

# 一测多评法测定番石榴叶中 6 种黄酮类成分的含量

方皓,熊素琴,燕娜娜,陈林,陈鸿平,刘友平\*

成都中医药大学药学院 中药材质量标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137

**摘要:**为建立同时测定番石榴叶中 6 种黄酮类成分(金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素)的一测多评法。本研究以金丝桃苷为内参物,采用 HPLC 法,确定金丝桃苷与另外 5 种成分的相对校正因子,并通过获得的校正因子计算后 5 种成分的量;同时采用外标法测定 11 批番石榴叶的含量。结果表明 11 批番石榴叶的 QAMS 法与外标法测定结果间无显著性差异,证明该法可用于番石榴叶 6 种黄酮类成分的定量分析。

**关键词:**一测多评法;番石榴叶;相对校正因子;定量分析

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1559-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.011

## Simultaneous determination of six flavonoids in *Psidium guajava* Linn. by QAMS

FANG Hao, XIONG Su-qin, YAN Na-na, CHEN Lin, CHEN Hong-ping, LIU You-ping\*

Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines

Co-construction by Ministry of Science and Technology and Sichuan Province, Chengdu 611137, China

**Abstract:** In this study, a new method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method was developed for simultaneously determining six flavonoids (hyperoside, isoquercitrinose, reynoutrin, guaijaverin, avicularin, taxifolin) in *Psidium guajava* Linn. . Using hyperoside as the internal reference marker, the relative correction factor (RCF) of hyperoside for other five chemical components was established by HPLC, and the content of other five components were calculated by RCFs. Meanwhile, the contents were also determined by the external standard method. The results indicated that no significant differences between QAMS and external standard method. Therefore, QAMS is suitable for quantitative analysis of six flavonoids in *Psidium guajava* Linn. .

**Key words:** quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); *Psidium guajava* Linn.; relative correction factor (RCF); quantitative analysis

番石榴叶为桃金娘科番石榴属乔木番石榴(*Psidium guajava* Linn.)的叶,具有涩肠止泻、收敛止血的功效,用于治疗泄泻,下痢不止,湿疹瘙痒,跌打损伤,创伤出血<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,番石榴叶中含有的黄酮类、酚类、萜烯、三萜类等化学成分具有抗菌、抗肿瘤、降血糖、抗氧化等作用<sup>[2-6]</sup>。

一测多评法是利用中药有效成分内在函数关系和比例关系,只以一个对照品为参照物(对照品廉价、稳定、易得),实现多个成分(对照品相对价高难得)的同步测定,这是一种中药多成分同步质量控

制的新模式<sup>[7]</sup>。

黄酮类化合物作为番石榴叶的主要活性成分,现有番石榴叶药材质量标准中并未对其黄酮类成分含量进行测定,导致药材质量难以控制。虽然也文献报道番石榴叶中多种黄酮类成分同时测定的方法<sup>[8,9]</sup>,但需要购买多个对照品,且操作繁琐,在实际质量控制中难以广泛普及与应用。本实验通过一测多评法(QAMS)同时测定番石榴叶中金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的含量,旨在为番石榴叶药材质量控制与评价提供新方法。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1260AT 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

司);HPLC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);BN3000 型万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司);CP2000 型十万分子一电子天平(德国 Sartorius 公司);UPTO-I-1000TE 优普系列超纯水机(成都纯水科技有限公司);SG8200HDT 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)。

## 1.2 材料

金丝桃苷(批号:wkq18111901)、异槲皮苷(批号:wkq18022308)、瑞诺昔(批号:PS000436)、番石榴苷(批号:wkq18111404)、萹蓄苷(批号:

PS000159)、槲皮素(批号:wkq18030806),纯度均为 HPLC  $\geq 98\%$ ,所有对照品均购于四川省维克奇生物科技有限公司;乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 有限公司);甲醇、无水乙醇(分析纯,成都市科龙化工试剂厂)。

## 1.3 药材

11 批番石榴叶药材购自成都通灵中药饮片精选有限公司,经成都中医药大学严铸云教授鉴定为桃金娘科番石榴属植物番石榴(*Psidium guajava* Linn.)的叶,样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	产地 Origin	批号 Batch No.
Y1	云南省永胜县仁里村 Renli, Yongsheng, Yunnan	20180301
Y2	四川省德昌县乐跃镇(河坝) Leyue, Dechang, Sichuan (Heba)	20180301
Y3	广西省百色市 Baise, Guangxi	20180301
Y4	四川省德昌县乐跃镇(山上) Leyue, Dechang, Sichuan (Mountain)	20180302
Y5	四川省米易县撒莲村 Salian, Miyi, Sichuan	20180302
Y6	云南省丽江市华坪县 Huaping, Lijiang, Yunnan	20180302
Y7	四川省攀枝花市同德镇 Tongde, Panzhihua, Sichuan	20180303
Y8	四川省德昌县金沙乡 Jinsha, Dechang, Sichuan	20180303
Y9	广西省百色市委陇村 Weilong, Baise, Guangxi	20180303
Y10	贵州省兴义市巧马村 Qiaoma, Xingyi, Guizhou	20180304
Y11	贵州省兴义市者岩村 Zeyan, Xingyi, Guizhou	20180304

## 2 方法与结果

### 2.1 测定方法的建立

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B);梯度洗脱(0 ~ 15 min, 11% ~ 13.5% A; 15 ~ 30 min, 13.5% ~ 18% A; 30 ~ 40 min, 18% A; 40 ~ 65 min, 18% ~ 49% A; 65 ~ 70 min, 49% ~ 11% A);检测波长:360 nm;进样量:10  $\mu\text{L}$ ;流速:1.0 mL/min;柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

分别取各对照品适量,精密称定,加甲醇制成金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素浓度分别为 1.172、1.121、1.093、1.102、1.188、1.154 mg/mL 的对照品储备溶液,依次精密吸取各对照品储备溶液 150、100、150、150、200、200  $\mu\text{L}$ ,置

同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 4 号筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇 25 mL,称定重量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用 60% 乙醇补足减少质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

分别精密吸取上述混合对照品溶液与供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,测定,结果见图 1。

#### 2.1.4 线性关系考察

取“2.1.2”项下制备的混合对照品溶液 1、3、7、10、15、20  $\mu\text{L}$ ,按“2.1.1”项下色谱条件测定,每个浓度进样 3 次,取平均值。以对照品进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,结果表明各化合物在相应范围内线性关系良好(见表 2)。

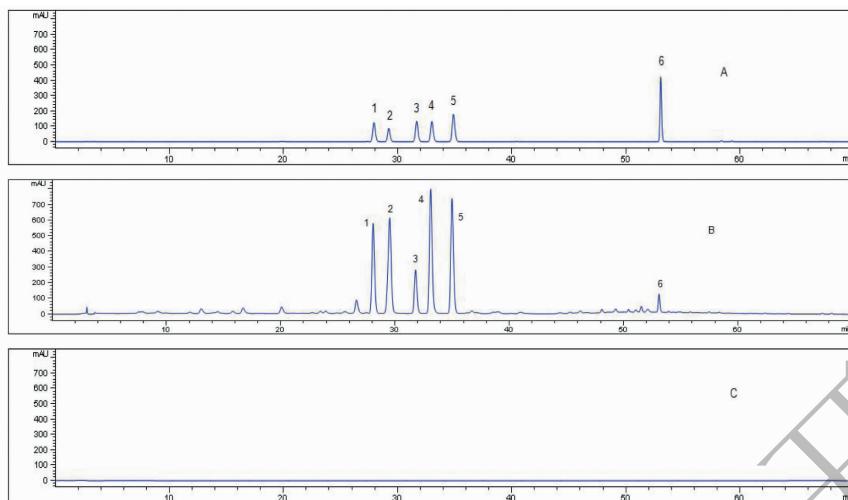


图1 混合对照品(A)、番石榴叶样品(B)及阴性对照(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC of reference substances(A), *Psidium guajava* sample(B) and negative control(C)

注:1. 金丝桃苷;2. 异槲皮苷;3. 瑞诺苷;4. 番石榴苷;5. 蒜薹苷;6. 槲皮素。Note:1. Hyperoside;2. Isoquercitrinose;3. Reynoutrin;4. Guaijaverin;5. Avicularin;6. Taxifolin.

表2 6种黄酮类成分线性关系考察  
Table 2 Linearities of six kinds of flavonoids

对照品 Reference substance	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient( <i>r</i> )	线性范围 Linearity(μg)
金丝桃苷 Hyperoside	$Y = 11.091X + 5.576$	0.999 9	0.0175 8 ~ 0.351 6
异槲皮苷 Isoquercitrinose	$Y = 11.831X + 3.93$	0.999 9	0.0112 1 ~ 0.224 2
瑞诺苷 Reynoutrin	$Y = 12.832X + 5.058$	0.999 9	0.016 4 ~ 0.327 9
番石榴苷 Guaijaverin	$Y = 12.919X + 5.596$	0.999 9	0.016 37 ~ 0.327 3
蒜薹苷 Avicularin	$Y = 12.340X + 6.879$	0.999 9	0.023 76 ~ 0.475 2
槲皮素 Taxifolin	$Y = 18.217X + 4.673$	0.999 9	0.023 08 ~ 0.461 6

### 2.1.5 相对校正因子计算

以金丝桃苷为内参物,精密吸取混合对照品溶液1、3、5、7、10、15、20 μL,进行分析,记录各成分峰

面积,计算金丝桃苷对异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、蒜薹苷、槲皮素的相对校正因子,结果见表3。

表3 相对校正因子测定结果

Table 3 The results of relative correction factor(RCF)

进样量 Sample volume (μL)	f 金丝桃苷/异槲皮素 Hyperin/Isoquercitrinose	f 金丝桃苷/ 瑞诺苷 Hyperin/ Reynoutrin	f 金丝桃苷/ 番石榴苷 Hyperin/ Guaijaverin	f 金丝桃苷/ 蒜薹苷 Hyperin/ Avicularin	f 金丝桃苷/ 槲皮素 Hyperin/ Taxifolin
1	0.937 4	0.866 1	0.857 8	0.900 3	0.616 8
3	0.936 6	0.865 0	0.858 7	0.899 7	0.611 7
7	0.937 2	0.865 1	0.859 1	0.899 5	0.610 6
10	0.937 1	0.864 7	0.858 5	0.899 4	0.610 3

续表3(Continued Tab. 3)

进样量 Sample volume ( $\mu\text{L}$ )	$f$ 金丝桃苷/异槲皮素 Hyperin/Isoquercitrinose	$f$ 金丝桃苷/ 瑞诺昔 Hyperin/ Reynoutrin	$f$ 金丝桃苷/ 番石榴苷 Hyperin/ Guaijaverin	$f$ 金丝桃苷/ 萹蓄苷 Hyperin/ Avicularin	$f$ 金丝桃苷/ 槲皮素 Hyperin/ Taxifolin
15	0.937 9	0.865 3	0.859 4	0.899 9	0.609 8
20	0.937 1	0.864 2	0.858 2	0.898 5	0.609 1
平均值 Average	0.937 2	0.865 1	0.858 6	0.899 6	0.611 4
RSD(%)	0.04	0.08	0.07	0.07	0.45

### 2.1.6 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样6次,每次10  $\mu\text{L}$ ,记录各成分峰面积并计算得到金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的峰面积RSD值分别为1.10%、1.13%、1.12%、1.12%、1.12%,表明仪器精密度良好。

### 2.1.7 重复性试验

取Y1样品按“2.1.3”项下方法制备6份供试品溶液,进样分析,结果金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的峰面积RSD值分别为0.97%、0.90%、0.79%、0.87%、0.82%、1.58%,表明该方法重复性良好。

### 2.1.8 稳定性试验

取“2.1.3”项中供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24、36 h进样分析,记录各成分峰面积并计算得

到金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的峰面积RSD值分别为0.26%、0.30%、0.41%、0.32%、0.35%、0.64%,表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

### 2.1.9 加样回收率试验

取同一批已知6种成分含量的番石榴叶供试品粉末约0.5 g,精密称定,平行6份,加入各对照品储备液适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,进样分析,结果见表4。计算得到金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的平均加样回收率依次为102.34%、102.39%、101.05%、100.12%、101.11%、99.01%,RSD值依次为2.13%、1.11%、3.06%、3.32%、2.00%、3.44%,表明该方法加样回收率良好。

表4 番石榴叶中6种黄酮类成分的加样回收率( $n=6$ )Table 4 The recovery rate of six kinds of flavonoids ( $n=6$ )

化学成分 Component	取样量 Sample amount ( $\text{g}$ )	样品中量 Sample content ( $\text{mg}$ )	加入量 Added ( $\text{mg}$ )	测得量 Measured ( $\text{mg}$ )	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
金丝桃苷 Hyperoside	0.500 7	0.901 3	0.937 6	1.872 5	103.59	102.34	2.13
	0.504 4	0.916 4	0.937 6	1.893 6	104.22		
	0.500 6	0.901 1	0.937 6	1.861 8	102.47		
	0.500 2	0.900 4	0.937 6	1.861 1	102.46		
	0.505 2	0.909 4	0.937 6	1.876 8	103.18		
	0.500 8	0.901 4	0.937 6	1.821 2	98.10		
异槲皮苷 Isoquercitrinose	0.500 7	1.251 8	1.345 2	2.644 9	103.57	102.39	1.11
	0.504 4	1.261 0	1.345 2	2.646 9	103.03		
	0.500 6	1.251 5	1.345 2	2.609 6	100.96		
	0.500 2	1.250 5	1.345 2	2.610 0	101.06		
	0.505 2	1.263 0	1.345 2	2.641 2	102.45		
	0.500 8	1.252 0	1.345 2	2.641 4	103.29		
瑞诺昔 Reynoutrin	0.500 7	0.485 7	0.546 5	1.023 1	98.34	101.05	3.06
	0.504 4	0.489 3	0.546 5	1.036 9	100.20		
	0.500 6	0.485 6	0.546 5	1.049 5	103.19		

续表4(Continued Tab. 4)

化学成分 Component	取样量 Sample amount (g)	样品中量 Sample content (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Measured (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
番石榴苷 Guaijaverin	0.500 2	0.485 2	0.546 5	1.049 8	103.31		
	0.505 2	0.490 0	0.546 5	1.061 1	104.49		
	0.500 8	0.485 8	0.546 5	1.014 7	96.79		
	0.500 7	1.151 6	1.212 2	2.325 4	96.83	100.12	3.32
	0.504 4	1.160 1	1.212 2	2.332 2	96.69		
	0.500 6	1.151 4	1.212 2	2.412 0	103.99		
	0.500 2	1.150 5	1.212 2	2.341 5	98.26		
	0.505 2	1.162 0	1.212 2	2.389 3	101.25		
萹蓄苷 Avicularin	0.500 8	1.151 8	1.212 2	2.408 7	103.69		
	0.500 7	1.301 8	1.425 6	2.787 6	104.22	101.11	2.00
	0.504 4	1.311 4	1.425 6	2.768 9	102.24		
	0.500 6	1.301 6	1.425 6	2.721 0	99.57		
	0.500 2	1.300 5	1.425 6	2.733 5	100.51		
	0.505 2	1.313 5	1.425 6	2.761 5	101.57		
	0.500 8	1.302 1	1.425 6	2.707 1	98.55		
	0.500 7	0.055 1	0.057 7	0.113 2	100.75	99.01	3.44
槲皮素 Taxifolin	0.504 4	0.055 5	0.057 7	0.112 7	99.23		
	0.500 6	0.055 1	0.057 7	0.114 7	103.42		
	0.500 2	0.055 0	0.057 7	0.112 8	100.11		
	0.505 2	0.055 6	0.057 7	0.111 6	97.02		
	0.500 8	0.055 1	0.057 7	0.109 0	93.50		

## 2.2 相对校正因子重现性考察

考察不同色谱系统(岛津 HPLC-20AT 型和两台 Agilent 1260AT 型)及不同的色谱柱:Boston C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Agilent C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);

mm, 5 μm); Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 对相对校正因子的影响, 相对校正因子 RSD < 2.7%, 说明相对校正因子在不同色谱柱和仪器下的耐用性较好, 结果见表 5。

表5 不同色谱柱和仪器测得的相对校正因子

Table 5 RCFs determined by different columns and instruments

仪器 Instrument	柱型 Column	f金丝桃苷/异槲皮素 Hyperin/Isoquercitrinose	f金丝桃苷/ 瑞诺昔 Reynoutrin	f金丝桃苷/ 番石榴苷 Hyperin/ Guaijaverin	f金丝桃苷/ 萹蓄苷 Hyperin/ Avicularin	f金丝桃苷/ 槲皮素 Hyperin/ Taxifolin
安捷伦 1260 Agilent 1260(1)	Agilent	0.932 2	0.845 5	0.832 6	0.905 6	0.644 4
	Boston	0.916 8	0.823 6	0.843 2	0.896 2	0.623 5
	Diamonsil	0.921 1	0.796 2	0.803 5	0.886 7	0.632 2
安捷伦 1260 Agilent 1260(2)	Agilent	0.929 8	0.853 6	0.830 1	0.893 6	0.640 2
	Boston	0.936 2	0.815 7	0.845 9	0.876 2	0.654 6
	Diamonsil	0.963 1	0.830 5	0.826 5	0.913 2	0.673 2
Shimadzu LC-20A	Agilent	0.923 6	0.840 2	0.829 9	0.910 1	0.652 6
	Boston	0.951 2	0.834 2	0.827 4	0.908 6	0.643 2
	Diamonsil	0.943 1	0.873 3	0.798 5	0.886 5	0.620 9
平均值 Average		0.935 2	0.834 8	0.826 4	0.897 4	0.642 8
	RSD(%)	1.61	2.67	1.93	1.42	2.54

### 2.3 QAMS 法对待测色谱峰的定位

通过相对保留时间对待测化合物进行指认。以金丝桃苷为参照,分别考察相对保留时间在不同色谱系统和不同色谱柱中的重现性。各待测组分相对保留时间无明显差异,RSD 值均小于 5%,可以用来进行色谱峰的定位,结果见表 6。

表 6 不同仪器及规格色谱柱下目标成分的相对保留值

Table 6 Relative retention time determined by different instruments and columns

仪器 Instrument	柱型 Column	<i>r</i> 金丝桃苷/异槲皮素 Hyperin/Isoquercitroside	<i>r</i> 金丝桃苷/ 瑞诺昔 Hyperin/ Reynoutrin	<i>r</i> 金丝桃苷/ 番石榴苷 Hyperin/ Guaijaverin	<i>r</i> 金丝桃苷/ 萹蓄昔 Hyperin/ Avicularin	<i>r</i> 金丝桃苷/ 槲皮素 Hyperin/ Taxifolin
安捷伦 Agilent 1260(1)	Agilent	0.951 6	0.883 5	0.848 3	0.803 1	0.528 8
	Boston	0.932 5	0.876 2	0.826 3	0.796 2	0.513 7
	Diamonsil	0.963 2	0.856 3	0.843 2	0.784 3	0.522 3
安捷伦 Agilent 1260(2)	Agilent	0.951 6	0.882 1	0.850 2	0.825 6	0.526 5
	Boston	0.982 1	0.852 1	0.810 3	0.813 4	0.543 2
	Diamonsil	0.945 6	0.849 7	0.836 2	0.816 9	0.519 8
Shimadzu LC-20A	Agilent	0.972 3	0.894 3	0.862 5	0.806 3	0.532 1
	Boston	0.943 8	0.881	0.836 9	0.814 2	0.509 9
	Diamonsil	0.923 2	0.876 5	0.873 2	0.792 6	0.518 9
平均值 Average		0.951 8	0.872 4	0.843 0	0.805 8	0.523 9
RSD(%)		1.95	1.81	2.22	1.63	1.93

### 2.4 QAMS 法与外标法测定结果的比较

取 11 批番石榴叶样品粉末,按“2.1.3”项下方方法制备样品溶液,进行分析,采用外标法测定样品中金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺昔、番石榴苷、萹蓄苷、槲

皮素的含量,再用建立的 QAMS 法对其进行计算,结果表明,2 种方法测得的番石榴叶中有效成分含量没有显著性差异,提示“一测多评”法应用于番石榴叶的多成分质量评价是可行的。结果见表 7。

表 7 外标法与 QAMS 法测定番石榴叶中黄酮类成分含量的比较(*n* = 3)

Table 7 Contents of flavonoids by external standard method and quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) (*n* = 3)

编号 No.	金丝桃苷 Hyperoside (%)	异槲皮苷 Isoquercitroside (%)		瑞诺昔 Reynoutrin (%)		番石榴苷 Guaijaverin (%)		萹蓄苷 Avicularin (%)		槲皮素 Taxifolin (%)	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Y1	0.200 1	0.241 9	0.242 1	0.083 5	0.083 4	0.245 1	0.244 1	0.239 8	0.239 4	0.016 6	0.016 1
Y2	0.187 2	0.270 7	0.271 7	0.086 6	0.086 5	0.249 9	0.248 9	0.249 6	0.249 2	0.013 3	0.013 5
Y3	0.093 0	0.141 9	0.141 8	0.053 2	0.053 1	0.139 0	0.138 4	0.130 3	0.130 0	0.032 0	0.031 9
Y4	0.194 8	0.242 3	0.242 9	0.083 7	0.083 6	0.231 9	0.231 0	0.251 2	0.250 7	0.013 6	0.013 7
Y5	0.180 8	0.268 3	0.268 4	0.091 5	0.091 3	0.222 9	0.222 0	0.233 9	0.233 5	0.015 7	0.015 5
Y6	0.180 0	0.245 6	0.246 3	0.096 6	0.096 5	0.229 6	0.228 6	0.026 2	0.026 2	0.010 0	0.010 0
Y7	0.207 7	0.243 9	0.243 6	0.085 4	0.085 3	0.245 0	0.244 0	0.267 7	0.267 2	0.015 3	0.015 4
Y8	0.218 4	0.264 7	0.265 0	0.095 6	0.095 4	0.260 5	0.259 4	0.288 9	0.288 4	0.014 0	0.014 0
Y9	0.383 3	0.173 8	0.173 9	0.070 4	0.070 3	0.196 6	0.195 8	0.229 0	0.228 6	0.011 1	0.011 0
Y10	0.189 2	0.221 2	0.221 5	0.091 1	0.091 0	0.241 4	0.240 4	0.244 0	0.243 6	0.011 9	0.011 8
Y11	0.177 3	0.207 5	0.208 1	0.085 5	0.085 4	0.228 2	0.227 3	0.221 1	0.220 7	0.011 1	0.011 2

注:a:外标法;b:QAMS。

Note:a:external standard method;b:quantitative analysis of multi-components by single marker.

### 3 讨论

#### 3.1 供试品制备条件考察

分别考察了不同提取方式(回流、超声)、提取溶剂(纯甲醇、70%甲醇、80%甲醇、50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇)、溶剂用量(15、25、50 mL)、提取时间(30、40、50 min)对番石榴叶中金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的提取效率的影响,最终确定提取条件为以60%乙醇25 mL超声提取30 min,6种黄酮类成分提取率较高,且色谱峰峰形较好,分离度较好。

#### 3.2 流动相及检测波长的选择

本实验考察了甲醇、乙腈分别与0.2%磷酸水、0.1%甲酸水作为流动相时的分离效果和出峰时间,最终选择乙腈-0.2%磷酸水为流动相,梯度洗脱,得到的色谱图中各色谱峰出峰时间适中,分离效果较好。参考紫外可见分光光度法,在200~400 nm下对6种对照品进行了扫描,结果表明在360 nm处各色谱峰分离效果好,且均有最大吸收,故选择360 nm为检测波长。本次实验中,流动相条件对色谱峰峰形及分离度的影响大于提取方式和提取溶剂。

#### 3.3 内参物的选择

本实验选择金丝桃苷为内参物,金丝桃苷价格低廉,理化性质稳定,且实验过程中长期放置后峰面积没有明显变化,因此选择金丝桃苷对番石榴叶中5种黄酮类成分进行测定。

#### 3.4 测定结果分析

来自11个不同地区的番石榴叶饮片中金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的含量平均值分别为0.201%、0.229%、0.084%、0.226%、0.217%、0.015%。傅予<sup>[10]</sup>在乙醇体积分数51.62%、乙醇用量25 mL、酶用量0.93%超声提取33.67 min条件下测定的总黄酮含量为98.43 mg/g,即百分含量为0.984%。本次实验中,选择60%乙醇25 mL超声提取30 min测定得出番石榴叶中6种黄酮类成分总量的平均值为0.972%,与傅予的测定结果十分接近。因此可以初步判断,本研究测定的6种成分为番石榴叶中的主要黄酮类物质。不同地区的番石榴叶饮片中黄酮类成分含量存在较大差异。其中,云南地区的番石榴叶中瑞诺苷含量最高,平均值为0.0901%。四川地区的番石榴叶中异槲皮苷、番石榴苷、萹蓄苷含量最高,平均值分别为0.258%、0.242%、0.258%。广西地区的番石榴叶中金丝桃苷、槲皮素含量最高,平均值分别为

0.2381%、0.0216%。槲皮素是番石榴叶中主要活性成分之一,具有降血糖、抗氧化<sup>[11]</sup>、抗菌、抗病毒,抗腹泻等作用,因此可以初步判断广西地区的番石榴叶质量较四川、云南、贵州地区好。本实验首次将QAMS法应用于番石榴叶的质量评价中,用该法测定了11批番石榴叶药材中金丝桃苷、异槲皮苷、瑞诺苷、番石榴苷、萹蓄苷、槲皮素的含量,与传统外标法所得含量之间没有显著性差异。证明该方法可靠性强,同时可节约成本,可以在缺少对照品的情况下,通过 $f_{k,s}$ 及色谱峰定位计算其量,实现番石榴叶中多种有效成分质量控制。

#### 参考文献

- 1 Food and drug administration of guangdong province. Standard of traditional Chinese medicine of guangdong province (广东省中药材标准)[M]. Guangzhou:Guangdong Science And Technology Press,2004:190.
- 2 Naseer S,Hussain S,Naeem N,et al. The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava*( guava )[J]. Clin Phytosci,2018,4:32.
- 3 Bose D,Chatterjee S. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using guava (*Psidium guajava*) leaf extract and its antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Nanosci,2016,6:895-901.
- 4 Ren SL,Wu M,Xu LL,et al. Study on the chemical constituents from *Psidium guajava* leaves and antitumor activity of psiguadial D [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31,1001-1005.
- 5 Soman S,Rauf AA,Indira M,et al. Antioxidant and antiglycative potential of ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf extract in streptozotocin-Induced diabetic rats [J]. Plant Food Hum Nutr,2010,65:386-391.
- 6 Ademiluyi AO,Oboh G,Ogunsuya OB,et al. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties[J]. Comp Clin Pathol,2015,25:363-374.
- 7 Wang ZM,Qian ZZ,Zhang QW,et al. Technical guidelines for the establishment of the first test and multiple evaluation method[J]. J Chin Chin Mater Med(中国中药杂志),2011,36:657
- 8 Fu Y,Zhang Y,Tao ZW. Simultaneous determination of 4 flavonoids in *Psidium guajava* leaves from different habitats by HPLC[J]. J Chin Mod Appl Pharm(中国现代应用药学),2017,34:1585.
- 9 Zhu YD,Liu YY,Li CN,et al. Determination the 5 flavonoid

- glycosides of ethyl acetate extract from *Psidium guajava* leaves with HPLC [J]. *J Chin Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2014, 29: 2469.
- 10 Fu Y, Zhang Y, Tao ZW. Study on optimization of total flavanone-assisted extraction technology of guava leaves by box-behnken effect surface method [J]. *J Chin Med Mat ( 中药材)*, 2017, 40: 2145-2149.
- 11 Zhao YJ, Li JK, Zhang X, et al. Study on antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Psidium guajava* [J]. *J Chin Chin Mater Med ( 中国中药杂志)*, 2018, 43: 760.

(上接第 1607 页)

- 7 Sen S, Kawahara B, Gupta D, et al. Role of cystathione- $\beta$ -synthase in human breast cancer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 86: 228-238.
- 8 Hellmich M, Coletta C, Chao C, et al. The therapeutic potential of cystathione- $\beta$ -synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22: 424-448.
- 9 Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy [J]. *Nat Rev Drug Dis*, 2016, 15: 185-203.
- 10 Whiteman M, Le Trionnaire S, Chopra M, et al. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools [J]. *Clin Sci*, 2011, 121: 459-488.
- 11 Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT, et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathione- $\beta$ -synthase (CBS) and cystathione- $\gamma$ -lyase (CSE) [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169: 922-932.
- 12 Niu WN, Wu P, Chen F, et al. Discovery of selective cystathione- $\beta$ -synthase inhibitors by high-throughput screening with a fluorescent thiol probe [J]. *Med Chem Commun*, 2017, 8: 198-201.
- 13 Jendželovská Z, Jendželovsky R, Kuchárová B, et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1-20.
- 14 Zhang CL, Fan J. Application of hypericin in cancer therapy and diagnosis [J]. *J Int Pharm Res ( 国际药学研究杂志)*, 2012, 39: 402-404.
- 15 Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line [J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16: 1-9.
- 16 Niu WN, Chen F, Wang J, et al. Antitumor effect of sikokianin C, a selective cystathione- $\beta$ -synthase inhibitor, against human colon cancer in vitro and in vivo [J]. *Med Chem Commun*, 2018, 9: 113-120.
- 17 Xiao ZY, Mu Q. Advances on chemical investigation of Hypericum [J]. *Nat Prod Res Dev ( 天然产物研究与开发)*, 2007, 19: 344-355.
- 18 Gonçalves JLDS, Bernal C, Imasato H, et al. Hypericin cytotoxicity in tumor and non-tumor cell lines: a chemometric study [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2017, 20: 86-90.
- 19 Huntosova V, Stroffekova K. Hypericin in the dark: foe or ally in photodynamic therapy [J]. *Cancers*, 2016, 8(10): 93.
- 20 Lin SC, Lei KC, Du WP, et al. Enhancement of oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer by hypericin mediated photodynamic therapy via ROS-related mechanism [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2016, 71: 24-34.