	192.84	349.76

平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	750.47
重复性标准偏差 $S_r$	29.119
重复性相对标准偏差 (%)	3.880
再现性标准偏差 $S_R$	50.932
再现性相对标准偏差 (%)	6.787

表 18 木薯鲜叶烟花苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 1500mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	1532.41	1486.72	1461.18	1557.09	1480.26	1476.30
2	1454.22	1497.28	1469.89	1486.97	1486.55	1465.80
3	1442.33	1547.72	1498.98	1478.57	1531.15	1530.70
4	1563.07	1530.05	1495.74	1573.09	1417.77	1413.30
5	1451.64	1521.65	1517.32	1470.34	1429.20	1420.70
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	1488.73	1516.68	1488.62	1513.21	1468.99	1461.36
方差 $s_i^2$	3038.69	610.05	521.30	2309.27	2126.49	2253.49
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	1489.60					
重复性标准偏差 $S_r$	42.540					
重复性相对标准偏差 (%)	2.856					
再现性标准偏差 $S_R$	44.170					
再现性相对标准偏差 (%)	2.965					

表 19 木薯鲜叶烟花苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 3000mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	3009.22	2990.20	3099.01	3131.44	2996.14	3003.50
2	3065.34	3063.42	3075.17	3125.34	3006.73	2990.70
3	2966.39	3058.49	3070.54	3087.31	3079.98	3058.80
4	3002.75	3112.52	3161.89	3005.30	3021.32	3013.80
5	2967.22	3111.95	3133.38	3011.21	2979.80	2947.10
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	3002.18	3067.32	3108.00	3072.12	3016.79	3002.78
方差 $s_i^2$	1635.53	2518.88	1527.77	3689.02	1477.35	1626.60
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	3044.86					
重复性标准偏差 $S_r$	45.598					
重复性相对标准偏差 (%)	1.498					
再现性标准偏差 $S_R$	59.884					
再现性相对标准偏差 (%)	1.967					

从表 17-19 中可以看出，木薯鲜叶烟花苷的重复性相对标准偏差为 1.498-3.880%，小于 14%。烟花苷的再现性相对标准差在 1.967-6.787%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 750 mg/kg、1500 mg/kg 和 3000 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 20 木薯鲜叶水仙苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 75mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	69.35	76.04	79.98	69.88	85.49	78.58
2	70.78	79.42	84.07	72.19	83.91	80.78
3	71.71	70.76	87.93	77.65	86.62	80.48
4	69.86	80.82	82.95	70.20	88.10	78.68
5	69.64	75.65	85.97	69.71	88.95	79.78
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	70.27	76.54	84.18	71.93	86.62	79.66
方差 $s_i^2$	0.93	15.29	9.12	11.24	4.06	1.02
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	78.20					
重复性标准偏差 $S_r$	2.635					
重复性相对标准偏差 (%)	3.369					
再现性标准偏差 $S_R$	6.950					
再现性相对标准偏差 (%)	8.888					

表 21 木薯鲜叶水仙苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 150mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	161.87	145.99	163.89	164.43	176.45	161.88
2	159.59	155.71	161.68	163.08	179.78	165.98
3	168.13	153.69	162.13	170.94	160.88	165.58
4	165.85	150.74	165.78	176.28	170.60	162.48
5	163.15	155.15	164.54	164.37	150.21	143.78
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	163.72	152.26	163.61	167.82	167.59	159.94
方差 $s_i^2$	11.19	15.98	2.89	31.80	145.81	84.91
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	162.49					
重复性标准偏差 $S_r$	6.983					
重复性相对标准偏差 (%)	4.298					
再现性标准偏差 $S_R$	8.525					
再现性相对标准偏差 (%)	5.247					

表 22 木薯鲜叶水仙苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 300mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	322.40	308.21	314.14	333.38	320.45	308.38
2	328.30	310.17	325.41	333.34	337.90	303.98
3	327.99	311.73	329.20	343.47	323.99	309.18
4	321.32	315.07	334.82	322.00	323.62	313.28
5	331.03	316.88	328.42	334.87	334.02	300.88
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	326.21	312.41	326.40	333.41	328.00	307.14
方差 $s_i^2$	17.32	12.53	58.49	58.39	56.63	23.14
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	322.26					

重复性标准偏差 $S_r$	6.144
重复性相对标准偏差 (%)	1.907
再现性标准偏差 $S_R$	11.547
再现性相对标准偏差 (%)	3.583

从表 20-22 中可以看出，木薯叶粉中水仙苷的重复性相对标准偏差为 1.907-4.298%，小于 14%。水仙苷的再现性相对标准差在 3.583-8.888%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 75mg/kg、150mg/kg 和 300 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 23 木薯叶粉杨梅苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	杨梅苷 (添加水平 140mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	148.08	148.82	138.46	139.16	133.80	131.70
2	147.13	146.81	126.72	136.92	130.08	131.70
3	147.66	148.64	131.44	144.56	131.75	138.87
4	146.62	141.73	130.62	139.43	131.01	130.60
5	141.24	141.32	134.10	139.77	138.51	137.70
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	146.15	145.46	132.27	139.97	133.03	134.11
方差 $s_i^2$	7.84	13.57	18.97	7.84	11.26	14.86
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	138.50					
重复性标准偏差 $S_r$	3.520					
重复性相对标准偏差 (%)	2.532					
再现性标准偏差 $S_R$	8.112					
再现性相对标准偏差 (%)	5.835					

表 24 木薯叶粉杨梅苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	杨梅苷 (添加水平 280mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	260.29	272.86	322.20	265.56	257.03	257.40
2	267.00	267.63	319.96	260.54	255.49	255.40
3	264.48	263.21	327.83	260.27	248.95	257.30
4	269.88	272.86	322.70	266.52	249.15	252.00
5	269.81	264.02	319.73	260.67	249.86	258.30
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	266.29	268.12	322.49	262.71	252.10	256.08
方差 $s_i^2$	16.27	21.55	10.66	9.37	14.86	6.32
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	271.30					
重复性标准偏差 $S_r$	3.629					
重复性相对标准偏差 (%)	1.338					
再现性标准偏差 $S_R$	26.186					
再现性相对标准偏差 (%)	9.586					

表 25 木薯叶粉杨梅苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	杨梅苷 (添加水平 490mg/kg)
------	---------------------



	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	470.34	484.81	533.14	471.59	446.63	443.70
2	486.04	483.15	542.94	473.39	445.30	444.00
3	470.60	482.96	536.10	478.97	447.53	445.20
4	477.51	475.75	535.14	471.59	438.64	446.30
5	475.11	473.32	532.30	466.71	439.49	444.20
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	475.92	480.00	535.92	472.45	443.52	444.68
方差 $s_i^2$	41.23	26.15	17.69	19.46	17.24	1.14
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	475.42					
重复性标准偏差 $S_r$	4.526					
重复性相对标准偏差 (%)	0.949					
再现性标准偏差 $S_R$	33.962					
再现性相对标准偏差 (%)	7.120					

从表 23-25 中可以看出，木薯叶粉杨梅苷的重复性相对标准偏差为 0.949-2.532%，小于 14%。杨梅苷的再现性相对标准差在 5.835-9.652%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 140mg/kg、280mg/kg 和 490 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 26 木薯叶粉芦丁低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 3500mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	3300.42	3520.02	3305.82	3794.93	3843.95	3713.30
2	3227.46	3007.88	3305.29	3745.88	3782.07	3481.50
3	3173.34	2948.62	3239.77	3778.94	3834.29	3467.20
4	3102.01	3117.21	3244.46	3628.33	3694.28	3347.70
5	3200.12	3181.63	3245.60	3827.54	3596.45	3401.30
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	3200.67	3155.07	3268.19	3755.12	3750.20	3482.20
方差 $s_i^2$	5287.27	49903.70	1168.24	5889.25	10910.50	19566.94
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	3435.24					
重复性标准偏差 $S_r$	124.315					
重复性相对标准偏差 (%)	3.582					
再现性标准偏差 $S_R$	306.848					
再现性相对标准偏差 (%)	8.841					

表 27 木薯干粉芦丁中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 7000mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	7310.74	6448.85	7542.22	8090.50	8115.73	7300.40
2	7269.74	6454.42	7481.42	7999.97	7921.16	7333.90
3	7300.35	6484.00	7541.34	8089.59	8026.26	7141.20
4	7331.93	6701.24	7505.15	8095.29	7927.96	7320.70

5	7457.07	6759.39	7614.92	8091.09	8071.22	7282.20
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	7333.96	6569.58	7537.01	8073.29	8012.46	7275.68
方差 $s_i^2$	5238.22	22130.93	2555.28	1684.64	7445.95	6038.71
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	7467.00					
重复性标准偏差 $S_r$	86.693					
重复性相对标准偏差 (%)	1.166					
再现性标准偏差 $S_R$	594.763					
再现性相对标准偏差 (%)	7.998					

表 28 木薯叶粉芦丁高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	芦丁 (添加水平 14000mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	13319.95	12440.68	13487.92	14300.25	14288.61	13134.00
2	13519.70	12557.32	13812.01	14448.51	14102.90	13108.50
3	13262.49	12452.86	13569.25	14588.45	14251.56	13221.80
4	13219.39	12405.82	13561.71	14431.99	14142.42	13133.20
5	13311.54	12508.49	13463.27	14293.23	14238.89	13183.50
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	13326.62	12473.04	13578.83	14412.49	14204.87	13156.20
方差 $s_i^2$	13291.11	3583.18	19094.31	14865.37	6161.90	2086.44
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	13525.34					
重复性标准偏差 $S_r$	99.232					
重复性相对标准偏差 (%)	0.732					
再现性标准偏差 $S_R$	723.206					
再现性相对标准偏差 (%)	5.338					

从表 26-28 中可以看出，木薯叶粉芦丁的重复性相对标准偏差为 0.732-3.582%，小于 14%。芦丁的再现性相对标准差在 5.388-8.841%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 3500mg/kg、7000mg/kg 和 14000 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 29 木薯叶粉烟花苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 2250mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	2440.34	2166.83	2423.86	2598.77	2591.87	2428.00
2	2406.38	2214.19	2424.09	2523.53	2516.93	2396.40
3	2350.75	2179.76	2364.15	2612.09	2539.42	2348.10
4	2351.85	2171.01	2387.56	2538.81	2525.32	2341.80
5	2411.31	2205.34	2402.32	2520.31	2504.63	2465.70
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	2392.13	2187.43	2400.40	2558.70	2535.63	2396.00
方差 $s_i^2$	1557.36	447.57	648.56	1890.76	1148.57	2778.57
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	2411.71					
重复性标准偏差 $S_r$	37.575					

重复性相对标准偏差 (%)	1.554
再现性标准偏差 $S_R$	143.694
再现性相对标准偏差 (%)	5.942

表 30 木薯叶粉烟花苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 4500mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	4218.36	4464.14	4333.68	4680.11	4660.58	4388.70
2	4230.99	4402.82	4284.26	4654.18	4587.43	4385.30
3	4240.55	4485.34	4368.01	4628.56	4569.00	4319.80
4	4226.80	4228.76	4262.96	4667.24	4558.67	4338.00
5	4345.57	4252.84	4426.57	4559.13	4512.89	4355.20
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	4252.45	4366.78	4335.09	4637.85	4577.71	4357.40
方差 $s_i^2$	2773.44	14216.03	4310.27	2300.02	2900.48	888.26
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	4421.21					
重复性标准偏差 $S_r$	67.563					
重复性相对标准偏差 (%)	1.522					
再现性标准偏差 $S_R$	175.461					
再现性相对标准偏差 (%)	3.953					

表 31 木薯叶粉烟花苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	烟花苷 (添加水平 9000mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	8465.07	8535.15	8530.81	8892.96	8741.70	8382.00
2	8564.35	8489.28	8717.16	8960.44	8787.44	8365.10
3	8440.43	8598.36	8606.67	9001.61	8648.56	8388.30
4	8433.48	8547.52	8597.00	9018.00	8730.31	8336.90
5	8507.30	8468.94	8600.37	8948.61	8651.66	8365.30
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	8482.13	8527.85	8610.40	8964.33	8711.93	8367.52
方差 $s_i^2$	2947.47	2592.49	4506.56	2406.24	3643.52	397.46
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	8610.69					
重复性标准偏差 $S_r$	52.430					
重复性相对标准偏差 (%)	0.608					
再现性标准偏差 $S_R$	206.730					
再现性相对标准偏差 (%)	2.399					

从表 29-31 中可以看出，木薯叶粉中烟花苷的重复性相对标准偏差为 0.608-1.554%，小于 14%。木薯叶粉中烟花苷的再现性相对标准差在 2.399-5.942%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 2250 mg/kg、4500 mg/kg 和 9000 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

表 32 木薯叶粉水仙苷低浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 140mg/kg)
------	---------------------

	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	145.09	131.24	119.35	131.38	139.94	139.17
2	127.08	138.81	118.24	132.27	139.18	138.41
3	128.04	127.44	117.94	134.56	142.23	139.31
4	133.01	133.60	117.57	132.01	140.08	133.54
5	143.54	127.92	122.63	134.05	136.07	135.30
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	135.35	131.80	119.15	132.85	139.50	137.15
方差 $s_i^2$	72.31	21.70	4.24	1.89	4.96	6.70
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	132.63					
重复性标准偏差 $S_r$	4.317					
重复性相对标准偏差 (%)	3.251					
再现性标准偏差 $S_R$	8.668					
再现性相对标准偏差 (%)	6.529					

表 33 木薯叶粉水仙苷中浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 280mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	281.79	293.99	263.27	305.50	311.12	310.35
2	283.62	271.03	253.08	306.31	306.95	306.18
3	281.26	263.59	267.22	308.00	308.27	307.50
4	282.21	267.72	257.70	303.50	313.73	305.25
5	276.44	279.41	261.07	300.48	306.71	305.94
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	281.06	275.15	260.47	304.76	309.36	307.04
方差 $s_i^2$	7.45	144.78	29.00	8.34	9.05	4.08
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	289.64					
重复性标准偏差 $S_r$	5.812					
重复性相对标准偏差 (%)	2.001					
再现性标准偏差 $S_R$	20.820					
再现性相对标准偏差 (%)	7.167					

表 34 木薯叶粉水仙苷高浓度加标的实验室间重复性及再现性测定结果

重复 n	水仙苷 (添加水平 490mg/kg)					
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6
1	558.52	515.44	490.56	596.81	591.25	582.40
2	554.16	526.01	494.81	603.25	583.17	587.92
3	554.63	500.09	493.83		605.71	588.69
4	553.66	504.35	491.27	603.09	581.98	586.33
5	530.14	507.13	467.23	596.67	587.10	575.35
平均值 $\bar{X}_i$ (mg/kg)	550.22	510.60	487.54	601.11	586.44	582.64
方差 $s_i^2$	129.74	105.60	131.94	16.97	14.80	24.19
平均值 $\bar{X}$ (mg/kg)	553.09					
重复性标准偏差 $S_r$	8.399					
重复性相对标准偏差 (%)	1.511					
再现性标准偏差 $S_R$	44.518					

再现性相对标准偏差 (%)	8.005
---------------	-------

从表 32-34 中可以看出，木薯叶粉中水仙苷的重复性相对标准偏差为 1.511-3.251%，小于 14%。水仙苷的再现性相对标准差在 6.529-8.005%，小于 19%。结果表明，被测组分含量在 140mg/kg、280mg/kg 和 490 mg/kg 三个水平的重复性相对标准偏差和再现性相对标准偏差具有符合性，该方法精密度通过评价要求。

### 3.3.5.5 系统适应性

以杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷 4 种黄酮醇浓度分别为 50 mg/L、300mg/L、150 mg/L、50 mg/L 的标准溶液为系统适用性试验溶液，进行分析，记录色谱图。计算系统适用性参数，结果见表 35。由表可知，本方法的系统适用性试验结果符合规定。

表 35 系统适应性结果

系统适应性参数	化合物	测得数据	评判标准
重复进样对照品溶液 6 针保留时间 RSD (%)	杨梅苷	0.07	≤ 1%
	芦丁	0.05	
	烟花苷	0.06	
	水仙苷	0.05	
重复进样对照品溶液 6 针峰面积 RSD (%)	杨梅苷	0.71	≤ 5%
	芦丁	0.16	
	烟花苷	0.13	
	水仙苷	0.60	
拖尾因子	杨梅苷	1.14	0.95~1.2
	芦丁	1.19	
	烟花苷	1.17	
	水仙苷	1.12	

### 3.3.5.7 标准溶液稳定性考察

以配制的标准储备溶液为考察对象，保存条件为-18℃，分别于配制好后 1 个月、3 个月、6 个月时间点，取该储备液，用稀释剂稀释以杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷 4 种黄酮醇浓度分别为 50 mg/L、300mg/L、150 mg/L、50 mg/L 的标准工作液，以此工作液上机测试。每次连续进样 3 针，以每种化合物的色谱峰面积平均值为考察值，汇总如表 36。从表中可以看出，4 种黄酮醇冻存 6 个月相对标准偏差都不超过 5%，因此在-18℃下保存有效期为 6 个月是可靠的。

表 36 标准储备液长期冻存后峰面积值变化

化合物	配置后	配置后 1 个月	配置后 3 个月	配置后 6 个月	RSD/%
杨梅苷	919.30	921.73	931.50	1004.62	4.30

芦丁	4925.20	4964.63	5026.70	5405.93	4.35
烟花苷	2563.90	2688.23	2621.50	2821.48	4.14
水仙苷	1000.20	1007.34	1019.50	1099.71	4.46

### 3.3.6 实际样品的测定

使用本方法对国家木薯种植圃的 30 份不同类型的木薯种质资源的鲜叶和叶粉中黄酮醇进行了考察（图 6，图 7），30 个种质资源鲜叶中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水箱苷含量分别在 0~554.6mg/kg，1190.3~8852.2mg/kg，312.1~3691.5mg/kg 和 4.3~283.2mg/kg 之间，木薯叶叶粉中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水箱苷含量分别在 23.8~901.3mg/kg，7501.4~22621.2mg/kg，1412.2~10012.5mg/kg 和 200.9~755.2mg/kg 之间，品种间黄酮醇含量差异较大，含量以芦丁和烟花苷为主，鲜叶和叶粉中 2 种黄酮醇占总量的 90% 以上。

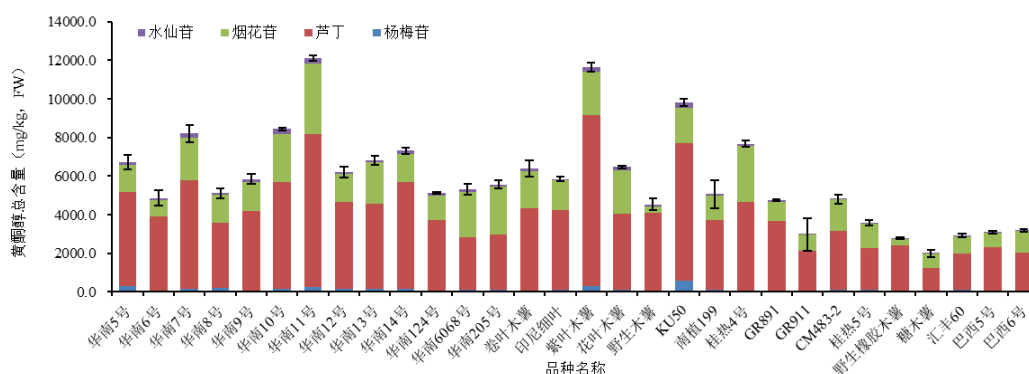


图 6 30 个木薯资源鲜叶中 4 种黄酮醇总含量差异

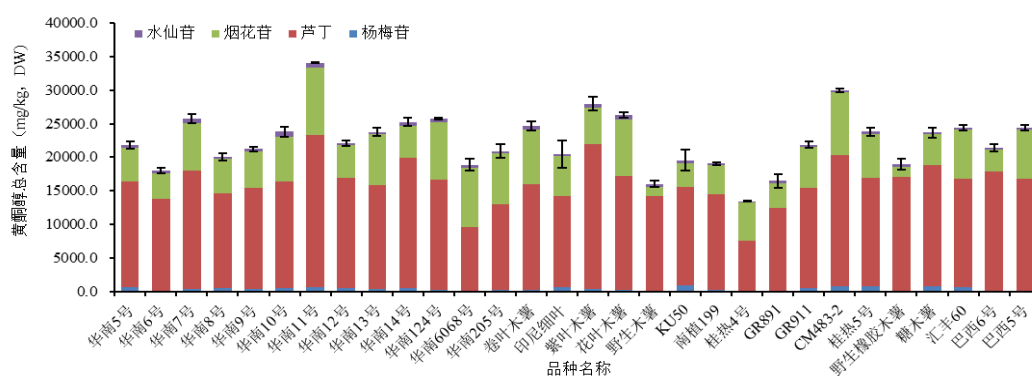


图 7 30 个木薯资源叶粉中 4 种黄酮醇总含量差异

### 3.3.7 对本标准方法的基本评价

本标准规定了木薯鲜叶和木薯叶粉中 4 种黄酮醇的高效液相测定方法。适用于木薯叶片中含黄酮醇类化合物含量的测定。主要技术内容包括样品前处理、色

质谱条件优化、灵敏度、准确度和精密度等。为了满足资源分析检测和利用的需要,本项目在查阅国内外大量文献资料和前期相关科研的基础上,制定了木薯叶片中黄酮醇的测定方法标准。方法在大量试验数据的基础上形成,科学可靠。本方法重复性、再现性好,省时、高效,所用仪器为常规分析仪器,具有较强的适用性。

#### **4. 采用国际标准**

无。

#### **5. 与现行法律法规和强制性标准的关系**

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章,严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接,遵循了政策性和协调同一性的原则。标准的名称、内容及指标与现行的国家标准之间不存在包含、重复、交叉问题。

#### **6. 重大分歧意见的处理经过和依据**

无。

#### **7. 标准作为强制性或推荐性标准发布的意见**

本标准作为化学分析方法标准,并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一。因此,建议将《木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法》作为推荐性标准颁布实施。

#### **8. 贯彻标准的要求和措施建议**

无。

#### **9. 废止现行有关标准的建议**

无。

#### **10 主要参考文献**

- [1] 范雁婷,樊若楠,张辉,等. 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.
- [2] 吴秋妃. 木薯叶提取液制备及其抗氧化作用研究[D]. 海南大学, 2019.

- [3] Tao H, Cui B, Zhang H, et al. 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.
- [4] 王定美, 王伟, 麦力文, 等. 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.
- [5] 王琴飞, 吴秋妃, 徐缓, 等. 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(08): 1694-1699.
- [6] 方芳, 王凤忠. 植物黄酮醇的检测方法研究进展[J]. *食品工业科技*. 2018, 39(11): 327-332.
- [7] Chahyadi A, Elfahmi. The influence of extraction methods on rutin yield of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Saudi Pharm J*. 2020, 28(11): 1466-1473.
- [8] 詹春莲, 陈新富, 麦力文, 等. 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*. 2020: 1-10.
- [9] 中华人民共和国国家标准, GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部份: 标准化文件的结构和起草规则》。
- [10] 中华人民共和国国家标准, GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分: 试验方法标准》。
- [11] 中华人民共和国国家标准, GB/T 27417-2017,《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》。
- [12] 中华人民共和国国家标准, GB/T 32465-2017《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》。
- [13] 中华人民共和国国家标准, GB/T 35655-2017,《化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 色谱分析方法》。
- [14] 中华人民共和国国家标准, GB/T 6379.2-2004/ISO5725-2:1994《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第2部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》。