

# 柿叶总三萜的质量标准研究

乔金为<sup>1\*</sup>, 黄顺旺<sup>2,3</sup>, 任燕茹<sup>1</sup>, 汪海斌<sup>1</sup>, 陈师农<sup>2</sup>, 孙 备<sup>2</sup>, 吴德玲<sup>1#</sup>, 李玲芝<sup>3</sup>, 宋少江<sup>3</sup> (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2.安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230022; 3.沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0409-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.43

**摘要** 目的:建立柿叶总三萜的质量标准。方法:采用原位预处理-薄层色谱(TLC)法对样品中总三萜成分(齐墩果酸、熊果酸)进行定性鉴别。以熊果酸为对照品,采用分光光度法测定总三萜的含量。采用高效液相色谱法测定齐墩果酸、熊果酸的含量;色谱柱为COSMOSIL5 C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.2%磷酸(82:18, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:齐墩果酸、熊果酸的TLC图斑点清晰,分离度好。总三萜检测质量浓度线性范围为7.52~45.12 μg/ml。齐墩果酸、熊果酸检测质量浓度线性范围分别为18.4~184、18.8~188 μg/ml( $r=0.999\ 9$ );精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.83%~102.11%(RSD=1.21%,  $n=6$ )、99.00%~103.80%(RSD=1.82%,  $n=6$ )。结论:所建标准可用于柿叶总三萜的质量控制。

**关键词** 柿叶总三萜;齐墩果酸;熊果酸;薄层色谱法;分光光度法;高效液相色谱法

## Study on the Quality Standard of Total Triterpenoids in *Diospyros kaki* Leaves

QIAO Jinwei<sup>1</sup>, HUANG Shunwang<sup>2,3</sup>, REN Yanru<sup>1</sup>, WANG Haibin<sup>1</sup>, CHEN Shinong<sup>2</sup>, SUN Bei<sup>2</sup>, WU Deling<sup>1</sup>, LI Lingzhi<sup>3</sup>, SONG Shaojiang<sup>3</sup> (1.School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2.Anhui Provincial Food and Drug Inspection Institute, Hefei 230022, China; 3.School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard of total triterpenoids in *Diospyros kaki* leaves. METHODS: In situ pretreatment-TLC was used for the qualitative identification of total triterpenoids (oleanolic acid and ursolic acid). With the reference of ursolic acid, spectrophotometry was used to determine the content of total triterpenoids. HPLC was used to determine the contents of oleanolic acid and ursolic acid; the column was COSMOSIL5 C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-0.2% phosphoric acid (82:18, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: TLC of oleanolic acid and ursolic acid showed clear spots and good separation. The linear range of total triterpenoids was 7.52-45.12 μg/ml. The linear range was 18.4-184 μg/ml for oleanolic acid( $r=0.999\ 9$ ) and 18.8-188 μg/ml for ursolic acid ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.83%-102.11% (RSD=1.21%,  $n=6$ ) and 99.00%-103.80% (RSD=1.82%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of total triterpenoids in *D. kaki* leaves.

**KEYWORDS** Total triterpenoids in *Diospyros kaki* leaves; Oleanolic acid; Ursolic acid; TLC; Spectrophotometry; HPLC

柿叶为柿科柿属植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的新鲜或干燥叶,收载于湖南、广东、广西省药材标准。临床常用于治疗冠心病、心绞痛、缺血性脑血管病、老年痴呆、糖尿病及胃溃疡出血、肺结核出血、功能性子宫出血等症<sup>[1]</sup>。

陈光等<sup>[2]</sup>报道,从柿叶中分离得到的 $\alpha$ -香树脂醇、乌苏醇、

熊果酸、19 $\alpha$ -羟基乌苏酸、19 $\alpha$ -24-二羟基乌苏酸5种三萜类化合物具有抑制过氧化物产生和酪氨酸磷酸化的作用;另外,柿叶三萜粗提物对链脲佐菌素所致糖尿病模型小鼠有明显的降糖作用<sup>[3]</sup>。目前,国内外对柿叶有效部位总三萜的活性和含量研究报道较少。为此,笔者对柿叶总三萜的质量控制进行了

版.北京:中国医药科技出版社,2010:964.

[5] The United States Pharmacopeial Convention. USP 35-NF 30[S].2012:5 025-5 027.

[6] 李华,龙亚秋,罗超华,等.高效液相色谱法测定硫酸长春新碱的有关物质[J].中国药业,2012,21(3):24.

\* 硕士研究生。研究方向:天然药物。E-mail: 1186729971@qq.com

# 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然药物。电话:0551-65169045

[7] 罗婵,母昭德.肿瘤细胞内外长春新碱的高效液相色谱法测定[J].重庆医科大学学报,2009,34(4):452.

[8] 袁琦,徐玫,赵辉,等.HPLC法快速定量测定硫酸长春新碱[J].中成药,2013,36(6):1 345.

[9] 齐鹏,张永旺. HPLC法测定组织中硫酸长春新碱的含量[J].河南大学学报:医学版,2014,33(1):30.

(收稿日期:2015-01-06 修回日期:2015-12-08)

(编辑:周 箐)

初步研究,旨在为柿叶总三萜的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TU-1810型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);LC-20AT型高效液相色谱仪,包括紫外检测器、双通道色谱工作站(日本Shimadzu公司);KQ-250E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AR1140型电子天平(上海加惠仪器仪表有限公司);DZF-6030真空干燥箱(上海越众仪器设备有限公司);HHS型电热数显水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

### 1.2 试剂

齐墩果酸(批号:110709-201206,纯度>98%)、熊果酸(批号:110742-201220,纯度>98%)均购自中国食品药品检定研究院;柿叶总三萜样品(批号:141101、141102、141103)为安徽省食品药品检验研究院天然药化室自制;甲醇、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

### 1.3 药材

柿叶药材购自安徽普仁中药饮片有限公司,经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 总三萜的定性鉴别

取柿叶总三萜样品5 mg,研细,加甲醇5 ml,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)使溶解,作为供试品溶液。另取齐墩果酸、熊果酸对照品适量,加甲醇制成每1 ml分别含1 mg齐墩果酸、熊果酸的单一对照品溶液。分别吸取上述单一对照品溶液,按1:1体积比混合,制成每1 ml含齐墩果酸、熊果酸各0.5 mg的混合对照品溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]<sup>[4]</sup>试验,吸取上述4种溶液各10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(9:2.5:4.5:0.1, V/V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,详见图1。

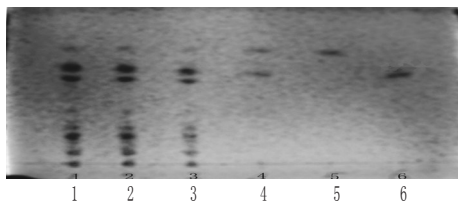


图1 薄层色谱图

1~3.供试品;4.混合对照品;5.齐墩果酸对照品;6.熊果酸对照品

Fig 1 TLC chromatograms

1-3.test samples; 4.mixed substance reference; 5.oleanolic acid substance reference; 6.ursolic acid substance reference

### 2.2 总三萜含量的测定<sup>[5]</sup>

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品4.7 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,制成每1 ml含0.188 mg熊果酸的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别取3批样品0.202 4、0.193 4、0.215 1 g,置于50 ml量瓶中,分别加入甲醇超声溶解并定容,

制成质量浓度分别为4.048、3.868、4.302 mg/ml的供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,分别置于5 ml量瓶中,沸水蒸干后于室温下放置,加0.3 ml 5%香草醛冰醋酸溶液和1 ml 高氯酸,密封混匀后于60  $^{\circ}$ C恒温水浴下显色45 min,冰水冷却至室温,加冰醋酸定容,在547 nm波长下测定吸光度。以熊果酸质量浓度(x,  $\mu$ g/ml)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.042 4x+0.079 7$ ( $r=0.999 3$ )。结果表明,熊果酸检测质量浓度线性范围为7.52~45.12  $\mu$ g/ml。

2.2.4 方法学考察 按方法学规定进行精密性、稳定性、重复性试验,结果表明,以上试验的RSD<3%;进行加样回收率试验,结果表明,加样回收率为96.7%~102.3%(RSD=1.67%, $n=6$ )。

2.2.5 样品含量测定 取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定并计算总三萜含量,结果见表1。

表1 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 1 Results of contents determination of samples( $n=3$ )

批号	总三萜,%	齐墩果酸,mg/g	熊果酸,mg/g
141101	72.63	50.97	137.70
141102	71.88	49.85	137.03
141103	73.25	51.22	139.80

### 2.3 总三萜中齐墩果酸和熊果酸含量的测定<sup>[6]</sup>

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: COSMOSIL5 C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相: 甲醇-0.2%磷酸(82:18, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:25  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ l。在上述色谱条件下,理论板数按各待测成分峰计均不少于5 000,分离度>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图2。

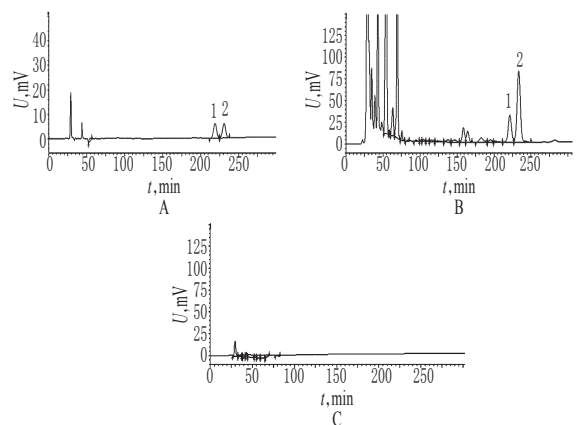


图2 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.齐墩果酸;2.熊果酸

Fig 2 HPLC chromatograms

A.mixed substance reference; B.test samples; C.negative control; 1.oleanolic acid; 2.ursolic acid

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取真空干燥至恒质量的齐墩果酸对照品9.2 mg、熊果酸对照品9.4 mg,分别置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为齐墩果酸、熊果酸单一对照品贮备液(质量浓度分别为0.368、0.376 mg/ml)。精密量取上述单一对照品贮备液各1 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇定容,摇匀,制成齐墩果酸、熊果酸质量浓度分别为0.036 8、0.037 6 mg/ml的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品适量,研细,取约50 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加甲醇约45 ml,超声1 h,使完全溶解,冷却,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 以甲醇为阴性对照溶液。

2.3.5 线性关系考察 分别精密量取“2.3.2”项下齐墩果酸、熊果酸单一对照品贮备液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、5.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,制成系列单一对照品溶液。精密吸取上述系列单一对照品溶液各10  $\mu$ l,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度( $x$ ,  $\mu$ g/ml)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得齐墩果酸、熊果酸回归方程分别为 $y=4892.4x-9673.8$ ( $r=0.9999$ )、 $y=4790.2x-4933.7$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,齐墩果酸、熊果酸检测质量浓度线性范围分别为18.4~184、18.8~188  $\mu$ g/ml。

2.3.6 精密度的试验 取“2.3.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为0.45%、0.48%( $n=6$ ),表明仪器精密性良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液(批号:141101)适量,分别于放置0、2、4、6、8 h时进样测定,记录峰面积。结果,齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为0.99%、1.47%( $n=5$ ),表明供试品溶液在8 h内基本稳定。

2.3.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:141101)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为1.26%、1.06%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:141101)适量,共6份,分别加入一定质量的齐墩果酸、熊果酸对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算各成分含量并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
齐墩果酸	0.025 63	1.288	1.242	2.527	99.80	100.75	1.21
	0.023 18	1.165	1.242	2.433	102.11		
	0.028 08	1.411	1.242	2.638	98.83		
	0.022 38	1.124	1.242	2.387	101.69		
	0.026 08	1.310	1.242	2.565	100.99		
	0.027 53	1.383	1.242	2.639	101.09		
熊果酸	0.025 63	3.526	3.431	6.923	99.00	100.91	1.82
	0.023 18	3.189	3.431	6.604	99.53		
	0.028 08	3.864	3.431	7.425	103.80		
	0.022 38	3.079	3.431	6.538	100.82		
	0.026 08	3.588	3.431	7.099	102.32		
	0.027 53	3.788	3.431	7.218	99.97		

2.3.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定并计算各成分含量,结果见表1。

### 3 讨论

柿叶产于安徽蚌埠,晒干,切断,采用12倍的石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)在70  $^{\circ}$ C水浴中提取3次后(脱脂和色素等),再经12倍的乙酸乙酯在80  $^{\circ}$ C水浴中提取3次,合并提取液,回收乙酸乙酯,该粗提物经聚酰胺大孔树脂柱吸附洗脱,收集萜类部位,冷冻

干燥(冷冻温度:-40  $^{\circ}$ C,真空度:10 pa,时间:6 h),即得总三萜提取物。

从TLC图中可看出,供试品除齐墩果酸、熊果酸外,尚有多数斑点,因无对照品,所以不能一一对应鉴别,有待进一步研究;如未进行薄层原位预处理,此条件下展开,系同分异构体的齐墩果酸、熊果酸将分不开,显示同一个斑点。

分光光度法测定中,精密吸取熊果酸对照品溶液和供试品溶液各适量,在香草醛冰醋酸溶液和高氯酸显色后,随空白校正,在200~700 nm范围内扫描,发现熊果酸对照品溶液的 $\lambda_{max}=547$  nm,供试品溶液的 $\lambda_{max}=540\sim550$  nm,故选择547 nm波长测定吸光度。

目前,从柿叶中分离得到的三萜类化合物有十几种<sup>[7]</sup>,包括包括 $\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇、羽扇豆醇、乌苏醇、齐墩果酸、熊果酸、白桦酸、19 $\alpha$ -羟基乌苏酸、19 $\alpha$ -24-二羟基乌苏酸、Barbivernic acid、野蔷薇苷等,测定主成分齐墩果酸和熊果酸的含量可以作为控制总三萜提取物质量的有效方法之一。

取齐墩果酸和熊果酸对照品适量,加适量甲醇溶解,稀释至一定刻度,以甲醇为空白,在200~500 nm波长范围进行扫描,结果两者在204 nm波长处均有较强吸收;由于流动相中甲醇的紫外吸收干扰较大,基线不稳,最终选择210 nm为两者的检测波长,此时其他成分干扰较小,且不影响样品测定的灵敏度。

参照有关文献<sup>[6]</sup>,笔者曾采用流动相甲醇-0.2%醋酸铵(80:20, V/V)和甲醇-0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(三乙胺调pH至3.0)(85:15, V/V)进行考察,发现色谱图基线波动,齐墩果酸和熊果酸的出峰时间较长;而采用甲醇-0.2%磷酸(82:18, V/V)时基线相对稳定,两者出峰时间均在25 min内。

综上所述,本研究所建标准可用于柿叶总三萜的质量控制。

### 参考文献

- [1] 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):3 195.
- [2] Chen G, Lu H, Wang C, et al. Effect of triterpenoid compounds isolated from leaves of Diospyros kaki on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes[J]. Clin Chimica Acta, 2002, 320(1/2): 11.
- [3] 邓航,黎荣,林兴,等.柿叶三萜粗提物对糖尿病小鼠血糖及其肝糖原的影响[J].时珍国医国药,2012,23(5):1 198.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34.
- [5] 纵伟,夏文水,崔宝良.薄层分离-分光光度法测定大叶紫薇叶中的总三萜含量[J].食品科学,2005,26(4):222.
- [6] 王丽峰,彭敬东,刘丽敏.高效液相色谱法同时测定柿叶和连翘中黄酮和三萜类化合物的含量[J].分析试验室,2008,27(增刊):176.
- [7] 陈光.柿叶化学成分及生物活性的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2003.

(收稿日期:2015-02-06 修回日期:2015-06-03)

(编辑:张静)