

柿蒂

(KAKI CALYX)

柿蒂 MI

一、藥材採購及鑑定.....	2
二、藥材性狀描述（圖 1）.....	2
三、藥材組織顯微鑑別（圖 2）.....	2
四、藥材粉末顯微鑑別（圖 3）.....	2

柿蒂 HPLC

一、材料.....	6
二、儀器及層析管柱.....	6
三、實驗藥品及試劑來源.....	6
四、方法.....	6
五、結果.....	9

柿蒂 TLC

一、方法.....	21
二、萃法選擇及濃度測試.....	22
三、觀察方式選擇.....	23
四、十批樣品檢測.....	24

柿蒂

(KAKI CALYX)

一、藥材採購及鑑定

收集 10 批來自全臺北、中、南、東各地不同通路之中藥販賣業或中藥製造業的藥材樣品，確認所收集之藥材為柿的乾燥宿萼。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：柿蒂

生藥名：KAKI CALYX

英文名：Persimmon Calyx and Receptacle

基原：柿樹科 Ebenaceae 植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的乾燥宿萼。

採收加工：秋、冬季收集成熟柿子的果蒂（宿萼），去柄，洗淨，曬乾。

藥材性狀：本藥材為柿的乾燥宿萼。宿萼呈皿狀，直徑 1.5~2.5 cm，厚 1~4 mm。外表面紅棕色，披稀疏短毛；內表面黃棕色，密披細絨毛，呈放射狀排列。中央較厚，微隆起，有果實脫落後的圓形疤痕，邊緣較薄，4 裂，裂片呈寬三角形，長 1~1.5 cm，寬約 2 cm，常向上反卷或破碎不完整，基部具果柄或圓形凹陷的果柄痕。質硬而脆，體輕，氣微，味澀。

生長分佈：落葉大喬木，高達 14 m。花期 4~5 月，果期 9~10 月。喜高溫多濕環境。多為栽培。主產河南、山東，福建、河北、山西等地。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 外表皮棕褐色，由數層細胞組成。
2. 石細胞呈類橢圓形或多角形，多數成群。
3. 可見草酸鈣方晶，單個或成群散在。
4. 偶見腺毛，長 25~40 μm ，直徑約 30 μm ，內含紅棕色物質。
5. 可見非腺毛，長 75~300 μm ，直徑 15~25 μm ，內含棕色物質。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末棕色。
2. 外表皮細胞呈多角形或類方形，氣孔不定式。
3. 腺毛偶見，頭部由 2~3 個細胞組成，直徑約 30 μm ，充滿紅棕色物質。
4. 非腺毛單細胞，長 150~300 μm ，直徑 20~25 μm ，壁厚，胞腔內含棕色

物質。

5. 石細胞眾多，長條形、類方形、類三角形或不規則形，直徑 80~120 μm ，壁不均勻增厚，外側有瘤狀突起或略呈短分支狀，紋孔細密，孔溝明顯。
6. 草酸鈣方晶，直徑 5~30 μm 。

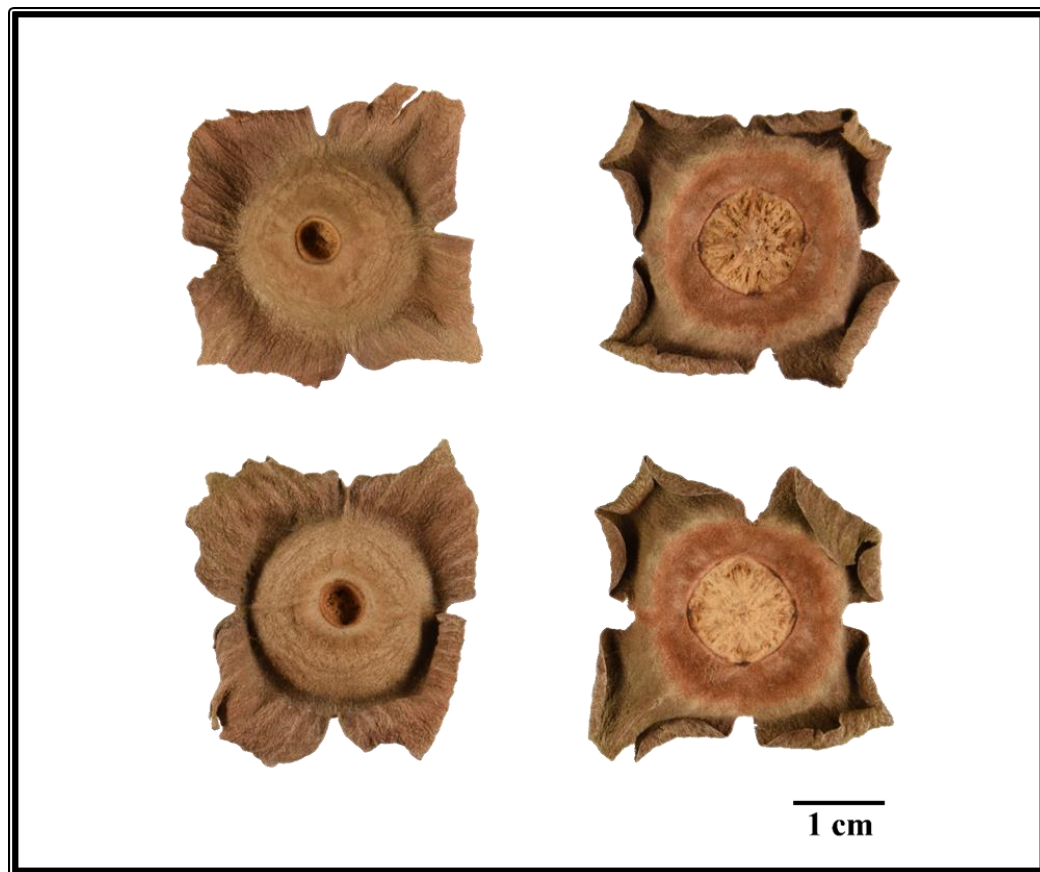


圖 1 柿蒂藥材圖

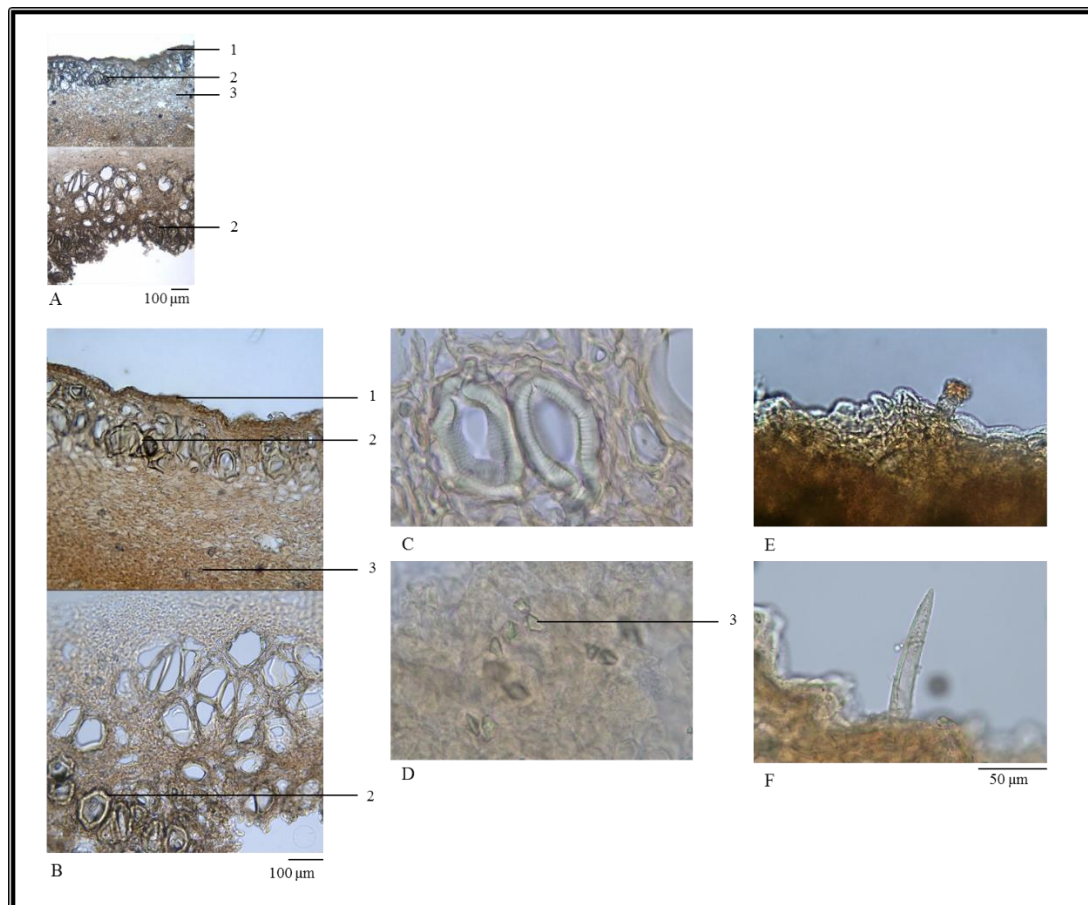


圖 2 柿蒂橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.石細胞 D.草酸鈣方晶 E.腺毛 F.非腺毛
1.外表皮 2.石細胞 3.草酸鈣方晶

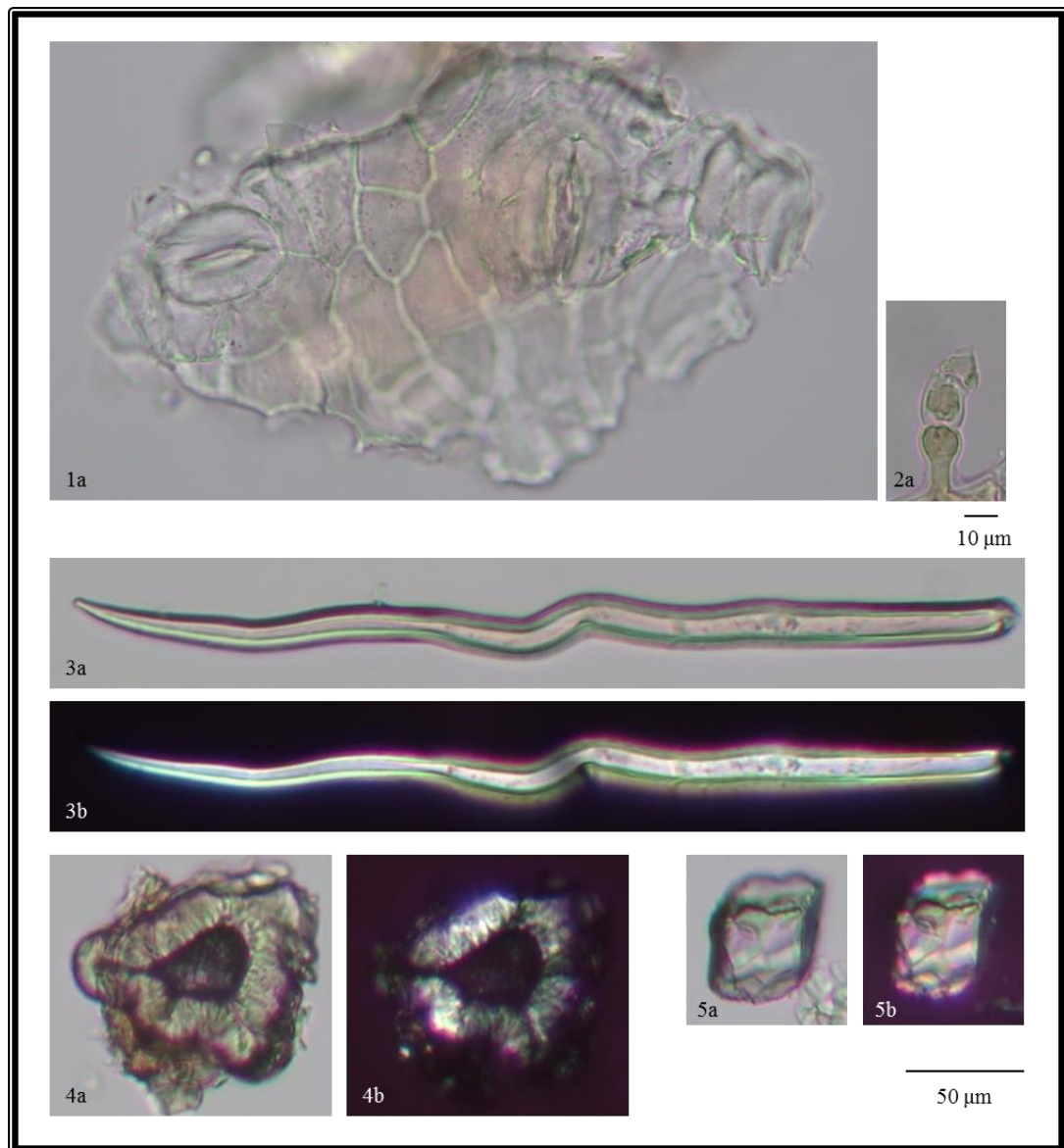


圖 3 柿蒂粉末顯微特徵圖

a.光學顯微鏡下特徵 b.偏光顯微鏡下特徵

1.表皮細胞與氣孔 2.腺毛 3.非腺毛 4.石細胞 5.草酸鈣方晶

柿蒂(Kaki Calyx)

一、材料

購自於台灣各地中藥店柿蒂藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1100 series，包含 Degasser G1379A、QuatPump G1311A、Sampler G1329B、DAD G1315B；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Column (250 x 4.6 mm, 5 μ m)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters AcQuity Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sample Manager、PDA Detector；層析管柱 Waters Acquity UPLC BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(HPLC Grade)購自於 DUKSAN PURE CHEMICALS；乙醇(95%)購自於國韶實業有限公司；磷酸(85%+)購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品沒食子酸(Gallic acid)購自於 ACROS，純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒開發

取本品粉末六份，每份精確稱定 1.0 g，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇和 50%乙醇各 25 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後取 1 mL 萃取液過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μ m)，即得。每針 10 μ L 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得之標準品沒食子酸(Gallic acid)最大波峰面積為最佳柿蒂萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

取本品粉末約 1.0 g (過第 20 號篩網)，精確稱定，置 50 mL 離心管中，精確加入 75%甲醇 25 mL，漩渦震盪 30 秒，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 15 分鐘 (約 4000 x g)。取上清液轉移至 25 mL 定量瓶中，加入 75%甲醇定容刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μ m)，取濾液，即得。每針 10 μ L 注入 HPLC，殘渣部分重複上述方法多次萃取、進樣，直到指標成分被萃取完全，並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

取標準品沒食子酸(Gallic acid)精確稱定 1.0 mg，加 1 mL 的水製成每 1 mL 含沒食子酸(Gallic acid) 1000 µg 的標準品儲備溶液，並以水稀釋至 10 µg/mL 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，精確稱定，置 50 mL 離心管中，精確加入 75% 甲醇 25 mL，漩渦震盪 30 秒，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 15 分鐘(約 4000 x g)，取得上清液，殘渣部分重複提取一次，合併濾液，減壓濃縮至少量，轉移至 25 mL 定量瓶中，加 75% 甲醇定容至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 µm)，即得。

(五) 測定法

分別精確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中沒食子酸(Gallic acid)的含量，即得。

(六) 檢量線

精確吸取沒食子酸(Gallic acid)標準品儲備溶液適量(1000 µg/mL)，以水稀釋製成含沒食子酸(Gallic acid)分別為 125、100、75、50、25、10、5.0 µg/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 µL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

(七) 精確度試驗

以沒食子酸(Gallic acid)濃度為 10 µg/mL 之標準品儲備液連續進樣五針，以沒食子酸(Gallic acid)的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一批市售柿蒂粉末，依柿蒂檢品溶液製備方法平行製備五份柿蒂檢品溶液，進樣測定，以沒食子酸(Gallic acid)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售柿蒂粉末，依柿蒂檢品溶液製備方法製備柿蒂檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以沒食子酸(Gallic acid)的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

偵測極限(limit of detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值；定量極限(limit of quantitation, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知沒食子酸(Gallic acid)含量的柿蒂藥材粉末約 0.5 g，精確稱定五份，分別加入 1 mL 的沒食子酸(Gallic acid) 溶液(210 $\mu\text{g/mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Column (250 x 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 217 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	7	93
20	7	93

(十二) 臺灣市售柿蒂含量測定

取十批市售柿蒂藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續三針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品沒食子酸(Gallic acid)的百分含量。

(十三) 柿蒂檢品之 UPLC 層析條件

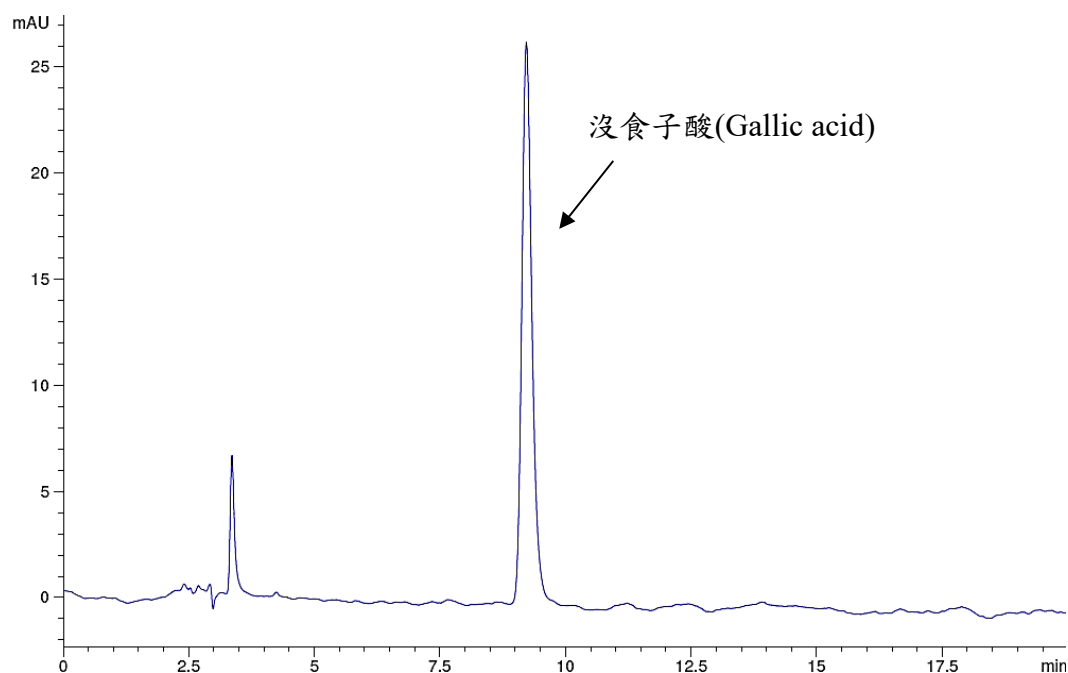
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 217 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：25 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：1.0 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	7	93
10	7	93

五、結果

(一) 標準品沒食子酸(Gallic acid)之 HPLC 層析

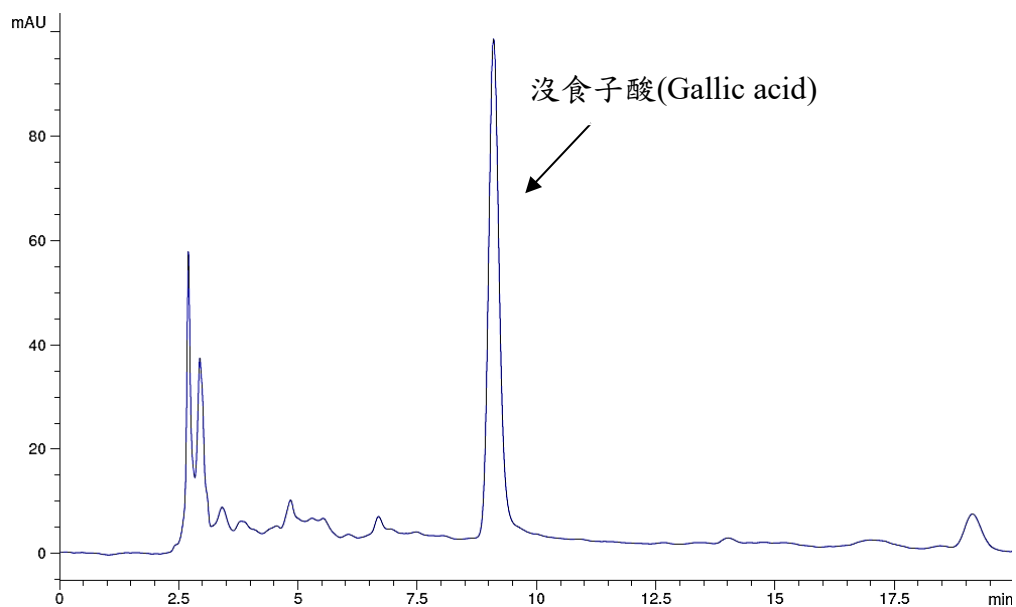
於滯留時間 9.1 分鐘處顯示沒食子酸(Gallic acid)標準品的波峰(圖一)。



圖一、沒食子酸(Gallic acid)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售柿蒂檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 9.1 分鐘顯示柿蒂檢品中沒食子酸(Gallic acid)的波峰(圖二)，分離率為 $R > 5.0$ ，托尾因子為 $T = 1.087$ ，均在系統適用性要求內。



圖二、市售柿蒂檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒開發

以 75% 甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得沒食子酸(Gallic acid) 的波峰面積最大，顯示 75% 甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	沒食子酸(Gallic acid) 波峰面積	最佳萃取
甲醇	778.9	
75% 甲醇	1602.2	√
50% 甲醇	1268.5	
95% 乙醇	476.5	
75% 乙醇	988.8	
50% 乙醇	1345.3	

(四) 最佳萃取次數評估

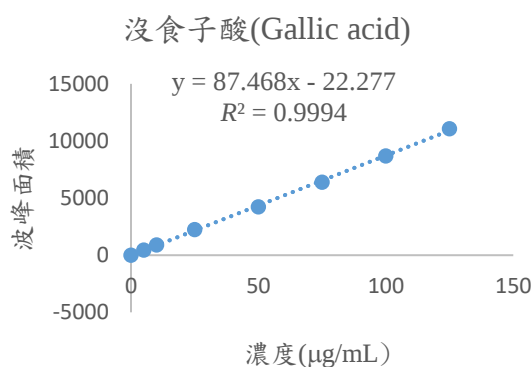
結果顯示萃取兩次基本上已將沒食子酸(Gallic acid)萃取完全(>98%)

表二、柿蒂檢品萃取次數評估

75% 甲醇萃取次數	沒食子酸(Gallic acid)波峰面積
第一次	857.1
第二次	217.7
第三次	26.4

(五) 標準品沒食子酸(Gallic acid)檢量線

經不同濃度沒食子酸(Gallic acid) (x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 87.468x - 22.277$ ， $R^2 = 0.9994$ ，顯示濃度在 5.0–125 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、沒食子酸(Gallic acid)之檢量線圖

表三、沒食子酸(Gallic acid)之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
沒食子酸(Gallic acid)	5.0–125	$y = 87.468x - 22.277$	0.9994

(六) 再現性與精確度試驗

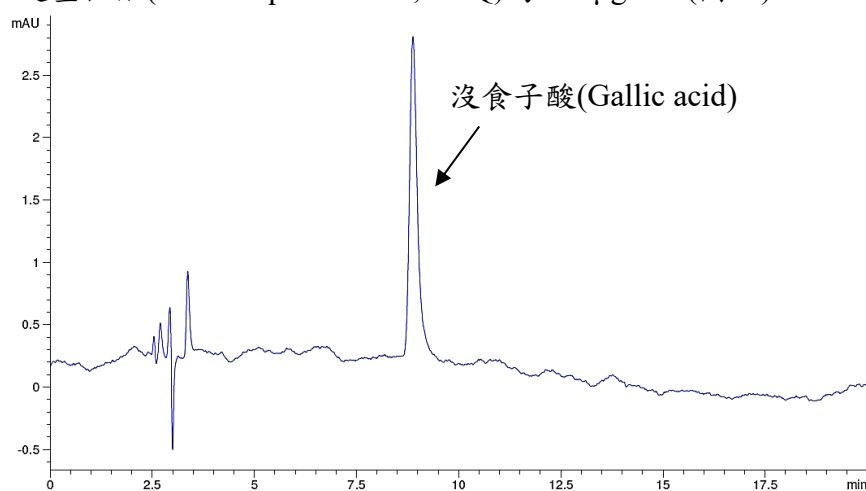
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精確度良好，沒食子酸(Gallic acid)精確度之相對標準差為 1.05%，再現性之相對標準差為 4.88%，均在系統適用性要求內。

(七) 穩定性試驗

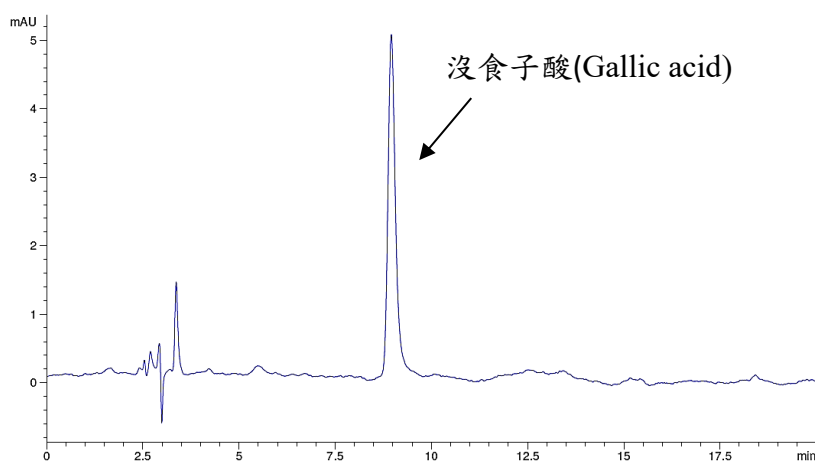
由結果可以得知沒食子酸(Gallic acid)在 24 小時內穩定性，相對標準差為 3.35%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

沒食子酸(Gallic acid)偵測極限(limit of detection, LOD)為 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、沒食子酸(Gallic acid)之 LOD 層析圖



圖五、沒食子酸(Gallic acid)之 LOQ 層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	沒食子酸(Gallic acid)	
	濃度	R.S.D. (%)
精確度 (n=5)	10 µg/mL	1.05
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	4.88
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.5)	3.35
偵測極限 (n=1)	2.5 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	5.0 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

添加沒食子酸(Gallic acid) 平均回收率 106.8%，相對標準偏差 1.76%。

表五、沒食子酸(Gallic acid)添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.51	0.21	0.21	0.44	108.1	106.8	1.76
2	0.54	0.22	0.21	0.45	107.8		
3	0.53	0.22	0.21	0.44	106.5		
4	0.54	0.22	0.21	0.44	103.6		
5	0.54	0.22	0.21	0.45	107.7		

(十) 台灣市售柿蒂含量測定

10 批柿蒂藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，沒食子酸(Gallic acid)含量為 0.03%–0.07%。建議柿蒂藥材指標成分沒食子酸(Gallic acid)含量的含量不得少於 0.03%。建議理論板數按沒食子酸(Gallic acid)波峰計算應不低於 4000 (實際值為 8247)。

表六、台灣市售柿蒂檢品之沒食子酸(Gallic acid)含量

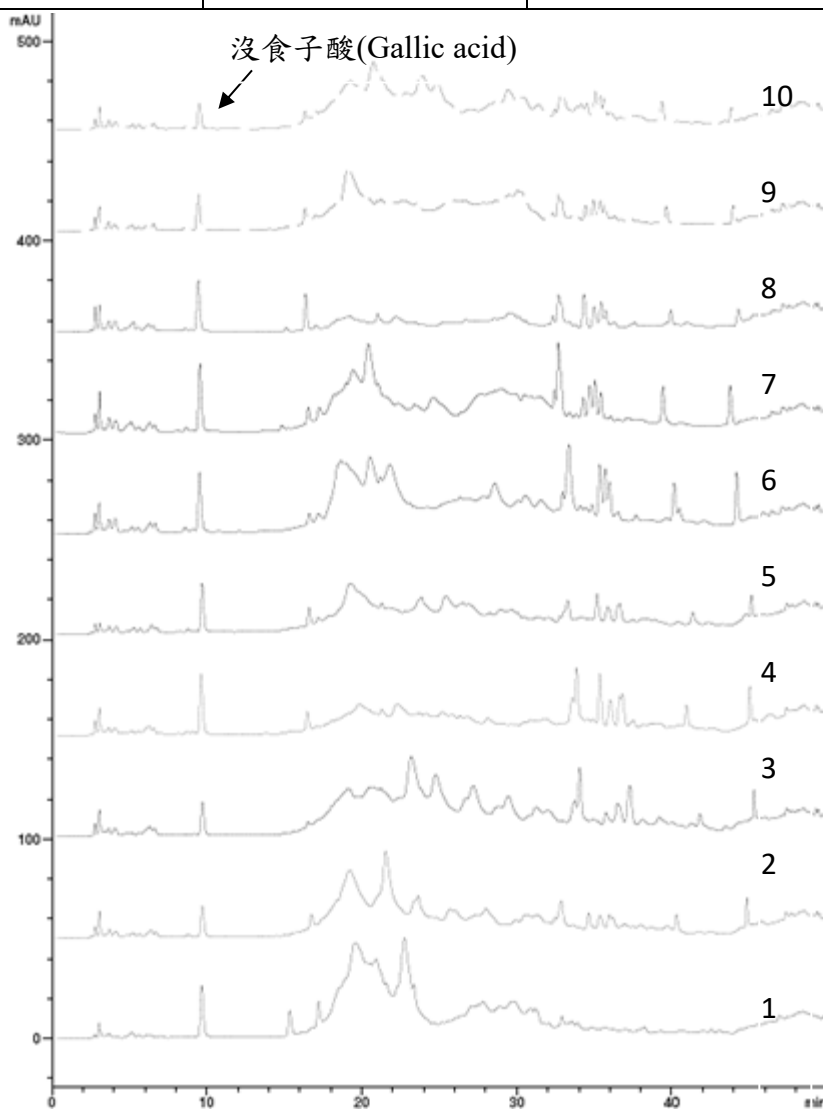
中藥店編號(No.)	沒食子酸(Gallic acid) 含量(%)	中藥店編號 (No.)	沒食子酸(Gallic acid) 含量(%)
1 (NI)	0.06	6 (SU)	0.06
2 (SC)	0.03	7 (NN)	0.07
3 (SG)	0.04	8 (CG)	0.05
4 (CA)	0.06	9 (SJ)	0.04
5 (SE)	0.05	10 (NC)	0.03

(十一) 市售柿蒂藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取十批市售柿蒂檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Column (250 x 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10.0 μ L
6. 移動相：

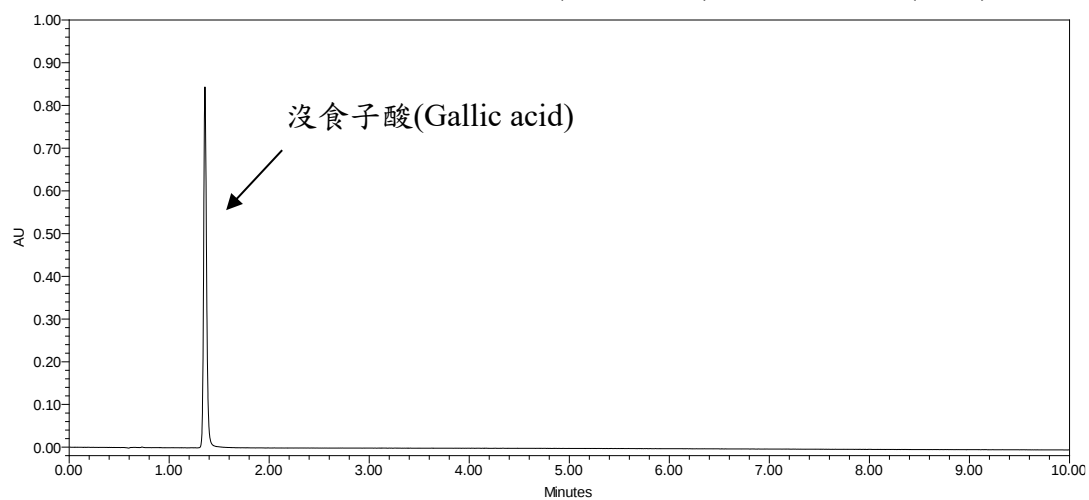
時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	5	95
10	10	90
15	25	75
40	50	50
45	95	5
50	95	5



圖六、10 批柿蒂藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品沒食子酸(Gallic acid)之 UPLC 層析

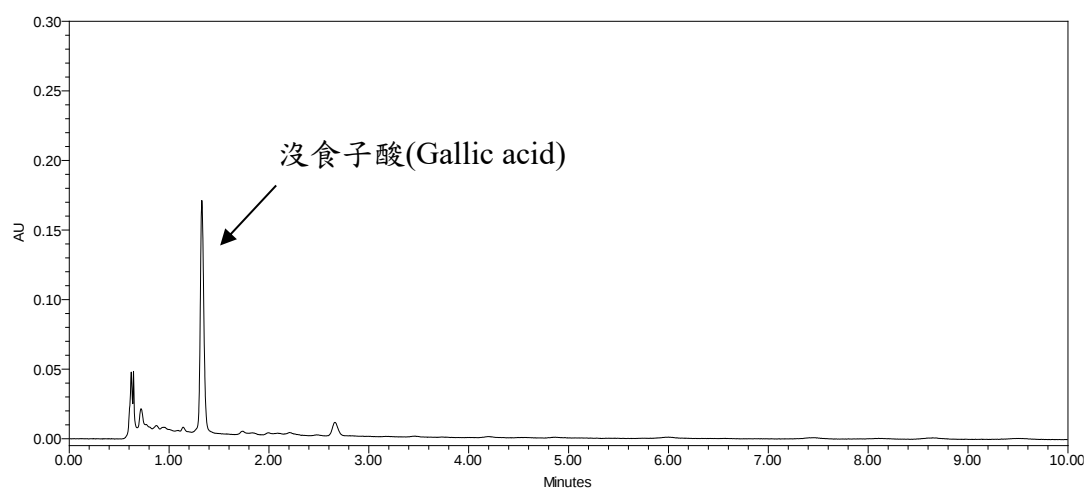
於滯留時間 1.3 分鐘處顯示沒食子酸(Gallic acid)標準品的波峰(圖七)。



圖七、沒食子酸(Gallic acid) 標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售柿蒂檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 1.3 分鐘顯示柿蒂檢品中沒食子酸(Gallic acid)的波峰(圖八)。

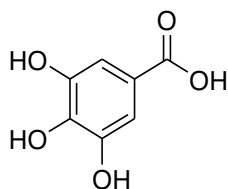


圖八、市售柿蒂檢品之 UPLC 層析圖

(十四) 沒食子酸(Gallic acid)的分子式與分子量

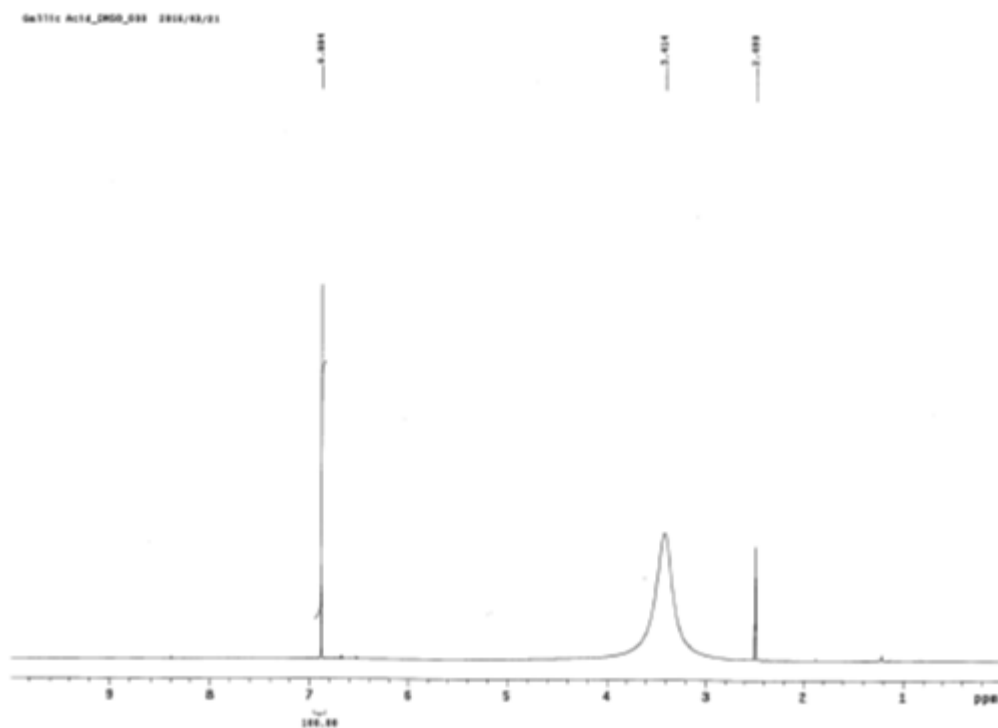
分子式： $C_7H_6O_5$ ；Mol. Wt.：170.12；mp：270–272 °C；白色固體。

(十五) 沒食子酸(Gallic acid)的結構



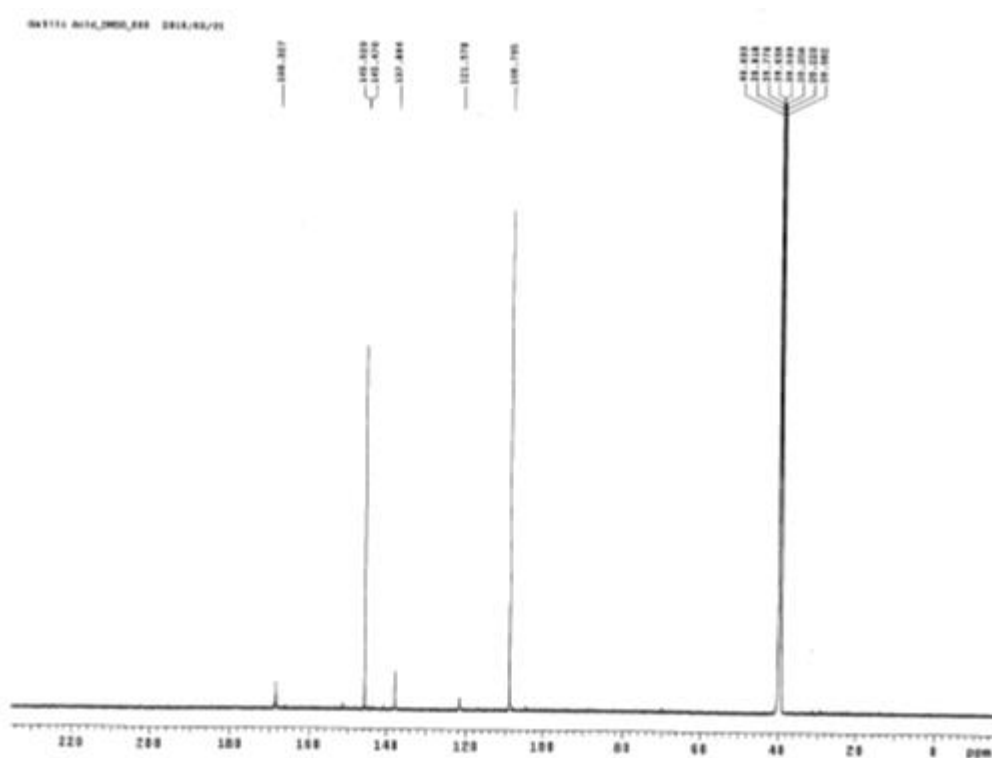
圖九、沒食子酸(Gallic acid)

(十六) 沒食子酸(Gallic acid)的 ^1H NMR 圖譜



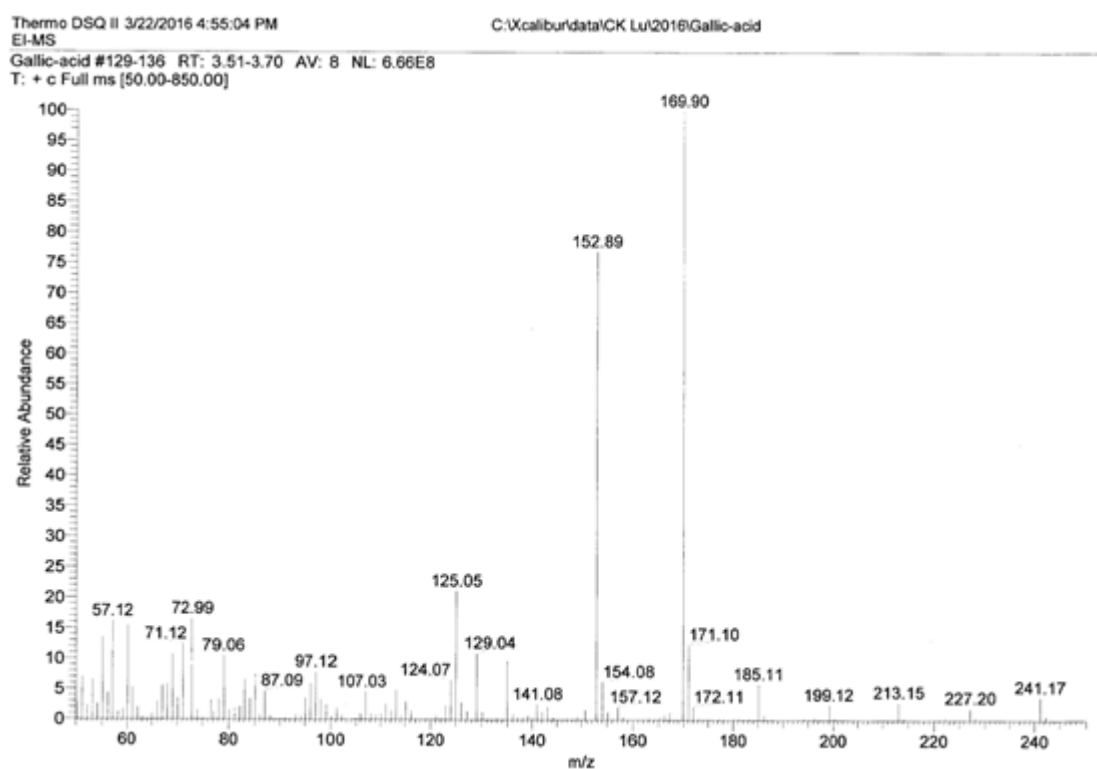
圖十、沒食子酸(Gallic acid)的 ^1H NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十七) 沒食子酸(Gallic acid)的 ^{13}C NMR 圖譜



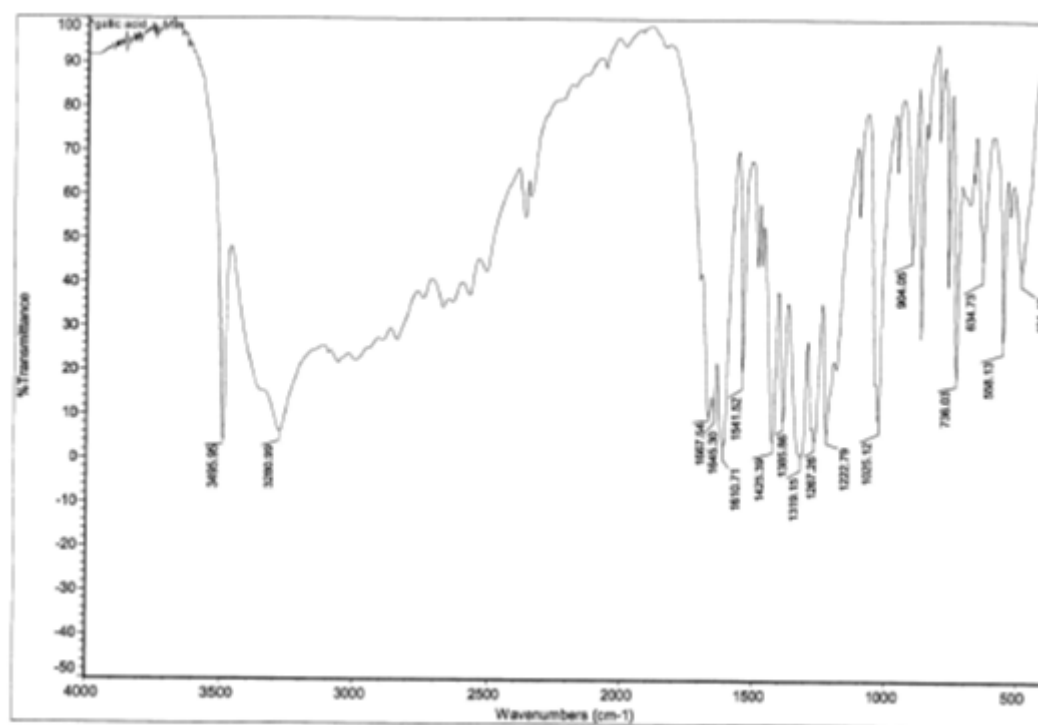
圖十一、沒食子酸(Gallic acid)的 ^{13}C NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十八) 沒食子酸(Gallic acid)的 EI-MS 圖譜



圖十二、沒食子酸(Gallic acid)的 EI-MS 圖譜

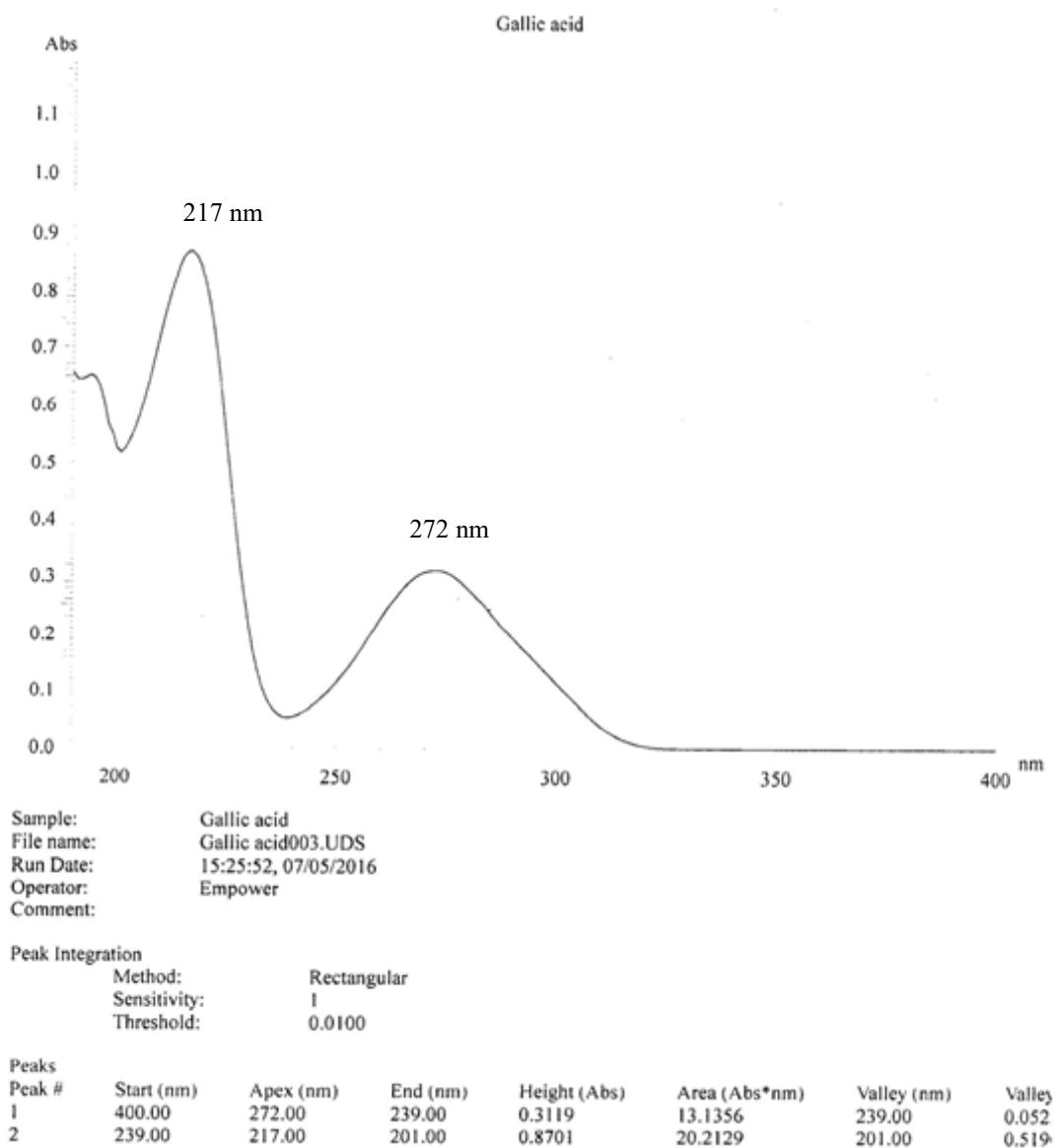
(十九) 沒食子酸(Gallic acid)的 FTIR 圖譜



圖十三、沒食子酸(Gallic acid)的 FTIR 圖譜

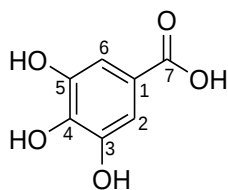
(二十) 沒食子酸(Gallic acid)的 UV 圖譜

Report Date: 15:28:00, 07/05/2016



圖十四、沒食子酸(Gallic acid)的 UV 圖譜

(二十一) 沒食子酸(Gallic acid)的氫、碳化學位移



沒食子酸(Gallic acid)

表七、沒食子酸(Gallic acid)的氫、碳化學位移(DMSO-*d*₆)^a

position	δ_{H} (600 MHz)	δ_{C} (150 MHz)
1	-	121.6
2	-	108.8
3	6.88 (s)	145.5
4	-	137.9
5	-	145.5
6	6.88 (s)	108.8
7	-	168.3

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

柿蒂

生藥名：KAKICALYX

英文名：Persimmon Calyx and Receptacle

基 原：本品為柿樹科 Ebenaceae 植物柿 *Diospyros kaki* Thunb.之乾燥宿存花萼。

一、方法

(一) 檢 品 溶 液 【萃取方法 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)

——取本品粉末 2.0 g，加 70%乙醇 10 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(自行開發) ✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 5 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

【萃取方法 3】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 溶 液 取沒食子酸(Gallic acid)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。

(三) 薄 層 板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(四) 展 開 劑 【展開劑】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015) ✓

——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：4：1)

(五) 展 開 槽 10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(六) 展 開 展開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。

(七) 顯色&檢視 於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視。

二、萃法選擇及濃度測試

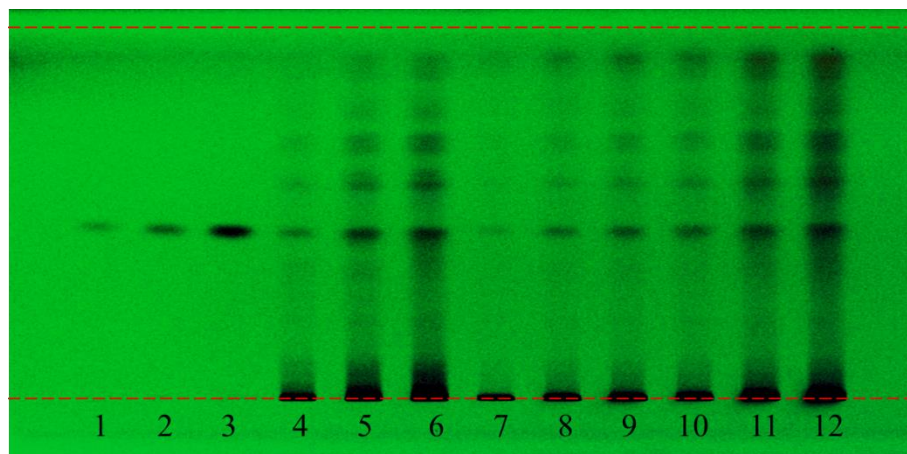
實驗日期：106/07/05

相對溼度(RH)：51%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)——

甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：4：1)



編號	名稱	點注量
1，2，3	沒食子酸(Gallic acid) (0.2 mg/mL)	1，2，5 μ L
4，5，6	檢品溶液 7 【萃取方法 1】	2，5，8 μ L
7，8，9	檢品溶液 7 【萃取方法 2】	2，5，8 μ L
10，11，12	檢品溶液 7 【萃取方法 3】	2，5，8 μ L

建議萃法：3 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出標準品沒食子酸，而由於製備方法較簡便且快速，故選擇【萃取方法 2】。

建議點注量：沒食子酸(Gallic acid)標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】8 μ L。

三、觀察方式選擇

實驗日期：106/07/07

相對溼度(RH)：59%

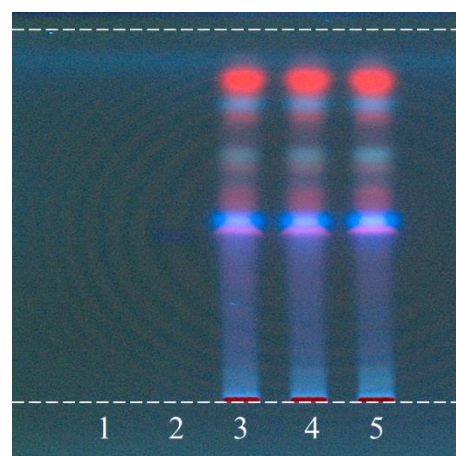
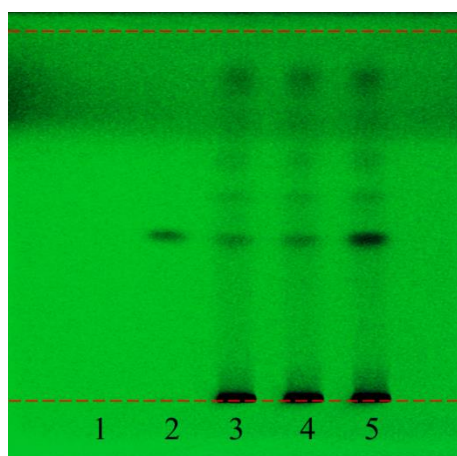
溫度(RT)：24 °C

【展開劑】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)——

甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：4：1)

【萃取方法 2】(自行開發)－HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(沒食子酸 R_f 值為 0.44) ✓

【萃取方法 2】(自行開發)－HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：沒食子酸(Gallic acid)

3，4：檢品溶液 7

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(254 nm)下顯示出較紫外光(365 nm)有明顯之沒食子酸(Gallic acid)標準品斑點。

四、十批樣品檢測

實驗日期：106/07/07

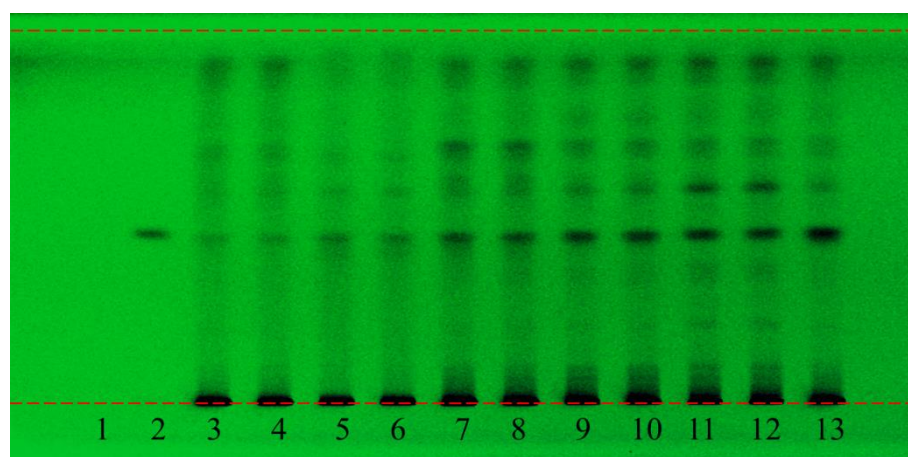
相對溼度(RH)：59%

溫度(RT)：24 °C

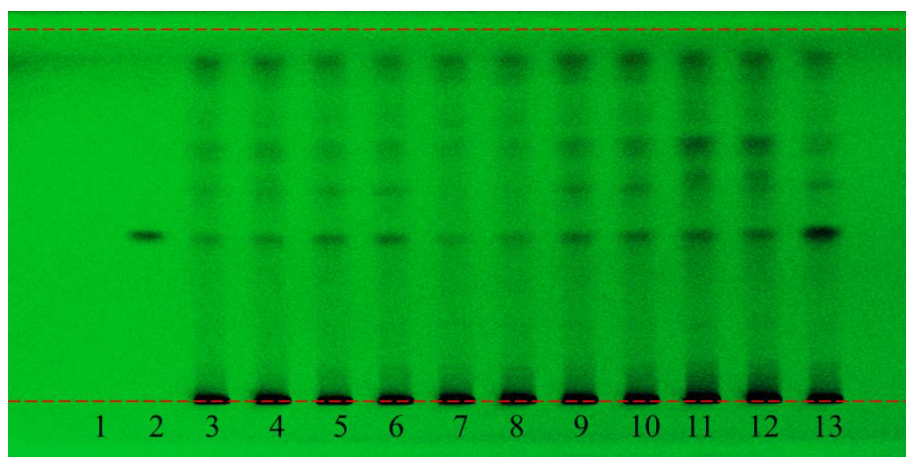
【展開劑】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)——

甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：4：1)

【萃取方法 2】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



1	Blank
2	沒食子酸(Gallic acid) (0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NC)
5 , 6	檢品溶液 2 (NI)
7 , 8	檢品溶液 3 (NN)
9 , 10	檢品溶液 4 (CA)
11 , 12	檢品溶液 5 (CG)
13	Spike (檢品溶液 7)



1	Blank
2	沒食子酸(Gallic acid) (0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 6 (SC)
5 , 6	檢品溶液 7 (SE)
7 , 8	檢品溶液 8 (SG)
9 , 10	檢品溶液 9 (SJ)
11 , 12	檢品溶液 10 (SU)
13	Spike (檢品溶液 7)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 2】方式，並以修飾臺灣中藥典第二版 2013 及修飾中華人民共和國藥典 2015 之【展開劑】分離與檢出沒食子酸(Gallic acid)，於紫外光(254 nm)下檢視較佳。