

基于化学指纹图谱和多指标测定的柿叶药材质量研究

王月红¹, 韩璐², 许浚^{2,3}, 冯松浩², 张铁军^{3*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立柿 *Diospyros kaki* 叶的 HPLC 指纹图谱, 并进行多成分测定, 为柿叶及其相关产品的质量控制提供科学依据。**方法** 采用 HPLC 法, Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.2%甲酸水为流动相梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL; 对 22 批柿叶药材进行指纹图谱研究, 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 进行评价, 系统聚类分析和 PCA 分析将 22 批柿叶药材分为两类, 同时对金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素成分测定方法进行方法学考察。**结果** 建立了柿叶的指纹图谱, 共标定了 12 个色谱峰为柿叶药材指纹图谱的特征峰, 金丝桃苷在 0.044~0.880 μg, 异槲皮苷在 0.078~1.560 μg, 槲皮素在 0.040~0.800 μg, 山柰素在 0.035~0.700 μg 线性关系良好, *r* 均大于 0.999 8, 平均回收率分别为 97.59%、98.97%、100.55%、99.96%。**结论** HPLC 指纹图谱结合多成分测定可为柿叶及其相关产品的质量控制提供参考。

关键词: 柿叶; 高相液相色谱; 指纹图谱; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素; 山柰素

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)06-1205-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.025

Study on quality of *Diospyros kaki* leaves based on chemical fingerprint and multi index determination

WANG Yue-hong¹, HAN Lu², XU Jun^{2,3}, FENG Song-hao², ZHANG Tie-jun³

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint and to determine multiple components of leaves of *Diospyros kaki*, in order to provide a scientific basis for quality control for the *D. kaki* leaves and related products. **Methods** The chromatographic separate was achieved on a Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile and 0.2% formic acid in water as the mobile phase for gradient elution; Volume flow rate was 1.0 mL/min; Column temperature was 35 ℃; Detection wavelength was 360 nm; And injection was 10 μL; On 22 batches of persimmon leaf medicinal materials of fingerprint study, was evaluated with a chromatographic fingerprint similarity evaluation system (version 2004A), the 22 batches of persimmon leaf are divided into two categories by system cluster analysis and PCA analysis. And the determination method of hyperoside, isoquercitrin, quercetin, and kaempferol was also investigated at the same time. **Results** The fingerprint of *D. kaki* leaves was established. There were 12 common peaks in the fingerprint of *D. kaki* leaves. Hyperoside, isoquercitrin, quercetin and kaempferol were baseline separated with good linearity relationships between concentration and peak areas over the linear ranges, within 0.044—0.880, 0.078—1.560, 0.040—0.800 and 0.035—0.700 μg (*r* > 0.999 8). The average recoverys of the investigated compounds were 97.59%、98.97%、100.55%、99.96%. **Conclusion** HPLC fingerprint binding index component determination can provide a reference for the quality of *D. kaki* leaves and related products control.

Key words: leaves of *Diospyros kaki* Thunb.; HPLC; fingerprint; hyperoside; isoquercitrin; quercetin; kaempferol

柿叶为柿科柿属柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的新鲜或干燥叶^[1], 作为药物使用始见于明《滇南本草》: “经霜叶敷臃疮”, 《本草再新》记载用于 “治咳嗽吐

血, 止渴生津”。中国、日本、韩国、西班牙、美国等为柿树主要栽培国家, 其中中国在柿树栽培面积和产量上均居世界第 1 位, 占世界总产量的 50%以

收稿日期: 2016-08-19

作者简介: 王月红, 女, 硕士研究生, 主要从事中药复方制剂研究。Tel: (022)23006843 E-mail: wangyuehong1208@163.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjpr.com

上^[2]。柿叶味苦、性寒,具有下气平喘、生津止渴、清热解毒等作用。现代药理学研究表明柿叶具有清热解毒、润肺强心、镇咳止血、抗癌防癌等多种医疗保健作用^[3-5]。20 世纪初,日本开发了以柿叶为主要原材料的柿叶茶及多种功能性饮料,近年来,我国由单味药柿叶提取物制成的处方药“脑心清片”得到大力推广。随着以柿叶为主要原材料的相关药品、饮品的开发,柿叶及其相关产品的质量控制已经成为关键问题。中药成分较为复杂,药效的发挥强调整体性,中药指纹图谱技术不仅可以较为全面地反映中药化学成分的种类与数量,而且可以反映中药的质量和中医用药所体现的整体疗效,中药指纹图谱目前已成为国际上公认的控制天然药物质量的有效手段^[6-7]。周江煜等^[8]对广西产柿叶指纹图谱进行了研究,黄瑞松等^[9]测定了柿叶中所含槲皮素和山柰酚的量,他们从不同角度对柿叶药材的质量控制进行了研究,但都不能起到全面、有效控制药材质量的作用。本实验采用 HPLC 法对 22 批柿叶药材进行指纹图谱研究及模式识别,并对柿叶中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素这 4 种药效成分进行定量测定,为柿叶及其相关产品的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

Lab Alliance 高效液相色谱仪,美国 SSI 公司; Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,美国 Dikma 公司; AB204-N 电子天平(十万分之一),德国 Meteler 公司; BT25S 电子天平(万分之一),德国 Sartorius 公司; 超声波清洗机,宁波新芝生物科技公司。

对照品金丝桃苷(批号 111521-201205)、异槲皮苷(批号 111809-201001)、槲皮素(批号 110785-200203)、山柰素(批号 10709-200304)均购于中国食品药品检定研究院,质量分数均≥98%。乙腈(色谱纯),美国 Merck 公司; 甲醇(色谱纯)、甲酸(分析纯),天津市康科德科技有限公司; 纯净水,杭州娃哈哈有限公司。22 批柿叶药材批号和来源见表 1,均经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定为柿科柿属植物 *Diospyros kaki* Thunb. 的叶。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取金丝桃苷对照品适量,加甲醇制成 44.00 μg/mL 的溶液,摇匀,即得。

表 1 药材产地与批号

Table 1 Habitat and batch number of *D. kaki* leaves

编号	批号	来源	编号	批号	来源
S1	2013011401	广西	S12	2013080304	广西
S2	2013011402	广西	S13	2013080305	广西
S3	2013011403	广西	S14	2013080306	广西
S4	2013011404	广西	S15	2013080307	广西
S5	2013011405	广西	S16	2013080308	广西
S6	2013011406	广西	S17	2013080309	广西
S7	2013011407	广西	S18	2013080310	广西
S8	2013011408	广西	S19	2013080311	广西
S9	2013080301	广西	S20	2013080312	贵州
S10	2013080302	广西	S21	2013080313	贵州
S11	2013080303	广西	S22	2013080314	贵州

2.2 供试品溶液的制备

取柿叶药材粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75%甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 60 min,放至室温,再称定质量,并以 75%甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,滤过,取续滤液即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液,梯度洗脱: 0~10 min, 14%~18%乙腈; 10~25 min, 18%乙腈; 25~40 min, 18%~30%乙腈; 40~65 min, 30%~50%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL, 理论板数按金丝桃苷峰计算应不低于 3 000。

2.4 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液(S1),按“2.3”项下的色谱条件连续进样 6 次,以 3 号色谱峰(金丝桃苷)为参照峰,计算色谱图中各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.24%,各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 1.68%,符合指纹图谱的要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1),按“2.3”项下的色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以 3 号色谱峰(金丝桃苷)为参照峰,计算色谱图中各共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.31%,各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 1.82%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 称取同一批柿叶样品(S1) 6 份,按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.3”项下的色谱条件进行测定,以 3 号色谱峰(金丝桃苷)为参照峰,计算色谱图中各共有峰相对保留时

间的 RSD 小于 0.27%，各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 2.75%，符合指纹图谱的要求。

2.5 指纹图谱的建立及相似度分析

对 22 批柿叶药材进行测定，记录色谱图，并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A（国家药典委员会）对 22 批柿叶药材样品的图谱数据进行分析，设置 S1 为参照指纹图谱，采用多点校正后进行自动匹配，建立 22 批柿叶的 HPLC 共有模式图，结果见图 1 和 2。通过与混合对照品色谱图比对，指认出其中的 4 个共有峰，其中 3、4、11、12 号共有峰分别为金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素。22 批柿叶供试品色谱图与对照指纹图谱相似度见表 2。

2.6 系统聚类分析

以 22 批柿叶药材指纹图谱中 12 个共有峰的相对峰面积为变量，运用 SPSS 19.0 数据统计分析软件对其进行系统聚类分析，选用组间联接聚类方法，采取欧氏距离度量标准，计算样品的相似性程度，聚类结果见图 3。结果显示，22 批柿叶药材分为 2

表 2 22 批柿叶药材相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 22 batches of *D. kaki* leaves

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.989	S12	0.966
S2	0.994	S13	0.987
S3	0.995	S14	0.993
S4	0.995	S15	0.985
S5	0.971	S16	0.970
S6	0.994	S17	0.981
S7	0.987	S18	0.995
S8	0.941	S19	0.994
S9	0.992	S20	0.981
S10	0.992	S21	0.991
S11	0.960	S22	0.985

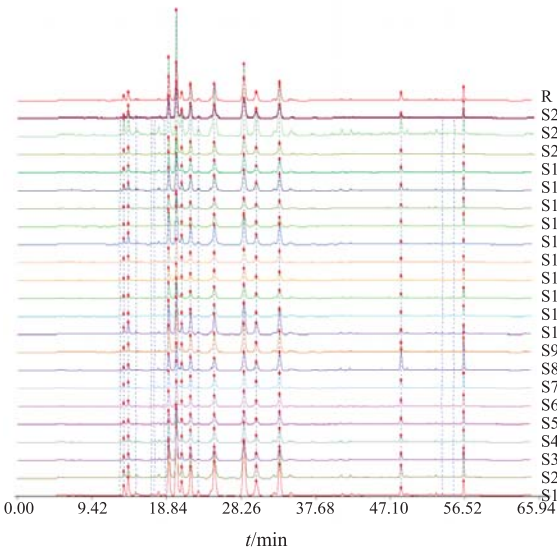


图 1 22 批样品 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of 22 batches of samples

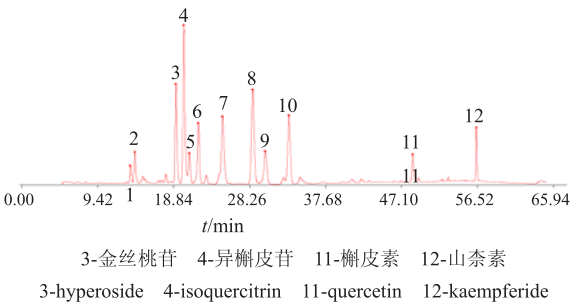


图 2 柿叶对照指纹图谱
Fig. 2 Control fingerprint of *D. kaki* leaves

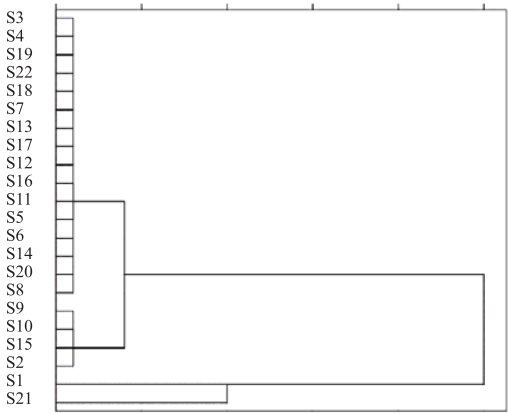


图 3 22 批柿叶药材的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis on 22 batches of *D. kaki* leaves

类，其中样品编号 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22 聚为一类，样品编号 1、21 聚为一类。结果表明柿叶药材质量较为均一、稳定，不同批次间的一致性较强，为保证柿叶药材疗效的稳定发挥提供保障。

2.7 主成分分析（PCA）

PCA 是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组新的相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法，也是数学上处理降维的一种方法，已经广泛应用于中药材品质的综合评价与分类鉴别。本实验将 22 批样品 12 个共有峰峰面积导入 SPSS 19.0 软件，进行 PCA。对柿叶共有峰峰面积进行标准化处理，计算相关系数矩阵、特征值和方差贡献率。结果见图 4。由 PCA 图可以看出，通过 PCA 将 22 批药材分为 2 大类，其中样品编号为 1、21 的样品聚为一类，其余 20 批聚为一类，与聚类分析结果一致。

2.8 多指标成分测定

2.8.1 色谱条件 同“2.3”项下的色谱条件，色谱

图见图 5。

2.8.2 混合对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素对照品适量，加甲醇制成含金丝桃苷 44.00 $\mu\text{g/mL}$ 、异槲皮苷 78.00 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮素 39.98 $\mu\text{g/mL}$ 和山柰素 35.02 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液，摇匀，即得。

2.8.3 供试品溶液的制备 同“2.2”项供试品溶液的制备方法。

2.8.4 线性关系考察 精密吸取“2.8.2”项下制备的混合对照品溶液 1、2、4、8、16、20 μL ，按“2.3”

项下的色谱条件进行测定。记录相应的峰面积，并以峰面积为纵坐标 (Y)，进样量为横坐标 (X) 进行线性回归，4 个成分的线性回归方程分别为金丝桃苷 $Y=38\,224 X+1\,703.6$ ， $r=0.999\,8$ ，线性范围 0.044~0.880 μg ，异槲皮苷 $Y=38\,768 X+13\,347$ ， $r=0.999\,9$ ，线性范围 0.078~1.560 μg ，槲皮素 $Y=37\,536 X-16\,679$ ， $r=0.999\,9$ ，线性范围 0.040~0.800 μg ，山柰素 $Y=38\,641 X+9\,999$ ， $r=0.999\,8$ ，线性范围 0.035~0.700 μg ；结果表明各对照品在上述范围内具有良好的线性关系。

2.8.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S_1)，按“2.3”项下的色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积。结果金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素峰面积的 RSD 值分别为 1.01%、0.78%、1.41% 和 1.37%。

2.8.6 稳定性试验 精密取“2.8.3”项下方法制备的供试品溶液 (S_1)，密闭，放置于室温下，分别在 0、2、4、8、12、24 h 间隔下进样检测，结果金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素峰面积的 RSD 值分别为 1.50%、1.03%、1.94% 和 0.76%。

2.8.7 重复性试验 取柿叶药材 (S_1)，按照“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素质量分数的 RSD 值分别为 1.74%、2.00%、1.70% 和 1.94%。

2.8.8 加样回收率试验 取柿叶药材 (S_1) 粉末约 0.5 g，精密称定，分别按已测定的 50%、100%、150% 3 个水平加入金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、山柰素对照品，按“2.2”项下供试品溶液制备方法平行制备 9 份供试品溶液，进样测定。结果显示金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、山柰素的平均回收率分别为 97.59%、98.97%、100.55%、99.96%；RSD 值分别为 2.71%、2.68%、2.76%、1.18%。

2.9 样品测定

取 22 批柿叶药材粉末 (过 80 目) 各约 1 g，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件，计算样品中 4 种成分的量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察

平行取 5 份柿叶药材粉末约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入 75% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、75% 乙醇和 50% 乙醇各 50 mL，称定质量，超声提取 60 min，放至室温，再称定质量，并以 75% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、75% 乙醇和 50% 乙醇补足减失的

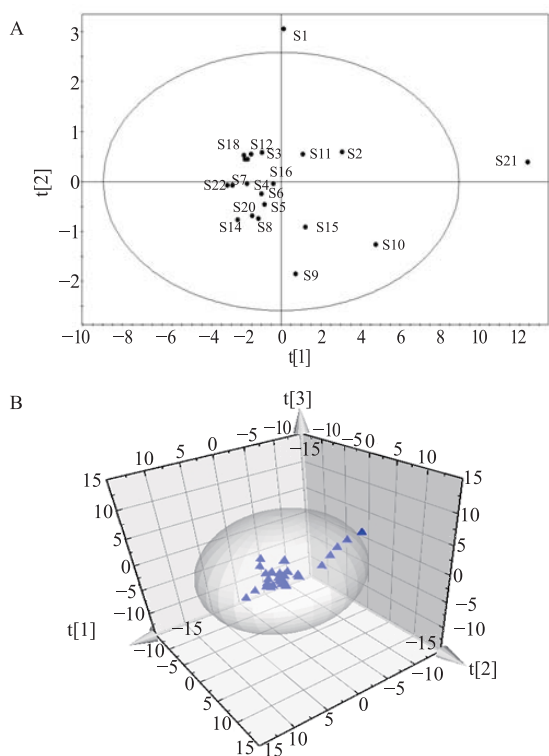


图 4 柿叶药材 PCA (A) 和 PCA 3D (B) 图
Fig. 4 PCA (A) and PCA 3D (B) of *D. kaki* leaves

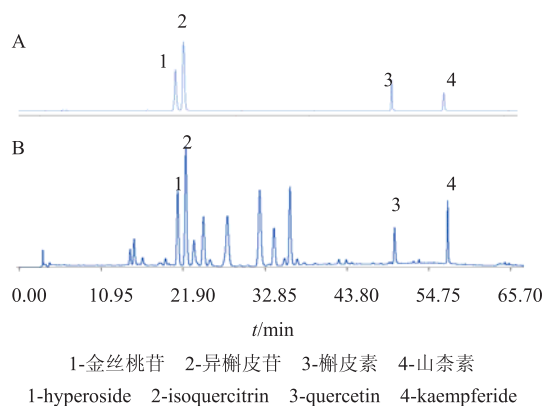


图 5 混合对照品 (A) 和柿叶供试品 (B) 的 HPLC 色谱
Fig. 5 HPLC of mixed reference (A) and leaf samples (B)

表 3 22 批柿叶测定结果

Table 3 Determination results of 22 batches of samples

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮素	山柰素
S1	1.373	2.743	0.226	0.187
S2	1.076	1.990	0.307	0.265
S3	0.557	1.003	0.142	0.128
S4	0.557	1.003	0.142	0.128
S5	0.396	0.670	0.172	0.168
S6	0.418	0.769	0.127	0.130
S7	0.486	0.842	0.195	0.179
S8	0.462	0.820	0.428	0.340
S9	0.761	1.451	0.230	0.230
S10	0.757	1.529	0.130	0.141
S11	0.450	0.627	0.157	0.165
S12	0.443	0.640	0.140	0.168
S13	0.362	0.526	0.103	0.114
S14	0.379	0.697	0.069	0.071
S15	0.893	1.660	0.080	0.060
S16	0.482	0.640	0.148	0.168
S17	0.336	0.458	0.096	0.108
S18	0.625	1.122	0.167	0.154
S19	0.564	1.021	0.127	0.118
S20	0.415	0.752	0.083	0.094
S21	2.175	2.880	0.600	0.401
S22	0.535	1.030	0.097	0.094

质量, 摇匀, 静置, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤过, 所得 5 份供试品溶液用 HPLC 进行测定, 结果表明 75% 甲醇对柿叶中各成分的提取效果最好, 故选择 75% 的甲醇做为提取溶剂。

3.2 提取方法的考察

取柿叶药材粉末, 以 75% 甲醇做为提取溶剂, 分别以超声提取 (柿叶药材 1 g, 75% 甲醇 50 mL)、加热回流提取 (柿叶药材 1 g, 75% 甲醇 50 mL) 2 种方法对柿叶药材进行提取, 提取后, 静置, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤过, 所得 2 份供试品溶液用 HPLC 进行测定, 结果表明超声提取效果更好, 且操作简便, 故选择超声提取法。

3.3 检测波长的选择

本实验采用 DAD 检测器进行 200~400 nm 全波长扫描, 结果表明在 360 nm 下色谱峰的数量最多, 峰形最好, 且各色谱峰的分度度良好, 因此选定 360 nm 作为检测波长。

4 结论

通过对广西、贵州 2 地的 22 批柿叶药材指纹图谱相似度评价, PCA, 聚类分析结果的研究可知, 柿叶药材的化学成分种类主要由遗传背景决定, 与产地及气候关系不大。但是由 22 批柿叶样品中指标成分

的测定结果可知, 金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素的相对量存在一定的差异。其中第 1、2、9、10、15 和 21 批次药材中指标成分的量与其他批次差异较大, 对药材进行直观分析, 发现这 6 个批次药材的叶片颜色呈黄棕色, 其他批次的药材的叶片成黄绿色。查阅相关文献报道可知, 柿叶在经霜后颜色由绿变黄转红, 且黄酮量升高, 因此可以推断这 6 个批次的药材可能为霜降后采收的药材, 故其量较高。部颁标准中规定柿叶药材的采收时间为秋季 (9、10、11 月份), 而霜降为每年的 10 月 23 日, 因此建议将柿叶的采收时间定为霜降之后, 可以在其他条件不变的情况下利用天然因素进行整体的黄酮量提升。柿叶药材化学成分复杂, 具有多种药理作用^[9], 且已有相关产品应用于临床^[10], 为了更好地开发利用柿叶药材, 其质量标准的建立是一个关键问题, 本实验在同一色谱条件下建立了柿叶的指纹图谱, 并对其进行了模式识别, 又同时测定了柿叶中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素和山柰素这 4 种黄酮类活性成分, 从定性和定量 2 方面对柿叶的质量标准进行了研究, 且方法简便易行, 为柿叶药材及其相关产品的质量控制提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 傅建敏, 梁晋军, 周道顺. 柿叶有效成分研究综述 [J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(11): 66-72.
- [3] 郑皓, 鲁周民, 刘月梅, 等. 柿叶的药理作用研究进展及开发利用现状 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(12): 81-86.
- [4] 辛宁, 丰杰, 姚波. 柿叶黄酮类提取分离及药理作用研究概况 [J]. 中医药学报, 2007, 35(2): 49-51.
- [5] 周鑫堂, 王丽莉, 韩璐, 等. 柿叶化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3195-3203.
- [6] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [7] 刘素香, 刘毅, 白雪, 等. 败酱草指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2074-2077.
- [8] 周江煜, 李耀华, 侯小涛, 等. 广西产柿叶的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(6): 583-584.
- [9] 黄瑞松, 张鹏, 梁子宁, 等. 柿叶药材的鉴别及所含槲皮素和山柰素的测定 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(5): 21.
- [10] 林娇芬, 林河通, 谢联辉, 等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(7): 90-96.