

不同提取方法对番石榴叶有效成分、抗氧化及 α -糖苷酶抑制活性的影响

罗朝丹^{1,2}, 王秋菊³, 李建强^{1*}, 冯春梅^{1,2}, 任二芳¹, 黄燕婷¹, 宁琳¹, 罗小杰¹

1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所/广西亚热带水果加工工程技术研究中心, 广西南宁 530001; 2. 广西亚热带特色水果质量安全控制重点实验室, 广西南宁 530001; 3. 桂林日盛食品有限责任公司, 广西桂林 541300

摘要: 为了联合评价浸渍法、热回流法、超声辅助乙醇和超声辅助低共溶剂法 (UADEE) 对番石榴叶的提取效果, 通过扫描电镜观察番石榴叶样品的显微结构, 以香草醛-冰醋酸比色法、 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法、福林酚法分别测定番石榴叶提取液的总皂苷、总黄酮、总酚含量, 采用 HPLC 法测定番石榴叶中黄酮单体的含量, LC-MS 法分析其代谢物, 并评估其抗氧化与 α -糖苷酶抑制活性。结果表明: UADEE 对番石榴叶细胞内部结构的破坏性最强, 样品总皂苷、总黄酮与总酚含量分别为 79.28、80.51、120.52 mg/g, 黄酮成分番石榴苷、蒽薹苷、瑞诺苷含量分别为 7.96、7.74、3.99 mg/g, 显著高于其他 3 组 ($P<0.05$); UADEE 处理组中黄酮类、三萜类、酚类成分在番石榴叶总代谢物中分别占 9.830%、27.267%、1.013%。UADEE 组样品清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值和抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值分别为 45.18、904.67 $\mu\text{g/mL}$, 活性显著强于其他 3 组 ($P<0.05$)。本研究结果为番石榴叶有效成分的高效提取及其加工产品的开发提供实验依据。

关键词: 番石榴叶; 超声辅助低共溶剂法; 有效成分; DPPH 自由基清除率; α -糖苷酶抑制活性

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

Effects of Extraction Methods on Effective Constituents, Antioxidant Activities, α -glycosidase Inhibition of Guava Leaves

LUO Chaodan^{1,2}, WANG Qiujun³, LI Jianqiang^{1*}, FENG Chunmei^{1,2}, REN Erfang¹, HUANG Yanting¹, NING Lin¹, LUO Xiaojie¹

1. Guangxi Subtropical Crops Research Institute / Guangxi Subtropical Fruits Processing Research Center of Engineering Technology, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruits, Nanning, Guangxi 530001, China; 3. Guilin Risheng Food Co., Ltd., Guilin, Guangxi 541300, China

Abstract: Guava leaf (*Psidium guajava* Linn.) is a common folk medicine in China. Modern pharmacological studies have confirmed its remarkable antioxidant and hypoglycemic activities, which has broad prospects in the development of natural antioxidants and hypoglycemic agents. The release of non-volatile active components of plants or herbs were greatly affected by extraction ways. The extraction effects on guava leaves of macerated extraction (ME), heat reflux extraction (HRE), ultrasound-assisted alcohol extraction (UAAE) and ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction (UADEE), microstructure were evaluated. The content of total saponins, total flavonoids, total phenols in the extract was respectively determined by vanillin-glacial acetic acid colorimetric method, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ colorimetric method and folin phenol method. The content of flavonoid components was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The metabolites were analyzed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS). *In vitro*

收稿日期 2024-09-24; 接受日期 2024-11-18

基金项目 广西农业科学院科技发展基金项目 (桂农科 2022JM92); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2025YP140, 桂农科 2021YT144)。

作者简介 罗朝丹 (1994—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 活性成分提取与功能评价。*通信作者 (Corresponding author): 李建强 (LI Jianqiang), E-mail: 974108174@qq.com。

antioxidant activity and α -glycosidase inhibitory ability of the extract were also evaluated. In UADEE group, internal structure of guava leaves was most completely damaged, the content of total saponins, total flavonoids, total phenols and guaijaverin, avicularin, reynoutrin was respectively determined to be 79.28 mg/g, 80.51 mg/g, 120.52 mg/g, 7.96 mg/g, 7.74 mg/g and 3.99 mg/g, which significantly higher than those of the other three groups ($P<0.05$). Flavonoids, triterpenoids and phenols accounted for 9.830%, 27.267% and 1.013% of all metabolites in the extract, respectively. The IC_{50} value of scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and inhibiting α -glycosidase in UADEE group was 45.18 μ g/mL and 904.67 μ g/mL, respectively, significantly superior than those of the other three groups ($P<0.05$). In summary, UADEE has the best effect on the extraction of active components in the extract, attributed to the mechanical and chemical effects of ultrasound and the polarity tunability and solubilization of solvents. The results would provide experimental basis for the efficient extraction of effective components from guava leaves and the development of processed products.

Keywords: guava leaves; ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction; active constituents; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging ability; α -glycosidase inhibitory ability

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.018

番石榴 (*Psidium guajava* Linn.) 为桃金娘科番石榴属植物, 番石榴叶片可入药, 具清热解毒、生津止渴、涩肠止泻等功效。现代药理研究证实了其显著的抗氧化和降血糖等活性^[1], 在天然抗氧化剂和降糖剂等开发中具有广阔前景。有效成分是中草药发挥药效的物质基础, 番石榴叶中主要有效成分包括三萜、黄酮、鞣质、多糖等, 其中三萜类物质主要有齐墩果酸、乌苏酸和积雪草酸等^[2], 黄酮类成分主要有槲皮素、番石榴苷、蒽萹苷、瑞诺苷等^[3]。

提取工艺是影响有效成分提取率的关键因素, 目前番石榴叶有效成分的提取多采用浸提法^[4]、回流提取法^[5]、超声辅助法^[6]等方法。提取溶剂的极性极大地影响了其对有效成分的提取率, 而低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DES) 具有极性可调谐性, 对各种极性的化合物均具有增溶作用。DES 作为绿色溶剂提取和分离天然产物中多酚类^[7]、黄酮类、皂苷类^[8]、三萜酸^[9]等不同极性的化合物, 在中药提取分离领域具有很大潜力, 目前已应用于番石榴叶总黄酮 (total flavonoids) 的提取^[10], 但未见用于总酚 (total phenols) 和总皂苷 (total saponins) 的提取。此前通过提取分离纯化的方式, 从番石榴叶醇提取物及乙酸乙酯萃取物中, 主要鉴定出混源萜类化合物^[11], 以及黄酮类成分如山奈酚、槲皮素等^[12-13]。但这一分离纯化过程耗时耗力, 且难以发现其中痕量成分。近年来, 液质联用技术 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) 已成为探究化学成分的有效手段, 但目前未见采用 LC-MS 技术进行番石榴叶成分的研究。

为了对番石榴叶的有效成分进行高效提取, 本研究以总黄酮、总皂苷、总酚及黄酮成分槲皮素、番石榴苷、蒽萹苷、瑞诺苷与主要代谢物的含量为定量评价指标, 结合功能活性 DPPH 自由基清除能力与 α -糖苷酶抑制率, 探究不同提取方法对番石榴叶主要有效成分含量的影响, 为番石榴叶食疗产品的开发提供理论基础, 从而促进番石榴副产物的综合利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试植物材料番石榴叶片采集于广西壮族自治区亚热带作物研究所, 经水果研究中心陈豪军正高级农艺师鉴定, 叶片长 8~10 cm, 宽 3~5 cm。

1.1.2 仪器与试剂 试验所用仪器: Thermo Vanquish 高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, USA)、SU8100 扫描电子显微镜、MC1000 离子溅射仪 (Hitachi, Japan)、UV-1800PC 紫外可见光分光光度计、DHG-9070A 恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)、L3.5TB1 热泵干燥机 (威尔信)、H1850-R 型冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、CP214 电子分析天平 (奥豪斯仪器有限公司)、XL-30C 型万能高速粉碎机 (济南欧莱博科学仪器有限公司)、RE-5210A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)、GTSONIC-T20 超声波清洗仪 (广东固特超声股份有限公司)、FlexiVap 氮吹仪 (维根技术 (北京) 有限公司)、恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器有限公司)、Milli-Q

超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

试验所用试剂:芦丁(批号:Y2411Y17051)、熊果酸(批号:L03A6Y1)、番石榴苷(批号:P09J7F8764)、蒺藜苷(批号:P21S10S98394)、瑞诺苷(批号:P25J10S91433)、槲皮素(批号:C01J10Y91727)、没食子酸(批号:J01IB218870)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)(批号:JS239376)、 α -葡萄糖苷酶(批号:S07HS193826)、阿卡波糖(批号:S25M11X109783,上海源叶生物科技有限公司)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)[西格玛奥德里奇贸易有限公司(上海)]、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)(上海麦克林生化科技有限公司)、乙腈(Thermo Fisher Scientific)、甲酸(TCL,色谱纯)、甲酸铵(Sigma-Aldrich,纯度 $\geq 99.0\%$);氯化胆碱[$\text{HOC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, ChCl]、乙二醇[(CH_2OH)₂, EG]、香草醛、冰醋酸、高氯酸、福林酚溶液、硝酸铝、亚硝酸钠、磷酸、甲醇、乙醇均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 番石榴叶提取 (1)浸渍法(macerated extraction, ME)。将番石榴叶洗净、去除枝梗泥沙等杂质后经50℃烘干,粉碎,过40目筛,得粉末备用。精密称取2.00 g番石榴叶粉末,以50 mL体积分数为70%的乙醇为提取溶剂,置于锥形瓶中旋涡搅拌均匀,静置15 h,提取3次。

(2)热回流法(heat reflux extraction, HRE)。精密称取2.00 g番石榴叶粉末,以50 mL体积分数为70%的乙醇为提取溶剂,置于圆底烧瓶中旋涡搅拌均匀,90℃水浴下加热回流1.5 h,提取3次。

(3)超声辅助乙醇法(ultrasound-assisted alcohol extraction, UAEE)。称取2.00 g番石榴叶粉末放入锥形瓶中,以50 mL体积分数为70%的乙醇为提取溶剂,旋涡搅拌后,50℃下以465 W超声功率提取1.5 h,提取3次。

(4)超声辅助低共熔溶剂法(ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction, UADEE)。

参考王慧^[14]的试验方法,氯化胆碱(ChCl)经80℃恒温干燥24 h后,按物质的量浓度比例1:1与乙二醇(EG)于圆底烧瓶中混合,90℃恒温水浴搅拌,直至DES体系变得透明、均一、稳定。将所配DES温度降至室温,密封干燥14 d以上后,溶解于去离子水中,充分摇匀、静置,

配制得含水率为40%(按体积分数计)的均一透明DES水溶液(ChCl:EG)。

称取2.00 g番石榴叶粉末放入锥形瓶中,以50 mL配制的DES水溶液为提取溶剂,旋涡搅拌,50℃下以465 W超声功率提取1.5 h,提取3次。

1.2.2 扫描电子显微镜观察 参照陈红惠等^[15]的方法,利用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察提取前后的番石榴叶样品。称取适量干燥番石榴叶粉末进行ME、HRE、UAEE和UADEE处理,过滤后收集滤渣,60℃热风干燥箱中烘干至粉末状。将处理后样品用导电胶粘于样品台喷金30 s,在3.0 kV电压,高真空条件下,进行SEM观察。

1.2.3 总黄酮、总皂苷、总酚含量测定 番石榴叶总黄酮含量通过 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[16]测定,以芦丁为对照品,在505 nm处测定其吸光度。拟合标准曲线为 $Y=3.9184X+0.0043$ ($R^2=0.9983$);总皂苷含量通过香草醛-冰醋酸比色法^[17]测定,以熊果酸为对照品,在548 nm处测定吸光度,拟合标准曲线为 $Y=0.0098X+0.0517$ ($R^2=0.9905$);总酚含量采用福林酚法^[18]测定,以没食子酸为对照品,在765 nm处测定吸光度,拟合标准曲线为 $Y=0.0107X+0.003$ ($R^2=0.9975$)。

1.2.4 高效液相色谱法(HPLC)分析番石榴叶黄酮成分 (1)色谱条件。参照方皓等^[3]的方法进行测定,色谱柱:Agilent eclipse plus C18柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B);梯度洗脱程序:起始为11% A, 89% B;15 min时A为13.5%, B为86.5%;30 min时A为18%, B为82%,保持至40 min;65 min时A为49%, B为51%;70 min时A为11%, B为89%;检测波长:360 nm;进样量:10 μL ;流速:1.0 mL/min;柱温:35℃。

(2)对照品溶液的制备。分别精密称定各对照品适量,加甲醇制成浓度为1 mg/mL的番石榴苷、蒺藜苷、瑞诺苷、槲皮素对照品储备溶液,依次精密吸取各对照品储备溶液200、150、100、50、25、10 μL 于6个10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。

(3)标准曲线建立。根据标准品的峰面积(Y)与进样质量浓度(X)进行线性回归,得到标准品回归方程,番石榴苷: $Y=7.345X+0.052$ ($R^2=0.999$,线性范围为0.330~10.530 mg/L);蒺藜苷: $Y=3.396X$ -

62.936 ($R^2=0.999$, 线性范围为 0.324~10.940 mg/L); 瑞诺昔 $Y=7.613X+0.075$ ($R^2=0.999$, 线性范围为 0.334~10.190 mg/L); 槲皮素: $Y=11.599X-0.344$ ($R^2=0.999$, 线性范围为 0.366~10.480 mg/L)。根据标准曲线方程分别计算样品中 4 种黄酮成分的含量。

1.2.5 液质联用技术 (LC-MS) 分析番石榴叶代谢物 (1) 色谱条件。Thermo Vanquish 超高效液相系统, 使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (2.1×150 mm, 1.8 μ m, Waters, Milford, MA, USA), 流速为 0.25 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 2 μ L。正离子模式, 流动相为 0.1%甲酸水 (A2) 和 0.1%甲酸乙腈 (B2); 负离子模式, 流动相为 5 mol/L 甲酸铵水 (A3) 和乙腈 (B3), 梯度洗脱程序为: 正离子模式起始为 98% A2, 2% B2, 负离子模式起始为 98% A3, 2% B3, 保持至 1 min; 9 min 时 A2 为 50%, B2 为 50%, A3 为 50%, B3 为 50%; 12 min 时 A2 为 2%, B2 为 98%, A3 为 2%, B3 为 98%, 保持至 13.5 min; 14 min 时 A2 为 98%, B2 为 2%, A3 为 98%, B3 为 2%; 保持至 20 min。

(2) 质谱条件。Thermo Orbitrap Exploris 120 质谱检测器, 电喷雾离子源 (ESI)。正负离子喷雾电压分别为 3.50 kV、-2.50 kV, 毛细管温度为 325 $^{\circ}$ C, 一级全扫描分辨率为 60000, 离子扫描范围为 m/z 100~1000, 二级裂解分辨率为 15000。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力的测定 取不同处理组的番石榴叶提取液各 1 mL, 用氮气吹干, 分别复溶于一定体积的 80%乙醇溶液中, 制成待测样品溶液。参照 JIANG 等^[19]的方法测定: 于酶标板中分别加入 100 μ L 样品溶液与 100 μ L 0.15 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液, 混匀, 室温避光反应 30 min, 517 nm 处测定吸光度 (A_{s1})。以 100 μ L 体积分数为 80%的乙醇溶液分别代替 DPPH-乙醇溶液作为样品对照 (A_{b1})、代替样品溶液作为空白对照 (A_{c1}), 以 BHT 和 Vc 作为阳性对照。样品 DPPH 自由基清除率计算方式见公式 (1), 绘制清除率与样品溶液的质量浓度关系曲线, 根据曲线计算样品的 IC_{50} 值。以 IC_{50} 值表示样品的 DPPH 自由基清除能力。计算公式:

$$\text{自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_{s1} - A_{b1}}{A_{c1}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_{s1} 为样品组吸光度; A_{b1} 为样品对照组吸光度; A_{c1} 为空白对照组吸光度。

1.2.7 α -葡萄糖苷酶抑制能力的测定 取不同处理组的番石榴叶提取液各 1 mL, 用氮气吹干后, 分别复溶于一定体积的蒸馏水中, 制成待测样品溶液。参照李云嵌等^[18]的方法测定: 取样品溶液 50 μ L 与 α -葡萄糖苷酶溶液 25 μ L 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min 后加入 5 mmol/L PNPG 溶液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下恒温水浴 15 min, 加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 100 μ L 终止反应, 于 405 nm 下测定吸光值 (A_{s2})。以 25 μ L 蒸馏水代替 α -葡萄糖苷酶溶液作为样品对照 (A_{b2}), 以 50 μ L 蒸馏水代替样品溶液作为空白对照 (A_{c2}), 阿卡波糖为阳性对照。样品溶液的 α -葡萄糖苷酶抑制率通过公式 (2) 计算, 绘制抑制率与样品溶液的质量浓度关系曲线, 根据曲线计算样品的 IC_{50} 值。以 IC_{50} 值表示样品的 α -葡萄糖苷酶抑制能力。计算公式:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率} = \left(1 - \frac{A_{s2} - A_{b2}}{A_{c2}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_{s2} 为样品组吸光度; A_{b2} 为样品对照组吸光度; A_{c2} 为空白对照组吸光度。

1.3 数据处理

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件作图, 应用 SPSS 20.0 软件进行单因素 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 提取方法对番石榴叶内部结构的影响

样品结构的破坏程度与不同提取方式有直接关系。由图 1 可知, 对照组样品 (干燥番石榴叶粉末) 细胞壁结构完整, 均匀致密; ME 组样品表面呈现疏松结构, 但细胞壁结构大部分完整; HRE 组样品表面有少数部位穿孔, 形成小的空穴, 说明 HRE 对物料结构破坏力较小, 有效成分从物料中溶出有限; UAAE 和 UADEE 组样品表面出现更大的空穴结构。

2.2 提取方法对番石榴叶总黄酮、总皂苷、总酚提取效果的影响

本研究中不同组别番石榴叶有效成分如表 1 所示。UADEE 组番石榴叶总皂苷、总黄酮、总酚含量显著高于 ME、HRE、UAAE 组 ($P<0.05$)。在总皂苷和总黄酮的提取中, UAAE 与 HRE 组的提取效果差异不显著, 均显著优于 ME 组 ($P<0.05$); 但在总酚提取中, UAAE 与 ME 组差异不显著, 提取效果显著优于 HRE 组 ($P<0.05$)。

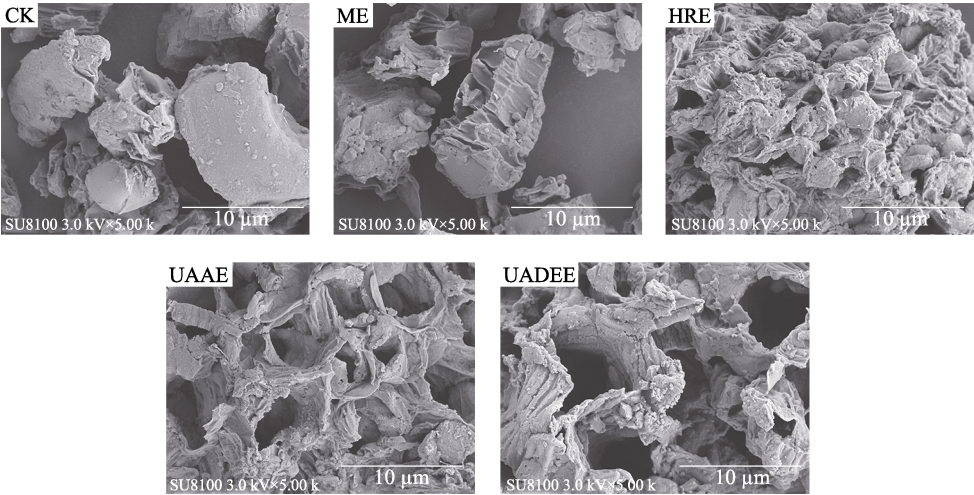


图 1 不同提取方法番石榴叶扫描电镜图像

Fig. 1 Scanning electron microscope images of guava leaves by different extraction

表 1 不同提取方法对番石榴叶中主要有效成分的影响

Tab. 1 Effects of different extract methods on main components of guava leaves

提取方法 Extract methods	总皂苷 Total saponins	总黄酮 Total flavonoids	总酚 Total phenols
ME	46.61±0.20 ^c	18.74±0.12 ^c	86.45±3.11 ^b
HRE	57.23±0.21 ^b	28.22±0.18 ^{bc}	61.34±4.32 ^c
UAAE	65.21±0.85 ^b	37.08±0.58 ^b	92.88±5.71 ^b
UADEE	79.28±0.33 ^a	80.51±0.29 ^a	120.52±5.14 ^a

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

2.3 提取方法对番石榴叶黄酮成分提取效果的影响

本研究中各组样品的 HPLC 色谱图如图 2 所

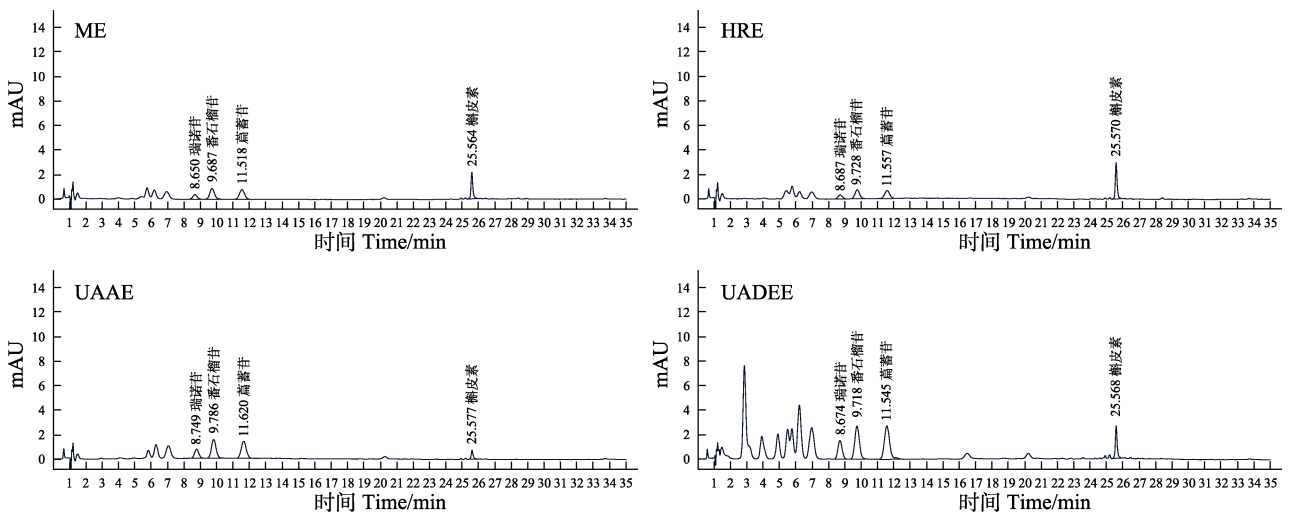


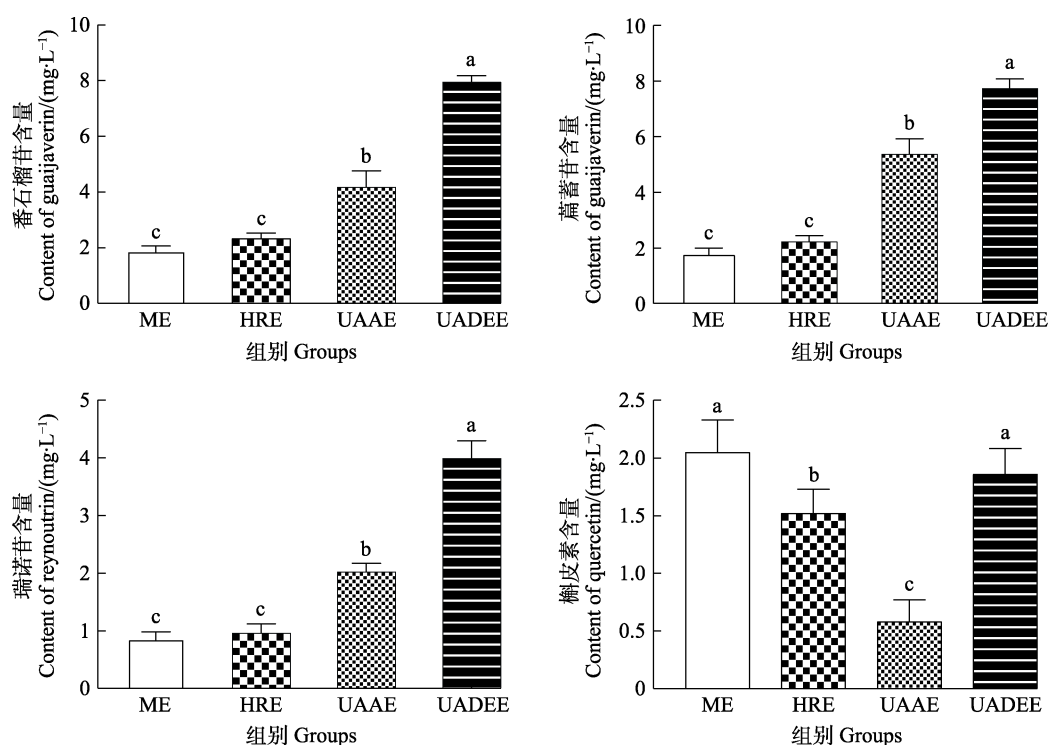
图 2 不同提取方法番石榴叶样品黄酮成分 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC of flavonoids in guava leaves by different extraction methods

示，4 种黄酮成分含量如图 3 所示。UADEE 组 4 种黄酮成分总含量 (21.57 mg/L) 显著高于其他 3 组 ($P<0.05$)。ME 组的番石榴苷、蒽薹苷、瑞诺苷含量分别为 1.88、1.82、0.87 mg/L，UAAE 和 UADEE 组中这 3 种黄酮成分含量均显著高于 ME 组 ($P<0.05$)。其中番石榴苷含量在 UAAE、UADEE 组中分别为 4.03、7.96 mg/L，蒽薹苷含量分别为 3.94、7.74 mg/L，瑞诺苷含量分别为 1.92、3.99 mg/L。ME、UADEE 组中槲皮素含量最高，分别为 2.05、1.86 mg/L，显著高于 HRE 组 (1.49 mg/L) 和 UAAE 组 (0.51 mg/L) ($P<0.05$)。

2.4 番石榴叶代谢物检测分析

为探讨提取方式对番石榴叶主要有效成分黄酮、皂苷和酚类物质的影响，基于 LC-MS 对番石



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

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

图 3 不同提取方法番石榴叶 4 种黄酮成分含量

Fig. 3 Contents of flavonoids in guava leaves by different extraction methods

榴叶提取液进行非靶向检测, 得到提取液的正负离子采集谱图 (图 4)。代谢物的鉴定首先根据精确分子量进行确认, 后续将 MS/MS 碎片模式与 Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>)、LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>)、mzCloud (<https://www.mzcloud.org>) 以及帕诺米克自建标准品数据库确认注释获得代谢物。从番石榴叶提取液中鉴定出黄酮类代谢物 44 种, 三萜类代谢物 10 种, 酚类代谢物 13 种。采用峰面积归一法计算黄酮类成分、三萜类成分和酚类成分相对含量, 如图 5 所示, ME、HRE、UAAE 和 UADEE 处理组中黄酮类成分在番石榴叶总代谢物中分别为 9.830%、9.714%、11.493% 和 12.208%; 三萜类成分分别为 15.815%、21.706%、26.286% 和 27.267%; 酚类成分分别为 0.731%、0.930%、0.773% 和 1.013%。番石榴叶中相对含量最高的 10 种黄酮类成分为槲皮素、木犀草素、杨梅苷、染料木素、异牡荆素、水飞蓟素、表儿茶素、黄芩素、去甲基陈皮素和芦丁, 最主要的三萜类物质为熊果酸、山楂酸、黄柏酮、雷公藤红素和 Fasciclic acid B, 主要的酚类物质为鞣花酸、香兰素、羟基酪醇、高原儿茶酸和姜酮酚。不同

提取方法对番石榴叶不同代谢物的提取效果具有明显差异, UADEE 处理的提取液中槲皮素、染料木素、芦丁、熊果酸的含量高于其他 3 种处理方法, 而杨梅苷、异牡荆素和山楂酸的含量则较低。

2.5 不同提取方法对番石榴叶生物活性的影响

番石榴叶提取物 DPPH 清除率和 α -葡萄糖苷酶抑制率的 IC_{50} 值如图 6 所示, 各组样品 DPPH 清除率和 α -葡萄糖苷酶抑制率差异显著。4 个提取处理中, UADEE 组 DPPH 自由基的清除能力和 α -葡萄糖苷酶抑制活性均最强 ($P < 0.05$), IC_{50} 值分别为 $45.18 \mu\text{g/mL}$ 和 $904.67 \mu\text{g/mL}$, DPPH 清除能力与阳性对照组 Vc 水平相当, 但弱于抗氧化剂 BHT, α -葡萄糖苷酶抑制活性显著弱于阳性降糖药物阿卡波糖。

3 讨论

本研究结合内部显微结构、功能成分及其生物活性, 联合评价 ME、HRE、UAAE 与 UADEE 四种提取方法对番石榴叶的提取效果。结果表明 UAAE 与 UADEE 两种处理极大地破坏了细胞内部结构, 这是由于植物细胞壁在超声的机械效应和化学效应下发生破裂, 使物料结构疏松, 从而

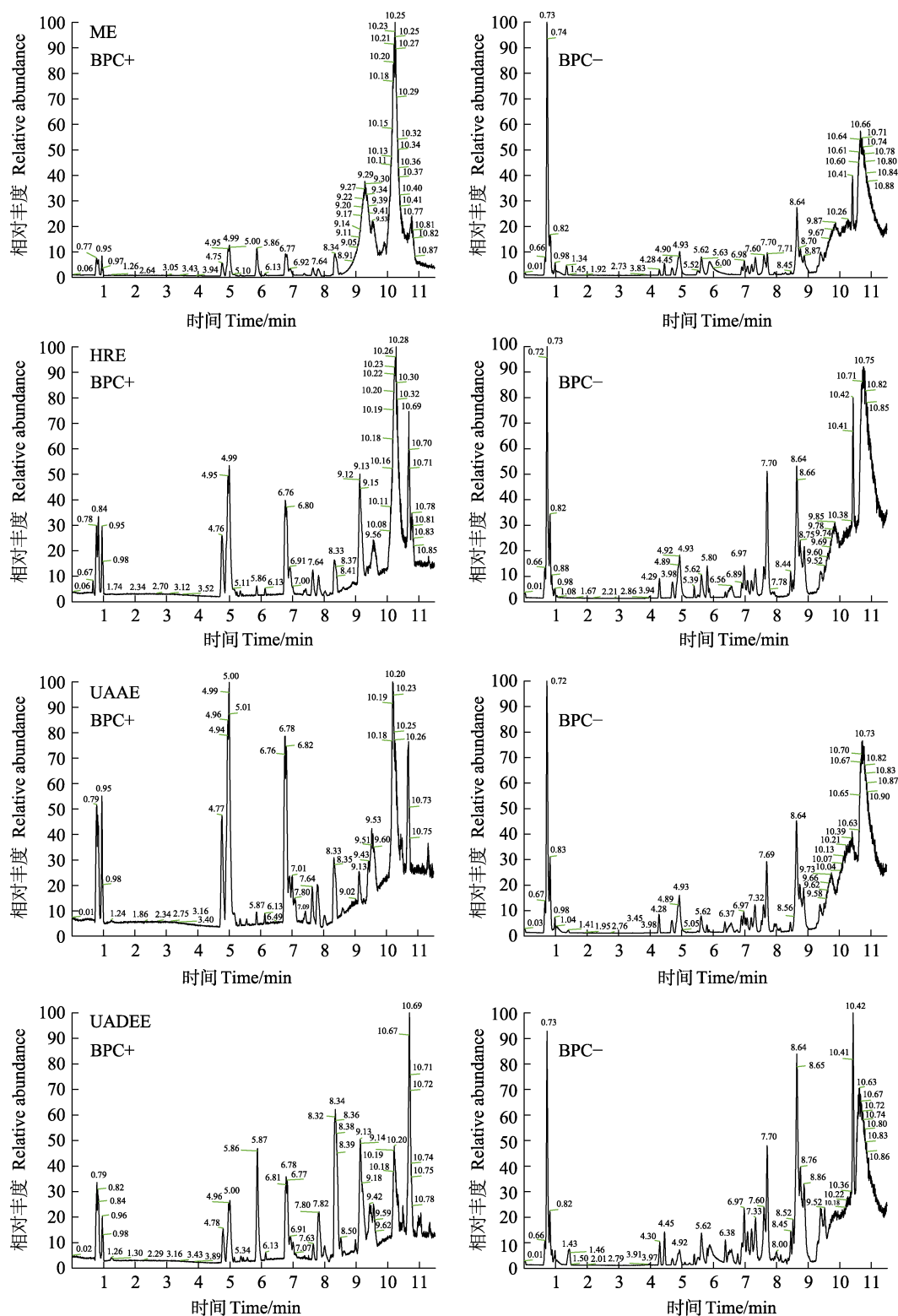


图 4 番石榴叶提取液 LC-MS 谱图

Fig. 4 Separate LC-MS spectra of guava leaves extract

加速植物中有效成分的扩散和溶出^[20]。超声波的空化效应,促使溶剂更大程度地渗入细胞中,不断刺激胞内腺体,增加传质速率^[21]。皂苷、黄酮和酚类物质是番石榴叶的主要有效成分,提取溶

剂对目标成分的溶解度是影响提取率的关键因素之一。黄酮和酚类的提取通常采用回流法或超声辅助有机试剂法, 皂苷的提取通常采用超声波辅助表面活性剂增溶技术^[15, 22-23], 如薯蓣皂苷、三

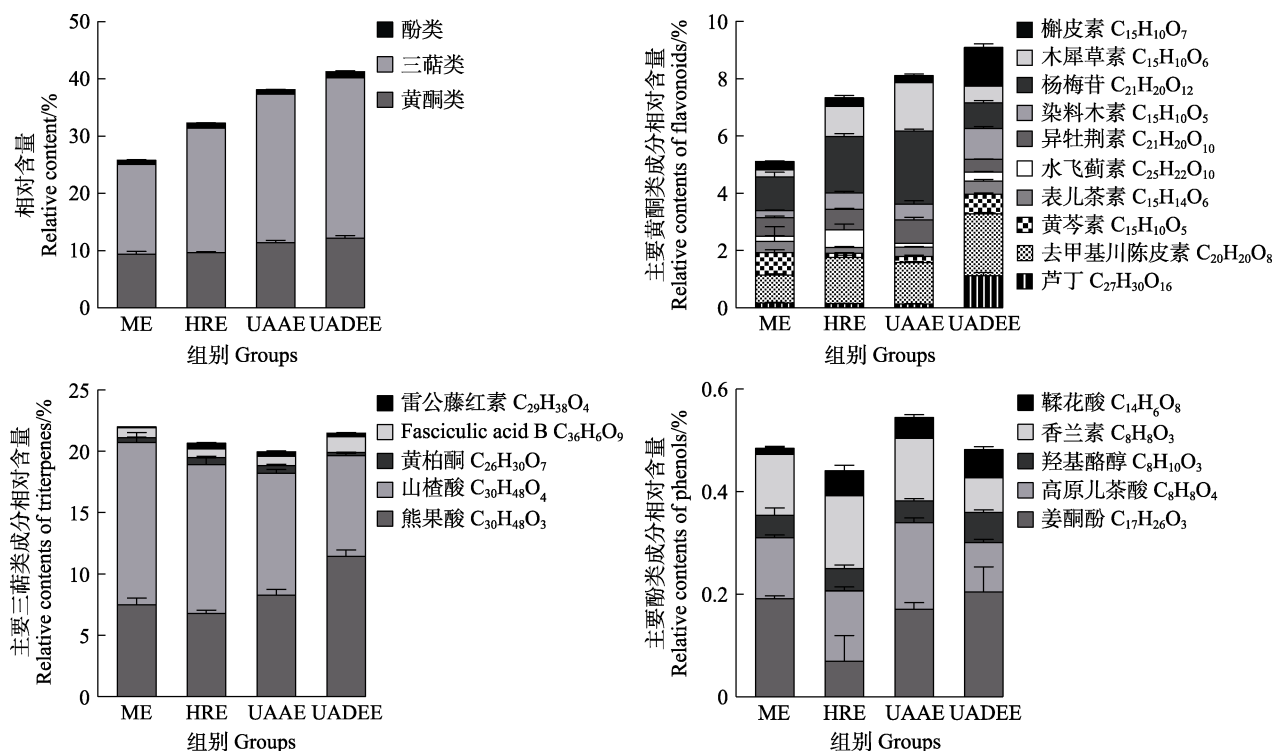
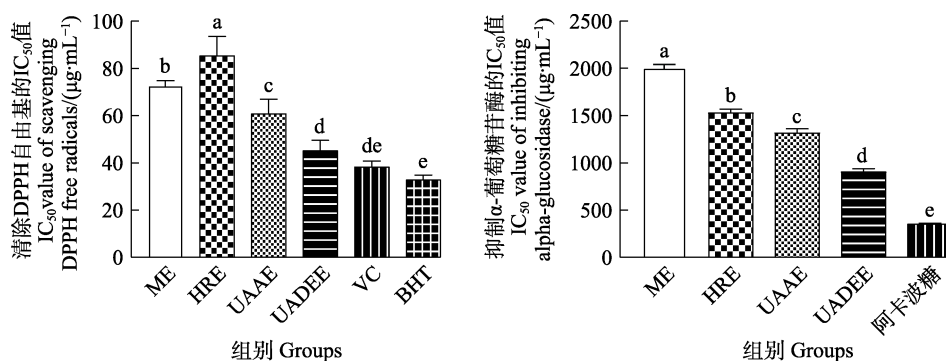


图 5 不同提取方法番石榴叶黄酮类、三萜类和酚类代谢物相对含量

Fig. 5 Contents of flavonoids, triterpenoids and phenolic metabolites in guava leaves by different extraction methods



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

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

图 6 不同提取方法对番石榴叶功能活性的影响

Fig. 6 Effects of different extraction methods on functional activities of guava leaves

七花总皂苷和苦味皂苷等。本研究中 UAEE 组的总黄酮提取率为 8.05%，高于目前研究中回流或超声提取等方法的番石榴叶总黄酮提取率 (0.497%~5.12%^[5, 24-25])，但低于蒋利荣等^[10]研究中 UAEE 法的总黄酮提取率 (15.97%~22.06%)。马连荣等^[26]、鄢文等^[27]测定番石榴叶中总皂苷含量为 7.08 mg/mL 和 15.14 mg/mL，本研究中各组总皂苷含量为 46.61~79.28 mg/g，其中 UAEE 组提取率比 ME 组提高 70.09%，比 UAAE 组提高 21.58%，而陈冉等^[8]利用 UAEE 提取鸡骨草总皂苷，提取率比传统有机试剂提取法提高

96.4%，这些差异可能与 DES 氢键配体受体的组成及 DES 溶剂含水率等因素有关。

番石榴叶中的代表性黄酮类成分为槲皮素、番石榴苷、蒽薹苷 (广寄生苷) 和瑞诺苷等，其含量是衡量番石榴叶药材品质优劣的一个重要指标。方皓等^[3]以 60% 乙醇超声提取 30 min 后测到这 4 种黄酮成分的总含量约为 58.3 mg/g，本研究 UAEE 组 4 种黄酮成分总含量为 21.57 mg/L，显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$)，与总黄酮测定结果趋势一致；其中番石榴苷和蒽薹苷总含量为 15.70 mg/g，高于朱晓艾等^[28]采用 64.6% 乙醇提取

81 min 的含量,测出的番石榴苷和蒽薹苷最高总含量为 6.74 mg/g。ME 组提取体系缺乏浓度差, HRE 组较高的提取温度则会导致皂苷发生脱羧、脱糖、脱水反应而转化;某些稳定性差的酚类、黄酮类物质也易受温度的影响,发生氧化、聚合或分解等反应,从而影响提取率^[29-30];而组成 DES 的组分间协同效应使其对番石榴叶有效成分具有增溶作用,因而造成提取效果的差异。此前研究者们从番石榴叶分离得到一系列黄酮及其各类糖苷与苷元,包括槲皮素、芹菜素、杨梅素、儿茶素、胶藤素、去甲氧基荚果蕨素、山奈酸、蒽薹苷、金丝桃苷、异槲皮苷等^[13, 31-32]。本研究基于 LC-MS 非靶向测定出黄酮类成分 44 种,三萜类成分 10 种、酚类成分 13 种。槲皮素是多种黄酮苷的苷元,据报道,芦丁、槲皮素等代谢物在 DES 中的溶解度是在水中的十倍至数十万倍^[33],本实验中 UADEE 组提取到的芦丁和槲皮素含量显著高于 UAAE 组。熊果酸是番石榴叶中主要的三萜类成分,被证实是番石榴叶主要的降血糖活性成分,本研究中 UADEE 对熊果酸的效果最优;多酚成分鞣花酸具有与槲皮素相当或更高的抗氧化活性^[34],其可能也是番石榴叶发挥抗氧化活性的有效成分。以上研究进一步丰富了番石榴叶的药效物质基础。此外,本研究结果表明提取方法对番石榴叶不同代谢物的溶出具有重要影响,为番石榴叶特定成分的提取与利用提供参考。

DPPH 目前被广泛用于抗氧化剂清除自由基能力的快速评价, α -葡萄糖苷酶被认为是 II 型糖尿病的重要靶标^[35]。此前赵玉静等^[12]发现番石榴叶醇提液中的 6 个黄酮类化合物,均具有显著抗氧化活性。张婷婷^[2]研究中表明三萜皂苷类物质为番石榴叶降血糖活性物质。本研究发现各组番石榴叶提取物 DPPH 清除率和 α -葡萄糖苷酶抑制率差异显著, HRE 组 DPPH 的清除能力最弱, ME 组的 α -葡萄糖苷酶抑制率最低, UADEE 组 DPPH 自由基的清除能力和 α -葡萄糖苷酶抑制活性均最强($P<0.05$)。这与番石榴叶有效成分总皂苷、总黄酮和总酚含量测定结果趋势一致,表明这 3 种成分可能是番石榴叶抗氧化和降糖功能的发挥的活性成分。综上,不同提取方式下(ME、HRE、UAAE、UADEE)番石榴叶有效成分含量与生物活性差异显著,综合而言, UADEE 法对番石榴叶的有效成分提取效果最佳,研究结果可为提高番石榴副产物的综合利用率提供实验依据。

参考文献

- [1] 汪梅花, 魏文浩, 吴振强. 番石榴叶的生物活性研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2215-2219.
WANG M H, WEI W H, WU Z Q. Research progress on bioactivity of guava leaves[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(10): 2215-2219. (in Chinese)
- [2] 张婷婷. 番石榴叶三萜类成分的含量测定与特征图谱研究[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
ZHANG T T. Studies on the content determination and specific chromatogram of the triterpenes from *Psidium guajava* leaves[D]. Guangzhou: Jinan University, 2014. (in Chinese)
- [3] 方皓, 熊素琴, 燕娜娜, 陈林, 陈鸿平, 刘友平. 一测多评法测定番石榴叶中 6 种黄酮类成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1559-1566.
FANG H, XIONG S Q, YAN N N, CHEN L, CHEN H P, LIU Y P. Simultaneous determination of six flavonoids in *Psidium guajava* Linn. by QAMS[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(9): 1559-1566. (in Chinese)
- [4] 陈智理, 杨昌鹏, 郭静婕, 赵永锋, 韦璐. 番石榴叶多酚提取工艺的优化[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1856-1860.
CHEN Z L, YANG C P, GUO J J, ZHAO Y F, WEI L. Extraction process optimization of polyphenol from guava leaf[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(10): 1856-1860. (in Chinese)
- [5] 秦苗苗, 何瑞娟, 郭莹, 杨惠鑫, 熊阳. 番石榴叶总黄酮提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(9): 2136-2139.
QIN M M, HE R J, GUO Y, YANG H X, XIONG Y. Study on guava leaf flavonoids extraction technology and antibacterial activity[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2015, 33(9): 2136-2139. (in Chinese)
- [6] 孙颖, 李宗泽, 徐晋, 孙京格, 白雨禾, 贺晓阳, 韩冉, 石磊. 番石榴叶多糖超声波细胞粉碎辅助提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(22): 106-112.
SUN Y, LI Z Z, XU J, SUN J G, BAI Y H, HE X Y, HAN R, SHI L. Ultrasonic cell crushing-assisted extraction and antioxidant activity *in vitro* of guava leaf[J]. Food Research and Development, 2022, 43(22): 106-112. (in Chinese)
- [7] 巫永华, 王解语, 黄莉莉, 潘斯岑, 张建萍, 刘恩岐. 牛蒡多酚超声波辅助低共熔溶剂提取工艺优化、生物活性评价及组分分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 171-179.
WU Y H, WANG J Y, HUANG L L, PAN S C, ZHANG J P, LIU E Q. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction process, biological activities and components of burdock polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 171-179. (in Chinese)

- [8] 陈冉, 李德慧, 阮桂发, 刘珊, 孙科, 黄锁义, 欧阳熙林. 基于绿色低共熔溶剂法高效提取鸡骨草中的黄酮和皂苷[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1632-1640.
CHEN R, LI D H, RUAN G F, LIU S, SUN K, HUANG S Y, OUYINAG X L. Green and efficient extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance by deep eutectic solvents[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(9): 1632-1640. (in Chinese)
- [9] 黄露. 低共熔溶剂提取枇杷叶三萜酸研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
HUANG L. Extraction of triterpene acids from loquat leaves via deep eutectic solvent[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023. (in Chinese)
- [10] 蒋利荣, 何海燕, 覃拥灵, 陈莉莉, 伍荟西, 莫倩涵, 冯建海, 张高荣. 超声辅助绿色低共熔溶剂提取番石榴叶总黄酮的工艺研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(12): 72-76.
JIANG L R, HE H Y, QIN Y L, CHEN L L, WU H X, MO Q H, FENG J H, ZHANG G R. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from guava leaves by natural deep eutectic solvents[J]. Feed Research, 2022, 45(12): 72-76. (in Chinese)
- [11] 陈欣怡, 黄积武, 李创军, 马洁, 臧应达, 张东明. 番石榴叶乙醇提取物的化学成分研究[J]. 药学研究, 2021, 40(7): 432-436.
CHEN X Y, HUANG J W, LI C J, MA J, ZANG Y D, ZHANG D M. Study on chemical constituents of ethanol extract from Guava leaves[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2021, 40(7): 432-436. (in Chinese)
- [12] 赵玉静, 李建宽, 张鑫, 高建平. 番石榴叶黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 760-765.
ZHAO Y J, LI J K, ZHANG X, GAO J P. Study on antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Psidium guajava*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(4): 760-765. (in Chinese)
- [13] 符春丽, 彭燕, 黎诗敏, 肖生鸿, 陈华絮. 番石榴叶乙酸乙酯萃取物的体外抗氧化活性及化学成分的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 52-57, 20.
FU C L, PENG Y, LI S M, XIAO S H, CHEN H X. Isolation and identification of chemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of ethyl acetate extracts from *Psidium guajava* Linn leaves[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 52-57, 20. (in Chinese)
- [14] 王慧. 低共熔溶剂在黄芩有效成分提取及制备中的应用研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
WANG H. Application of deep eutectic solvents in extraction and preparation of active ingredient of *Scutellaria baicalensis* Georgi[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019. (in Chinese)
- [15] 陈红惠, BELWAL T, 李刚凤, 罗自生. 表面活性剂协同超声波酶法提取三七花总皂苷工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(20): 178-186.
CHEN H H, BELWAL T, LI G F, LUO Z S. Enzymolysis-ultrasound-assisted surfactant extraction and antioxidant activity of saponins from *Panax notoginseng* flowers[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20): 178-186. (in Chinese)
- [16] 刘玉明, 李珂娴, 何颖, 刘琼, 沈先荣, 陈秀丽, 谢海霞. $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定枇杷花水提液中总黄酮含量[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 248-251.
LIU Y M, LI K X, HE Y, LIU Q, SHEN X R, CHEN X L, XIE H X. Research on determination of total flavonoids content in water extraction of flowers of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2018, 36(1): 248-251. (in Chinese)
- [17] 黎海彬, 张敏, 王邕, 郭宝江, 李琳. 罗汉果中三萜皂苷的含量测定[J]. 食品科学, 2006(6): 171-173.
LI H B, ZHANG M, WANG Y, GUO B J, LI L. Colorimetric determination of triterpenoid saponin in Luohanguo[J]. Food Science, 2006(6): 171-173. (in Chinese)
- [18] 李云崧, 何霞红, 吴光顺, 满金花, 张雪春, 王振兴. 干燥方式对三七叶主要活性成分、体外抗氧化、 α -葡萄糖苷酶抑制活性、挥发性成分和代谢物的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 98-113.
LI Y X, HE X H, WU G S, MAN J H, ZHANG X C, WANG Z X. Effect of drying method on the major active components, *in vitro* antioxidant activity, α -glucosidase inhibitory activity, volatile components, and metabolites of *Panax notoginseng* leaves[J]. Food Science, 2023, 44(21): 98-113. (in Chinese)
- [19] JIANG W, ZHOU X. Hydrolysis of radish anthocyanins to enhance the antioxidant and antiproliferative capacities[J]. Food chemistry, 2019, 294: 477-485.
- [20] MA Y Q, YE X Q, WU H J, ZHOU Z Q, WANG H, SUN Z G. Advances in ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from plants[J]. Food Science, 2010, 31(21): 459-463.
- [21] 刘星宇, 廖艺超, 王壹, 田清云, 谢可馨, 欧洪. 超声波联用技术在植物活性成分提取中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 319-327.
LIU X Y, LIAO Y C, WANG Y, TIAN Q Y, XIE K X, OU H. Research progress on application of ultrasound hyphenated technique in extraction of active phytochemicals[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(14): 319-327. (in Chinese)
- [22] 李祥, 师春兰, 王丽萍. 超声波辅助下薯蓣皂苷萃取中影

- 响因素的研究[J]. 日用化学工业, 2015, 45(5): 279-281, 297.
- LI X, SHI C L, WANG L P. Study on factors that affect the extraction of dioscin under assistance of ultrasonic wave[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2015, 45(5): 279-281, 297. (in Chinese)
- [23] 唐楷, 颜杰. 微波-表面活性剂协同萃取苦瓜皂苷的工艺研究[J]. 食品科技, 2015, 40(11): 181-184.
- TANG K, YAN J. Microwave-surfactant assisted extraction of saponin from *Momordica charantia* L.[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(11): 181-184. (in Chinese)
- [24] 谢郁峰, 陈日佳, 严春艳. 响应面法优化番石榴叶总黄酮的超声提取工艺[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(4): 417-421.
- XIE Y F, CHEN R J, YAN C Y. Optimization of ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from leaves of *Psidium guajava* by response surface methodology[J]. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy, 2014, 30(4): 417-421. (in Chinese)
- [25] LI J K, WU C C, LI F, YU R L, WU X L, SHEN L, LIU Y D, ZENG W M. Optimization of ultrasound-assisted water extraction of flavonoids from *Psidium guajava* leaves by response surface analysis[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, 49(1): 21-29.
- [26] 马连荣, 黄丽秀, 欧丽兰, 田芳年, 莫肖云, 黄锁义. 大孔吸附树脂分离纯化番石榴叶总皂苷的工艺研究[J]. 化工技术与开发, 2009, 38(8): 4-6.
- MA L R, HUANG L X, OU L L, TIAN F N, MO X Y, HUANG S Y. Separation and purification of total saponins from guava leaf with macroporous absorptive resin[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2009, 38(8): 4-6. (in Chinese)
- [27] 鄢文, 程冰洁, 刘强, 任沁沁, 陈宝田, 周迎春. 大孔吸附树脂纯化番石榴叶总皂苷的工艺研究[J]. 安徽中医学院学报, 2008(1): 49-51.
- YAN W, CHENG B J, LIU Q, REN Q Q, CHEN B T, ZHOU Y C. Purification process of total saponin of *Psidium guajava* L. with SA-1 macroreticular resin[J]. Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College, 2008(1): 49-51. (in Chinese)
- [28] 朱晓艾, 欧阳文, 蔡喆俊, 张帅, 陈运娇, 刘晓娟, 陈海, 冯细妹, 曹庸. 番石榴叶中番石榴苷、广寄生苷的提取及其大鼠脂肪细胞模型降糖活性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(11): 100-107.
- ZHU X A, OUYANG W, CAI Z J, ZHANG S, CHEN Y J, LIU X J, CHEN H, FENG X M, CAO Y. Extraction of guaijaverin and avicularin from guava leaves and their hypoglycemic activity on rat adipocyte model[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(11): 100-107. (in Chinese)
- [29] KESSY H N E, HU Z Y, ZHAO L, ZHOU M L. Effect of steam blanching and drying on phenolic compounds of litchi pericarp[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2016, 21(6): 729.
- [30] MBONDO N N, OWINO W O, AMBUKO J, SILA D N. Effect of drying methods on the retention of bioactive compounds in African eggplant[J]. Food Science & Nutrition, 2018, 6(4): 814-823.
- [31] ARIMA H, DANNO G I. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.)[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2002, 66(8): 1727-1730.
- [32] 吴慧星, 李晓帆, 李荣, 李玲, 王乃利. 番石榴叶中抗氧化活性成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1593-1597.
- WU H X, LI X F, LI R, LI L, WANG N L. Study on anti-oxidative components from leaves of *Psidium guajava*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(10): 1593-1597. (in Chinese)
- [33] MORRISON H G, SUN C C, NEERVANNAN S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 378: 136-139.
- [34] 郭增军, 谭林, 徐颖, 吴楠. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 519-524, 540.
- GUO Z J, TAN L, XU Y, WU N. Distribution of ellagic acids in plantae and their bioactivities[J]. Natural Product Research and Development, 2010, 22(3): 519-524, 540. (in Chinese)
- [35] 张露, 刘鹏飞, 涂宗财, 张恕雅, 沙小梅, 王辉, 戴花剑. 香榧不同部位提取物的抗氧化和酶抑制活性比较分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 78-83.
- ZHANG L, LIU P F, TU Z C, ZHANG S Y, SHA X M, WANG H, DAI H J. Comparison of antioxidant activity and enzyme inhibitory activity of different plant parts of *Torreya grandis* cv. Merrillii[J]. Food Science, 2018, 39(10): 78-83. (in Chinese)