

17个柿品种叶中黄酮类物质的检测

安森, 余贤美, 王洁, 刘加芬, 艾呈祥*

山东省果树研究所, 山东泰安271000

摘要: 本研究采用紫外-可见分光光度法测定了17个品种柿树(*Diospyros kaki*)叶中的总黄酮含量, 并通过高效液相色谱法(HPLC)测定了异槲皮苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素、山柰素和异鼠李素6种黄酮类物质的含量。结果显示, 各品种间总黄酮含量差异显著, 17个品种柿树的柿叶中总黄酮含量为24.47~43.00 mg·g⁻¹ (DW)。其中, ‘油葵头’、‘金柿’、‘晚御所’和‘湘西甜柿’含量最高, 分别为43.00、41.17、41.57和42.32 mg·g⁻¹ (DW), 无显著差异; ‘八月黄’含量最低, 为24.47 mg·g⁻¹ (DW)。总黄酮含量与不同柿树类型(砧木、涩柿、不完全甜柿和完全甜柿)无明显相关性。HPLC分析结果显示, 除‘鄂柿1号’外, 其余16个品种的6种黄酮类物质, 均以紫云英苷含量最高; 异鼠李素仅在‘禅寺丸’叶片中被检测到, 但含量较低, 仅0.075 mg·g⁻¹ (DW)。本研究结果说明, 17个柿树品种中, ‘油葵头’、‘金柿’、‘晚御所’、‘湘西甜柿’、‘上西早生’、‘鄂柿1号’、‘次郎’中黄酮含量较高, 可用于柿叶茶的研制和加工。

关键词: 柿叶; 黄酮类物质; 紫外-可见分光光度法; 高效液相色谱

柿(*Diospyros kaki*)是我国重要果树之一。柿叶中含有丰富的黄酮苷、芦丁、三萜类、多酚类、胆碱、维生素C、胡萝卜素、香豆素类、甾醇类、有机酸、脂肪酸、挥发油、生物碱、还原糖、多糖、鞣质、香脂精、萘醌萘酚类、多种氨基酸及铁、锌、钙等对人体健康有益的营养成分(费学谦等2004; 张吉祥等2002; 安秋荣和郭志峰2000; 傅建敏等2013)。近几年, 人们对生活质量的追求不断提升, 柿叶的功能成分逐渐受到人们的关注和重视。

柿叶中含有多种具药理作用的生理活性物质, 黄酮类物质是柿叶中最主要的功能成分, 已发现的柿叶黄酮类物质主要有紫云英苷、黄芪苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰酚、芦丁、芸香苷、金丝桃苷、杨梅树皮苷等(傅建敏等2013; 周鑫堂等2014)。柿叶黄酮具有明显的抗氧化和清除自由基的作用(林国荣和罗素丽2015; Han等2002; Sun等2011); 可有效降低血糖, 改善胰岛素抵抗状态, 对糖尿病肾病及糖尿病视网膜病变有保护作用(邓航等2012; 零伟德和杜刚2016; 邓振德等2017); 可降低血压, 缓解动脉粥样硬化, 对心肌缺血具有保护作用(Gorinstein等2011; 白卫娜等2013); 具有认知及突触保护作用, 延缓脑衰老(尚玉莹等2016; 马莹娟等2015); 有一定的亚硝酸盐清除能力(张亚安等2016); 可减轻CCl₄诱使的肝损伤(吕超2015); 对多种细菌和真菌具有抑制作用(孙彩云等2014); 具有免疫系统保护及抑制过敏作用(Kotani等2000; Itoh等2011)。对柿叶黄酮的开发研究, 可提高柿树的

利用价值, 增加经济效益, 有利于促进柿树产业的发展。

本试验通过紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分别测定了17个品种柿树叶片的总黄酮含量和6种黄酮类物质的含量, 以期为宜柿叶茶深加工的高黄酮含量柿树品种的选育做前期探索。

材料与方法

1 材料

1.1 试剂

芦丁、山柰素、异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、紫云英苷标准品购自Sigma公司; 色谱级甲醇购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 色谱级冰乙酸购自天津市凯通化学试剂有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为国产分析纯; 水为超纯水。

1.2 植物材料

选用的18个供试材料为: 柿树(*Diospyros kaki* L. f.)品种‘黄前牛心柿’(‘Huangqianniuxinshi’)、‘磨盘柿’(‘Mopanshi’)、‘小面糊’(‘Xiaomianhu’)、‘油葵头’(‘Youloutou’)、‘八月黄’(‘Bayuehuang’)、‘朱砂红’(‘Zhushahong’)、‘金柿’(‘Jinshi’)、‘赤柿’(‘Akagaki’)、‘禅寺丸’(‘Zenjimaruru’)、‘西村早生’

收稿 2017-05-04 修定 2017-10-20

资助 “十二五”农村领域国家科技计划项目(2013BAD14B0504)。

* 通讯作者(E-mail: chengxiang_1975@163.com)。

(‘Nishimurawase’)、‘上西早生’(‘Uenishiwase’)、‘次郎’(‘Jiro’)、‘阳丰’(‘Youhou’)、‘晚御所’(‘Oku-gosho’)、‘兴津20’(‘Okitsu 20’)、‘鄂柿1号’(‘Eshi 1’)和‘湘西甜柿’(‘Xiangxitianshi’), 以及砧木对照君迁子(*Diospyros lotus* L.), 均采自山东省果树研究所万吉山试验示范基地(36°12'N, 117°04'E), 海拔210~220 m。

2 方法

2.1 样品的制备

将新鲜叶片洗净, 置70°C鼓风干燥箱至叶片恒重。干燥叶片经0.5 mm孔筛粉碎, 得样品粉末。称取样品粉末约1 g, 置索氏提取器中, 使用甲醇回流提取至无色。将提取液转移至100 mL容量瓶中, 用甲醇少量洗涤容器, 并入同一容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。使用0.22 μm微孔有机滤膜过滤, 所得过滤液即为供试品溶液, 于-80°C冰箱保存备用。

2.2 柿叶总黄酮含量的测定

参照《中华人民共和国药典》(国家药典委员会2010)中山楂叶总黄酮的测定方法, 以芦丁标准品为对照, 采用紫外-可见分光光度法测定样品的总黄酮含量。

2.2.1 标准曲线的制定

精确称取芦丁标准品5.1 mg, 置10 mL棕色容量瓶中, 使用甲醇溶解, 并加甲醇至刻度, 取5 mL至25 mL容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为标准品贮备液。分别取芦丁标准品贮备液0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6 mL至25 mL容量瓶中, 分别加甲醇至6 mL, 加入5%亚硝酸钠溶液1 mL, 摇匀, 静置6 min, 加入10%硝酸铝溶液1 mL, 摇匀, 静置6 min。分别加入1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液10 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置15 min。以相应试剂为空白, 使用紫外-可见分光光度计(AB Ultrospec 2100 pro), 在波长500 nm处测定吸光度, 重复3次。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.2 样品总黄酮含量的测定

取供试品溶液1 mL, 置于25 mL容量瓶中, 加甲醇至6 mL, 加入5%亚硝酸钠溶液1 mL, 摇匀, 静置6 min, 加入10%硝酸铝溶液1 mL, 摇匀, 静置6 min。加入1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液10 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置15 min。以相应试剂为空白, 使用紫

外-可见分光光度计, 在500 nm的波长处测定吸光度, 重复3次。根据标准曲线回归方程计算样品总黄酮的浓度。

2.3 六种黄酮类物质含量的测定

采用HPLC同时测定18个样品叶片中6种黄酮类物质的含量。

2.3.1 色谱条件

测定柿叶6种黄酮类物质采用Agilent LC1260高效液相色谱仪, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇为流动相A, 0.5%乙酸溶液为流动相B, 按表1的条件进行梯度洗脱; 检测波长为360 nm; 柱温35°C; 体积流量1 mL·min⁻¹ (安淼等2016)。

表1 梯度洗脱条件

Table 1 The conditions of gradient elution

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0~100	20	80
100~105	20~40	80~60
105	40	60

2.3.2 校正表的建立

精确称量标准品, 芦丁、异槲皮苷、槲皮素均为5.1 mg, 紫云英苷5.2 mg, 山柰素4.9 mg, 分别置于10 mL棕色容量瓶中, 加甲醇使溶解, 并加甲醇至刻度, 摇匀。精确称量异鼠李素标准品5.2 mg, 置50 mL棕色容量瓶中, 用甲醇溶解, 并加甲醇至刻度, 摇匀。取芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素标准品溶液各4 mL, 取异鼠李素标准品溶液20 mL, 混合置于50 mL容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得混合标准品贮备液。分别取混合标准品贮备液1、2、4、6、8、10 mL, 置于10 mL容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得到不同浓度混合标准品。吸取混合标准品溶液20 μL, 并注入液相色谱仪, 按照设定的色谱条件检测不同浓度混合标准品的吸光度, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 建立6种黄酮类物质的回归方程, 并建立校正表。

2.3.3 样品中各黄酮类物质含量的测定

吸取供试样品溶液20 μL, 注入液相色谱仪, 按照设定的色谱条件检测吸光度, 根据色谱图, 经校正表计算, 得到样品中各黄酮类物质的含量。

实验结果

1 总黄酮标准曲线的建立

以芦丁标准品为标样, 经紫外-可见分光光度测定, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 建立了总黄酮的标准曲线(图1)。

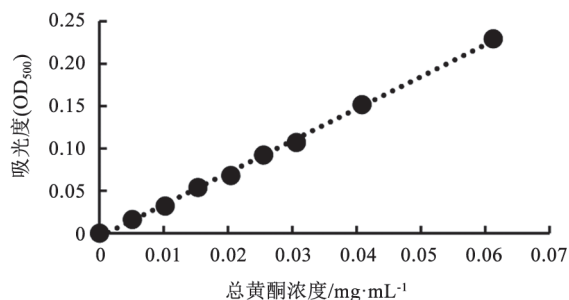


图1 总黄酮标准曲线

Fig.1 The standard curve of total flavonoids
总黄酮以芦丁计。 $y=0.3787x-0.0044$, $R^2=0.9982$ 。

2 混和标准品的色谱图

以设定的色谱条件测定混合标准品的吸光度, 获得了混和标准品的色谱图, 按保留时间依次为异槲皮苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素、山柰素、异鼠李素(图2)。

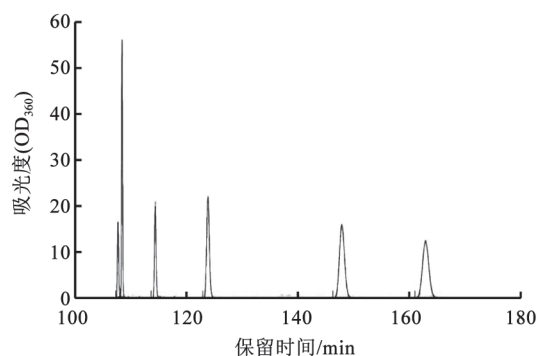


图2 混和标准品的色谱图

Fig.2 The chromatogram of mixed standards

3 六种黄酮类物质标准品的回归方程

以设定的色谱条件测定不同浓度混合标准品的吸光度, 以标准品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 获得6种黄酮类物质标准品的标准曲线和回归方程(图3)。

4 17个柿品种叶中总黄酮的含量

由图4可见, 17个品种柿叶中总黄酮含量均较高, 为24.47~43.00 mg·g⁻¹ (DW), 各品种间总黄酮含量差异显著。‘油葵头’、‘金柿’、‘晚御所’和‘湘西甜柿’中的含量最高, 分别为43.00、41.17、41.57和42.32 mg·g⁻¹ (DW), 无显著差异; 含量最低的是‘八月黄’, 为24.47 mg·g⁻¹ (DW)。但总黄酮含量与不同柿树类型(涩柿、不完全甜柿和完全甜柿)无明显相关性。

5 17个柿品种叶中6种黄酮类物质的含量

通过HPLC测定了君迁子和17个品种柿叶中6种黄酮类物质的含量, 结果显示, 各品种间6种黄酮类物质含量差异显著。所有品种中, 除‘鄂柿1号’外, 其余均以紫云英苷含量最高, 含量为1.459 mg·g⁻¹ (DW)(君迁子)~9.036 mg·g⁻¹ (DW)(‘油葵头’), 占总黄酮含量的4.9%(君迁子)~24.5%(‘小面糊’); 其余黄酮类物质含量由高到低依次为异槲皮苷0.688 mg·g⁻¹ (DW)(‘鄂柿1号’)~7.428 mg·g⁻¹ (DW)(‘上西早生’)、槲皮素0.168 mg·g⁻¹ (DW)(君迁子)~3.113 mg·g⁻¹ (DW)(‘次郎’)、山柰素0.109 mg·g⁻¹ (DW)(君迁子)~2.628 mg·g⁻¹ (DW)(‘次郎’)、芦丁0.097 mg·g⁻¹ (DW)(‘阳丰’)~2.111 mg·g⁻¹ (DW)(‘鄂柿1号’); 而异鼠李素只在‘禅寺丸’中检测到, 含量较低, 仅为0.075 mg·g⁻¹ (DW)(图5、表2)。

讨论

黄酮类物质是植物中一类重要的次生代谢产物, 具有较强的抗菌消炎、抗癌和抗氧化活性, 可以有效清除自由基, 对治疗高血压、防治心血管病也起重要作用, 对人体健康有重要影响(刘贤青等2016; 项亚等2016; 范凯等2016)。目前对于柿叶中黄酮类物质的检测, 主要采用HPLC和液质联用等方法(Akimoto等2017), 大多体现在总黄酮或槲皮素、山柰素等个别黄酮类物质上, 或者是限于槲皮素和山柰素的的同时测定(吴玉林等2007; 覃冬杰等2012; 刘军等2007; 黄顺旺等2016), 对于多种黄酮类物质同时检测的研究鲜有报道。本试验在前期研究(安淼等2016)的基础上, 测定了17个品种柿叶的总黄酮含量及6种黄酮类物质的含量, 为高黄酮含量的柿树新品种培育及柿叶茶的研制做前期探索。

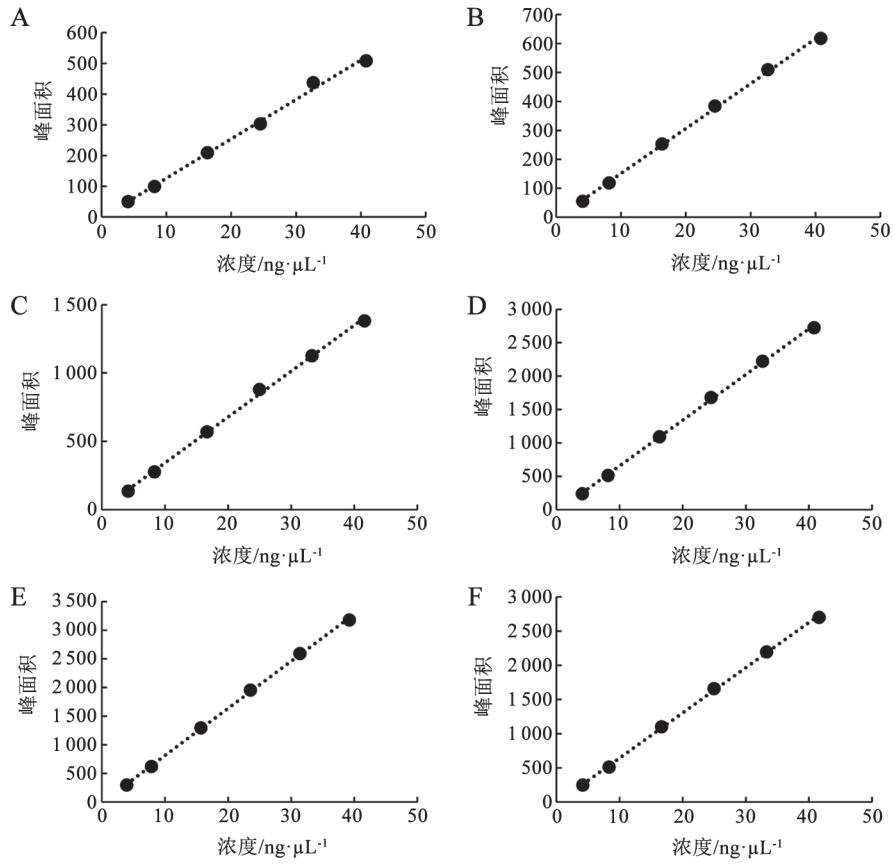


图3 六种黄酮类物质标准品的HPLC检测标准曲线

Fig.3 The standard HPLC curves of 6 flavonoid standards

A: 异槲皮苷, $y=17.47x-21.02$, $R^2=0.99870$; B: 芦丁, $y=18.02x-8.52$, $R^2=0.99929$; C: 紫云英苷, $y=33.89x+9.94$, $R^2=0.99909$; D: 槲皮素, $y=68.07x-6.80$, $R^2=0.99979$; E: 山柰素, $y=82.46x-0.58$, $R^2=0.99981$; F: 异鼠李素, $y=66.21x-2.71$, $R^2=0.99982$ 。

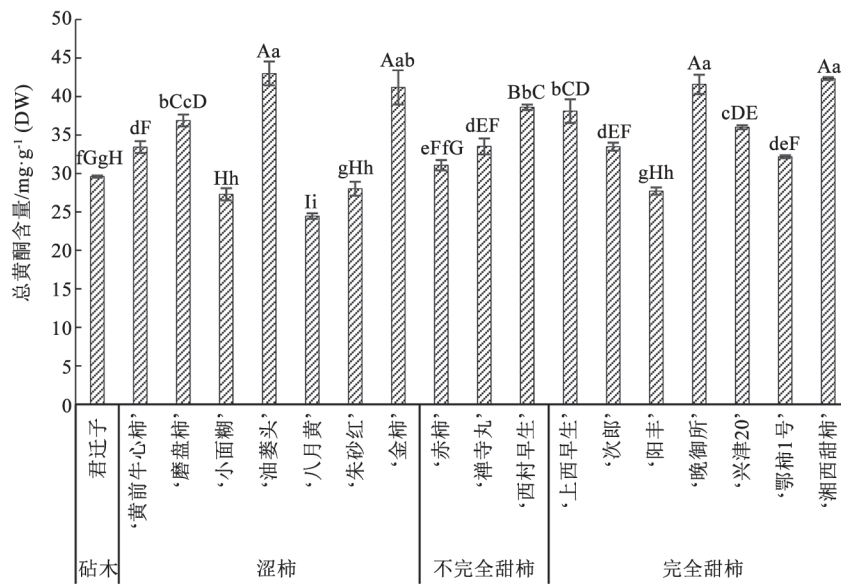


图4 不同品种柿叶中的总黄酮含量

Fig.4 The total flavonoid content in the leaves of different persimmon cultivars

不同大写字母表示差异达极显著水平($P<0.01$); 不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。

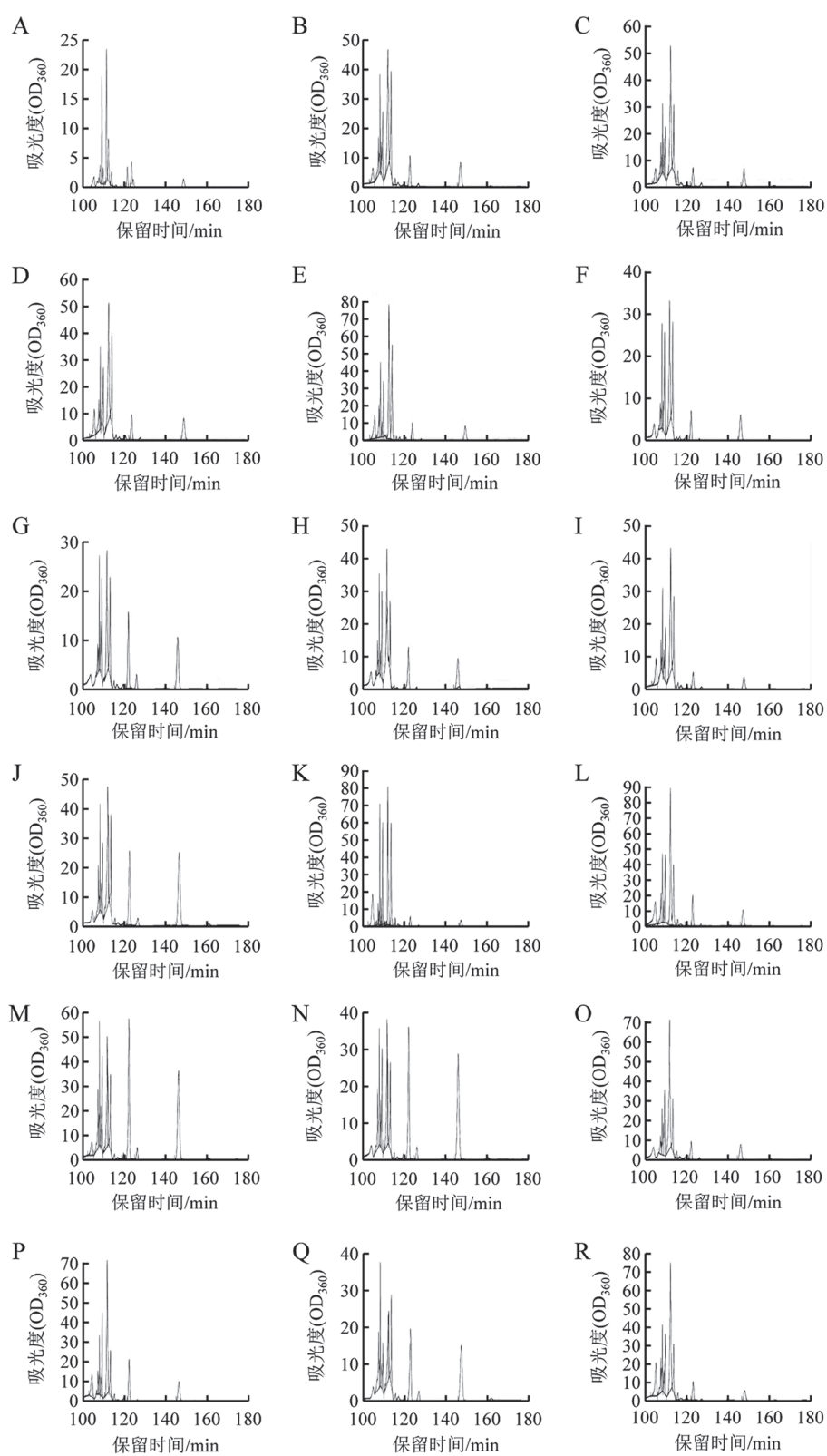


图5 17个品种柿叶黄酮含量检测液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatograms of flavonoids from the leaves of 17 persimmon cultivars

A: 君迁子; B: ‘黄牛心柿’; C: ‘磨盘柿’; D: ‘小面糊’; E: ‘油篓头’; F: ‘八月黄’; G: ‘朱砂红’; H: ‘金柿’; I: ‘赤柿’; J: ‘禅寺丸’; K: ‘西村早生’; L: ‘上西早生’; M: ‘次郎’; N: ‘阳丰’; O: ‘晚御所’; P: ‘兴津20’; Q: ‘鄂柿1号’; R: ‘湘西甜柿’。

表2 17个品种柿叶中6种黄酮类物质的含量

Table 2 The contents of 6 flavonoids in the leaves of 17 persimmon cultivars

		mg·g ⁻¹ (DW)					
品种类型	品种名	异槲皮苷	芦丁	紫云英苷	槲皮素	山柰素	异鼠李素
砧木对照	君迁子	0.669±0.005 ^{KI}	0.138±0.003 ^{GgHhi}	1.459±0.012 ^{Lm}	0.168±0.004 ^{Il}	0.109±0.005 ^{Hj}	—
涩柿	‘黄前牛心柿’	1.613±0.005 ^{li}	0.687±0.018 ^{Dd}	5.985±0.061 ^{Ee}	0.634±0.013 ^{Gh}	0.645±0.016 ^{Ef}	—
	‘磨盘柿’	1.609±0.035 ^{li}	0.617±0.005 ^{Ee}	6.023±0.096 ^{Ee}	0.418±0.012 ^{Hij}	0.513±0.019 ^{Fg}	—
	‘小面糊’	1.901±0.014 ^{Gg}	1.260±0.009 ^{Cc}	6.678±0.053 ^{Dd}	0.624±0.015 ^{Gh}	0.668±0.025 ^{Eef}	—
	‘油葵头’	3.632±0.057 ^{Cc}	0.150±0.011 ^{Gg}	9.036±0.036 ^{Aa}	1.653±0.019 ^{Cc}	1.184±0.095 ^{Cc}	—
	‘八月黄’	1.269±0.011 ^{jk}	0.099±0.007 ^{Hj}	3.839±0.142 ^{Hi}	0.417±0.015 ^{Hij}	0.465±0.031 ^{Fgh}	—
	‘朱砂红’	1.239±0.011 ^{jk}	0.104±0.006 ^{Ghij}	3.242±0.152 ^{Ij}	0.902±0.015 ^{Eff}	0.811±0.019 ^{Dd}	—
	‘金柿’	1.730±0.017 ^{hh}	0.252±0.005 ^{Ff}	3.252±0.030 ^{Ij}	0.795±0.015 ^{Fg}	0.743±0.031 ^{DdEc}	—
不完全甜柿	‘赤柿’	2.104±0.040 ^{Ff}	0.602±0.029 ^{Ee}	5.036±0.248 ^{Ff}	0.299±0.011 ^{lk}	0.269±0.024 ^{Gi}	—
	‘禅寺丸’	1.348±0.038 ^{lj}	2.038±0.049 ^{Bb}	4.387±0.025 ^{Gg}	1.641±0.010 ^{Cc}	2.037±0.015 ^{Bb}	0.075±0.005
	‘西村早生’	2.310±0.037 ^{Ec}	0.126±0.009 ^{GgHhij}	6.804±0.016 ^{Dd}	0.514±0.012 ^{Ghij}	0.522±0.018 ^{Fg}	—
完全甜柿	‘上西早生’	7.428±0.076 ^{Aa}	0.107±0.002 ^{Ghij}	8.335±0.023 ^{Bb}	0.998±0.083 ^{Ee}	0.759±0.014 ^{DdE}	—
	‘次郎’	2.389±0.056 ^{Ec}	0.142±0.005 ^{GgHh}	4.080±0.108 ^{Hh}	3.113±0.109 ^{Aa}	2.628±0.040 ^{Aa}	—
	‘阳丰’	1.318±0.027 ^{jk}	0.097±0.011 ^{Hj}	2.956±0.069 ^{jk}	1.896±0.083 ^{Bb}	2.034±0.065 ^{Bb}	—
	‘晚御所’	2.504±0.060 ^{Dd}	0.130±0.004 ^{GgHhij}	8.886±0.086 ^{Aa}	0.606±0.021 ^{Ghi}	0.657±0.025 ^{Eef}	—
	‘兴津20’	1.623±0.055 ^{li}	0.105±0.006 ^{Ghij}	7.231±0.041 ^{Cc}	1.181±0.102 ^{Dd}	0.738±0.053 ^{DdEc}	—
	‘鄂柿1号’	0.688±0.044 ^{KI}	2.111±0.008 ^{Aa}	1.939±0.060 ^{KI}	1.181±0.017 ^{Dd}	1.147±0.049 ^{Cc}	—
	‘湘西甜柿’	5.631±0.020 ^{Bb}	0.125±0.008 ^{GgHhij}	8.492±0.124 ^{Bb}	0.612±0.015 ^{Ghi}	0.426±0.015 ^{Fh}	—

同列不同大写字母表示差异达极显著水平($P<0.01$); 不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。

不同柿树品种, 其黄酮类物质的含量有所差异。费学谦等(2004)以湿叶计, 结果显示野生种柿叶黄酮含量明显高于栽培种, 但是野生柿叶的含水量明显低于栽培品种, 若转换为以干叶计, 其黄酮含量会有所不同。韩卫娟等(2016)以干叶计, 测定了15份柿叶资源, 柿近缘种、野生柿、涩柿和甜柿的总黄酮含量分别为33.92、29.43、27.13和16.19 mg·g⁻¹ (DW), 但未研究几个类型之间的差异性。本试验以干叶计, 测定了17个品种柿树叶片的总黄酮含量, 结果显示, 各品种间柿叶总黄酮含量差异极显著, ‘油葵头’、‘金柿’、‘晚御所’和‘湘西甜柿’含量最高; 但各类型间没有明显规律。

柿叶黄酮季节变化差异较小, 但不同品种的高峰期有所不同。费学谦等(2004)的研究表明, 各个品种柿叶总黄酮含量在6月份之前和8月份有两个小高峰期。刘军等(2007)测定了山东和山西多个地方不同月份的柿树叶片总黄酮、槲皮素、山柰素的含量, 认为7~9月山东济南南山地区的柿叶黄酮含量较高, 含量达到34.68 mg·g⁻¹ (DW), 但未研究不同品种间的柿叶黄酮差异。本研究的目的是为柿叶茶的研制做前期探索, 宜以嫩叶为试材, 因此采样时间定为5月中旬, 结果显示, 总黄酮含

量为24.47~43.00 mg·g⁻¹ (DW), 含量最高者为‘油葵头’, 其总黄酮含量高于刘军等(2007)所测的最高含量, 但槲皮素和山柰素含量低于其所测的含量, 有可能是因为采样时黄酮含量未达到高峰期。

不同柿树品种中, 6种黄酮类物质含量亦有所差异。本实验中, 除‘鄂柿1号’外, 其余各柿树品种间的黄酮含量均以紫云英苷最高, 其中紫云英苷含量最高的品种为‘油葵头’, 9.036 mg·g⁻¹ (DW); 异槲皮苷含量最高的品种为‘上西早生’, 7.428 mg·g⁻¹ (DW); 芦丁含量最高的品种为‘鄂柿1号’, 2.111 mg·g⁻¹ (DW); 槲皮素含量最高的品种为‘次郎’, 3.113 mg·g⁻¹ (DW); 山柰素含量最高的品种为‘次郎’, 2.628 mg·g⁻¹ (DW); 仅在‘禅寺丸’中发现微量异鼠李素, 为0.075 mg·g⁻¹ (DW)。

本试验研究结果说明, ‘油葵头’、‘金柿’、‘晚御所’、‘湘西甜柿’、‘上西早生’、‘鄂柿1号’、‘次郎’的黄酮含量较高, 均可用于柿叶茶的研制, 并可根据总黄酮及不同黄酮类物质的含量要求, 选择相应品种的柿树嫩叶进行柿叶茶的研制和加工。

参考文献

- Akimoto N, Ara T, Nakajima D, Suda K, Ikeda C, Takahashi S, Muneto R, Yamada M, Suzuki H, Shibata D, et al (2017). FlavonoidSearch: a system for comprehensive flavonoid annotation by

- mass spectrometry. *Sci Rep*, 7 (1): 1243–1251
- An M, Yu XM, Wang J, Liu JF, Ai CX (2016). Establishment of simultaneous detection method of six flavonoids from persimmon leaves. *Shandong Agric Sci*, 48 (5): 131–136 (in Chinese with English abstract) [安淼, 余贤美, 王洁, 刘加芬, 艾呈祥(2016). 同时测定6种柿叶黄酮类物质方法的建立. *山东农业科学*, 48 (5): 131–136]
- An QR, Guo ZF (2000). Analysis of fatty acids in persimmon leaves by GC-MS. *J Instrument Anal*, 19 (1): 74–75 (in Chinese with English abstract) [安秋荣, 郭志峰(2000). 用GC-MS法分析柿树叶中的脂肪酸. *分析测试学报*, 19 (1): 74–75]
- Bai WN, Chen YZ, Yan JH, Yan YP, Shi W, Xie L (2013). Effect of total flavonoids in persimmon leaf on the expression of arteriosclerosis apoE^{-/-} mice's adhesion molecule. *J Nanjing Univ TCM*, 29 (1): 35–38 (in Chinese with English abstract) [白卫娜, 陈英珠, 闫静辉, 严玉平, 时玮, 谢丽(2013). 柿叶总黄酮对apoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变中粘附分子表达的影响. *南京中医药大学学报*, 29 (1): 35–38]
- Deng H, Lin R, Lin X, Cao F, Huang RB (2012). Hypoglycemic effect of triterpene from persimmon leaves in diabetic mice. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 23 (5): 1198–1199 (in Chinese with English abstract) [邓航, 黎荣, 林兴, 曹芬, 黄仁彬(2012). 柿叶三萜粗提物对糖尿病小鼠血糖及其肝糖原的影响. *时珍国医国药*, 23 (5): 1198–1199]
- Deng ZD, Huang YZ, Pan LS, Yan LN, She X, Li L, Zheng N (2017). Effect of flavonoid from *Diospyros kaki* leaf on expressions of CTGF, VEGF, HIF-1 α in retina of KKAY mice. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 23 (2): 115–119 (in Chinese with English abstract) [邓振德, 黄勇志, 潘丽莎, 颜鲁宁, 余啸, 李丽, 郑妮(2017). 柿叶黄酮对KKAY小鼠视网膜病变CTGF, VEGF, HIF-1 α 的影响. *中国实验方剂学杂志*, 23 (2): 115–119]
- Fan K, Hu S, Fan DM, Wang YQ, Lu YT, Wang XC (2016). Regulation of nitrogen on plant flavonoid biosynthesis. *Plant Physiol J*, 52 (6): 843–850 (in Chinese with English abstract) [范凯, 胡双, 范冬梅, 汪瑛琦, 陆娅婷, 王校常(2016). 植物类黄酮物质合成中的氮素调控. *植物生理学报*, 52 (6): 843–850]
- Fei XQ, Zhou LH, Gong BC (2004). The variations of vitamin C and phenolics contents in leaves of *Diospyros* L. *Forest Res*, 17 (5): 616–622 (in Chinese with English abstract) [费学谦, 周立红, 龚榜初(2004). 不同柿种柿叶维生素C和酚类物质的差异. *林业科学研究*, 17 (5): 616–622]
- Fu JM, Liang JJ, Zhou DS (2013). Review on effective constituents of persimmon leaves. *J Cent South Univ Forest Technol*, 33 (11): 66–72 (in Chinese with English abstract) [傅建敏, 梁晋军, 周道顺(2013). 柿叶有效成分研究综述. *中南林业科技大学学报*, 33 (11): 66–72]
- Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Jesion I, Namiesnik J, Drzewiecki J, Park YS, Ham KS, Giordani E, Trakhtenberg S (2011). Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: investigation *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition*, 27 (7–8): 838–846
- Han J, Kang S, Choue R, Kim H, Leem K, Chung S, Kim C, Chung J (2002). Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminiaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia*, 73 (7–8): 710–712
- Han WJ, Li JR, Li HW, Liang YQ, Sun P, Fu JM (2016). Annual variation of total polyphenol and flavonoid contents in leaves of different species (varieties) of *Diospyros*. *J Chin Agric Univ*, 21 (2): 31–40 (in Chinese with English abstract) [韩卫娟, 李加茹, 李华威, 梁玉琴, 孙鹏, 傅建敏(2016). 不同(品)种柿叶总酚与总黄酮含量年动态变化研究. *中国农业大学学报*, 21 (2): 31–40]
- Huang SW, Qiao JW, Zuo YF, Li Z, Chen SN, Sun B, Wu DL, Li LZ, Song SJ (2016). Quality standard of persimmon leaf flavonoids. *Chin Pharm*, 25 (2): 34–37 (in Chinese with English abstract) [黄顺旺, 乔金为, 左亚锋, 李正, 陈师农, 孙备, 吴德玲, 李玲芝, 宋少江(2016). 柿叶总黄酮的初步质量研究. *中国药业*, 25 (2): 34–37]
- Itoh T, Ohguchi K, Nakajima C, Oyama M, Iinuma M, Nozawa Y, Akao Y, Ito M (2011). Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Fuyu) on antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Food Chem*, 126 (1): 289–294
- Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Suemura M, Kishimoto T, Tanaka T(2000). Persimmon leaf extract and astragalus inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol*, 106 (1): 160–166
- Lin GR, Luo SL (2015). Separation and antioxidation efficacy of persimmon leaf flavonoid. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 30 (3): 62–65, 79 (in Chinese with English abstract) [林国荣, 罗素丽(2015). 柿叶总黄酮的分离及对油脂抗氧化的研究. *中国粮油学报*, 30 (3): 62–65, 79]
- Ling WD, Du G (2016). Effect of flavonoid from *Diospyros kaki* leaves on TGF- β 1 and MMP-9 in blood glucose levels and kidney tissues of rats with diabetic nephropathy. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 22 (16): 139–143 (in Chinese with English abstract) [零伟德, 杜刚(2016). 柿叶黄酮对糖尿病肾病大鼠血糖值及肾组织中TGF- β 1和MMP-9的影响. *中国实验方剂学杂志*, 22 (16): 139–143]
- Liu J, Lang AD, Li CC (2007). Study on the contents of quercetin and kaempferol in persimmon leaves from various habitats and different collecting time. *J Chin Med Mater*, 30 (2): 139–141 (in Chinese) [刘军, 郎爱东, 李翠翠(2007). 不同产地和采收期柿叶的槲皮素和山柰酚含量比较. *中药材*, 30 (2): 139–141]
- Liu XQ, Tu H, Wang SC, Zhang HY, Luo J, Xu J (2016). Flavonoid composition of *Citrus* juice sacs determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Plant Physiol J*, 52 (5): 762–770 (in Chinese with English abstract) [刘贤青, 涂虹, 王守创, 张红艳, 罗杰, 徐娟(2016). 不同类型柑橘果实汁胞中类黄酮的液相色谱质谱联用分析. *植物生理学报*, 52 (5): 762–770]
- Lu C (2015). Study on the protective effect of total flavonoids in persimmon leaves against carbon tetrachloride-induced acute liver injury. *J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 43 (5): 67–70, 75 (in Chinese with English abstract) [吕超(2015). 柿叶总黄酮的制备及对肝损伤的保护作用. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 43 (5): 67–70, 75]
- Ma YJ, Shang YY, Wang DJ, Sun MH, Hou XY, Hong Y, Zeng ZL, Liu XP (2015). Neuroprotective effects of flavonoids extracted

- from the leaves of *Diospyros kaki* in D-galactose induced aging mice by attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Fudan Univ J Med Sci*, 42 (1): 7–12, 30 (in Chinese with English abstract) [马莹娟, 尚玉莹, 王德杰, 孙梦晗, 侯训尧, 洪艳, 曾子玲, 刘雪平(2015). 柿叶黄酮类化合物对D-半乳糖致衰老小鼠的抗炎抗氧化神经保护作用. *复旦学报(医学版)*, 42 (1): 7–12, 30]
- National Pharmacopoeia Commission (2010). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine (in Chinese) [国家药典委员会(2010). *中华人民共和国药典一部*. 北京: 中国医药科技出版社]
- Qin DJ, Liang YH, Huang RS, Liu HG, Zhang P (2012). Establishment of content determination of quercetin and kaempferol in Zhuang medicine of persimmon leaves. *Guangxi Med J*, 34 (9): 1133–1136 (in Chinese with English abstract) [覃冬杰, 梁永红, 黄瑞松, 刘华钢, 张鹏(2012). 壮药柿叶槲皮素和山柰素含量测定方法的建立. *广西药学*, 34 (9): 1133–1136]
- Shang YY, Ma YJ, Wu XF, Hou XY, Luo DZ, Chen J, Hong Y, Shen C, Liu XP (2016). Synapse-protective effect of flavonoids extracted from the leaves of *Diospyros kaki* in APP/PS1 transgenic mice. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 54 (2): 33–37 (in Chinese with English abstract) [尚玉莹, 马莹娟, 吴小凡, 侯训尧, 罗鼎真, 陈健, 洪燕, 申超, 刘雪平(2016). 柿叶黄酮类化合物对APP/PS1转基因小鼠脑组织突触的保护作用. *山东大学学报(医学版)*, 54 (2): 33–37]
- Sun CY, Liu XH, Wang QH, Li YY, Zhang FL (2014). Semi-bionic extraction of total flavonoids from persimmon leaves and its antioxidant and antibacterial effects. *Food Res Dev*, 35 (10): 115–118 (in Chinese with English abstract) [孙彩云, 柳鑫华, 王庆辉, 李媛媛, 张飞龙(2014). 半仿生提取柿叶黄酮及其抗氧化和抗菌作用. *食品研究与开发*, 35 (10): 115–118]
- Sun LJ, Zhang JB, Lu XY, Zhang LY, Zhang YL (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol*, 49 (10): 2689–2696
- Wu YL, Lin JF, Lin HT, Chen L, Chen YH (2007). Effects of harvesting dates on chemical constituents of An'xi persimmon leaves. *Pack Food Mach*, 25 (6): 19–22 (in Chinese with English abstract) [吴玉林, 林娇芬, 林河通, 陈莲, 陈艺晖(2007). 采收期对安溪油柿柿叶化学成分含量的影响. *包装与食品机械*, 25 (6): 19–22]
- Xiang Y, Zhao RX, Lai FN, Sun XH, Dai HY, Zhang YG (2016). Components of flavonoids and antioxidant activity analysis of the extracts from red-flesh apple peel. *Plant Physiol J*, 52 (9): 1353–1360 (in Chinese with English abstract) [项亚, 赵瑞雪, 赖方祿, 孙欣, 孙晓红, 戴洪义, 张玉刚(2016). 红肉苹果果皮类黄酮组分及抗氧化活性分析. *植物生理学报*, 52 (9): 1353–1360]
- Zhang JX, Zhou JK, Wu ZY (2002). Determination of organic acids and inorganic anions in persimmon leaves by single-column ion chromatography. *Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal)*, 38 (1): 29–32 (in Chinese with English abstract) [张吉祥, 周建科, 吴志勇(2002). 离子色谱法测定柿叶中有机酸和无机阴离子. *理化检验(化学分册)*, 38 (1): 29–32]
- Zhang YA, Miao JN, Wang MY, Qian L, Shuai JP (2016). Clearance effect of *Diospyros kaki* leaves extract on nitrite in mimic gastric juice. *Chem Res Appl*, 28 (2): 196–199 (in Chinese with English abstract) [张亚安, 缪将能, 王梦云, 钱玲, 帅建平(2016). 模拟胃液下柿叶提取物清除亚硝酸盐的研究. *化学研究与应用*, 28 (2): 196–199]
- Zhou XT, Wang LL, Han L, Zhang TJ, Liu F (2014). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Diospyros kaki* leaves. *Chin Tradit Herb Drugs*, 45 (21): 3195–3203 (in Chinese with English abstract) [周鑫堂, 王丽莉, 韩璐, 张铁军, 刘方(2014). 柿叶化学成分和药理作用研究进展. *中草药*, 45 (21): 3195–3203]

The detection of flavonoids from leaves of 17 persimmon cultivars

AN Miao, YU Xian-Mei, WANG Jie, LIU Jia-Fen, AI Cheng-Xiang*

Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: The leaves of 17 persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars were used to analyze total flavonoid content by using ultraviolet-visible spectrophotometry, and detect the contents of six flavonoids including isoquercitrin, rutin, astragaln, quercetin, kaempferide and isorhamnetin by using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that there was significant difference in the total flavonoid content among different cultivars, with the values ranging from 24.47 to 43.00 mg·g⁻¹ (DW). The total flavonoid content of ‘Youloutou’, ‘Jinshi’, ‘Oku-gosho’ and ‘Xiangxitianshi’ were the highest with the values of 43.00, 41.17, 41.57 and 42.32 mg·g⁻¹ (DW) respectively, and there was no significant difference between them. The total flavonoid content of ‘Bayuehuang’ was the lowest with the value of 24.47 mg·g⁻¹ (DW). However, there was no obvious correlation between the total flavonoid content and different cultivar types of stock, astringent persimmon, pollination variant non-astringent (PVNA) persimmon and pollination-constant and non-astringent (PCNA) persimmon. The HPLC result showed that astragaln content was the highest in all the tested cultivars except ‘Eshi 1’, whereas the isorhamnetin was only detected in ‘Zenjimarū’ with the very low value of 0.075 mg·g⁻¹ (DW). The results of this research indicated that there were rich flavonoids in the cultivars of ‘Youloutou’, ‘Jinshi’, ‘Oku-gosho’, ‘Xiangxitianshi’, ‘Uenishiwase’, ‘Eshi 1’ and ‘Jiro’, which could be used for the process of persimmon leaf tea.

Key words: persimmon leaves; flavonoids; ultraviolet-visible spectrophotometry; HPLC

Received 2017-05-04 Accepted 2017-10-20

This work was supported by National Science and Technology Project in “Twelfth five-year” Rural Areas (Grant No. 2013BAD14B0504).

*Corresponding author (E-mail: chengxiang_1975@163.com).