

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201707012

引文格式: 谢进, 黄艳宁, 徐瑞, 等. 采用液质联用方法检测黄秋葵荚果黄酮类物质含量 [J]. 广西植物, 2017, 37(12):1592-1597
XIE J, HUANG YN, XU R, et al. Content determination of flavonoids from the fruit seed of *Abelmoschus esculentus* by UPLC-QqQ-MS [J].
Guihaia, 2017, 37(12):1592-1597

采用液质联用方法检测黄秋葵荚果黄酮类物质含量

谢进, 黄艳宁, 徐瑞, 曹亮, 范海珊, 朱校奇*

(湖南省农业科学院 农业环境生态研究所, 长沙 410125)

摘要: 采用超声提取方法, 利用液质联用仪建立快速的黄秋葵黄酮类物质提取检测方法, 使其能应用于黄秋葵相关产品的品质检测。选定黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁这五种黄酮类物质, 确定液相色谱、质谱条件和检测线性范围等, 从而确定黄秋葵荚果黄酮类物质的提取检测方法。色谱条件: 色谱柱为华谱 unitary C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为含 0.1% 甲酸的水; 洗脱梯度: 80% B ~ 60% B (0 ~ 4 min), 60% B (4 ~ 10 min), 60% B ~ 55% B (10 ~ 12 min), 5% B (12.1 ~ 18 min), 5% B ~ 80% B (18 ~ 20 min), 80% B (20.1 ~ 25 min)。质谱条件: 毛细管电压为 4 000 V, 气体温度为 330 °C, 气体流速为 12 L · min⁻¹, 喷雾器压力为 275.8 kPa。优化得到黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁这五个标样的裂解能量为 34、22、30、18、34 eV; 五个标样在 11 min 内完全分离, 线性范围为 0.5 ~ 400 μg · L⁻¹, 线性相关系数均大于 0.99。黄秋葵荚果采用超声波法提取黄酮 (75% 的乙醇, 1 : 10 的料液比, 超声 75 min), 通过实验得到整个提取检测过程中黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁的回收率分别为 (93.65 ± 3.66)%、(98.79 ± 2.04)%、(100.66 ± 1.83)%、(87.23 ± 6.61)%、(101.91 ± 0.61)%, 并对黄秋葵荚果中这 5 种黄酮物质的含量进行了测定。该方法重复性好、灵敏度高、专一性强, 为黄秋葵黄酮类物质的研究提供了实验基础。

关键词: 超高效液相色谱—三重四级杆质谱联用, 黄秋葵荚果, 黄酮类物质

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)12-1592-06

Content determination of flavonoids from the fruit seed of *Abelmoschus esculentus* by UPLC-QqQ-MS

XIE Jin, HUANG Yan-Ning, XU Rui, CAO Liang, FAN Hai-Shan, ZHU Xiao-Qi*

(Institute of Agro-Environment and Ecology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: The ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS) was applied to establish the rapid detection method for *Abelmoschus esculentus* flavonoids. This method can apply to qualify the products of *A. esculentus*. Rutin, baicalin, quercetin, baicalein, naringenin were selected as the standard compounds. The chromatographic separation was done on a ACCHROM UNITARY C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) in

收稿日期: 2017-07-31 修回日期: 2017-08-24

基金项目: 湖南省自然科学基金 (14JJ6071); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303117); 湖南省农业科学院科技创新项目 (2016QN01) [Supported by Hunan Provincial Natural Science Foundation (14JJ6071); Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303117); Science and Technology Innovation Program of Hunan Academy of Agricultural Sciences (2016QN01)].

作者简介: 谢进 (1984-), 女 (满族), 湖南株洲人, 博士, 助理研究员, 从事药用植物生物化学研究, (E-mail) jin8410051108@163.com。

*通信作者: 朱校奇, 博士, 研究员, 研究方向为植物学, (E-mail) zhuxiaoqi222@163.com。

gradient elution with a mobile phase of acetonitrile (A) and formic acid aqueous solution (B) (0.1%, W/W) as follows: 80%B–60%B(0–4 min), 60%B(4–10 min), 60%B–55%B(10–12 min), 5%B(12.1–18 min), 5%B–80%B(18–20 min), 80%B(20.1–25 min). The mass spectrometry condition: The capillary voltage was 4 000 V. The gas temperature was 330 °C. The gas velocity was 12 L · min⁻¹. The spray pressure was 275.8 kPa. The MS parameters were set up as: collision energy, 34 eV for baicalein, 22 eV for naringenin, 30 eV for quercetin, 18 eV for baicalin and 34 eV for rutin. The results showed good linearity for five flavonoids with R^2 values ranging from 0.998 4–0.999 8. Extraction of *A. esculentus* was prepared by Ultrasonic method with 75% ethanol, 1 : 10 ratio of material to liquid, ultrasonic 75 min. The recoveries rang from 87.23% to 101.91% (RSD varied from 0.61% to 6.61%). The content of these flavonoids in fruit seed of *A. esculentus* were detected. The method is rapid and has high sensitivity, high accuracy and good specificity. It provides the basic experimental method for the flavonoids of *A. esculentus*.

Key words: UPLC-QqQ-MS, fruit seed of *Abelmoschus esculentus*, flavonoids

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 学名咖啡黄葵, 又称羊角豆、补肾果, 在我国北方还称为洋辣椒, 属于锦葵科秋葵属, 为一年生草本植物, 原产非洲, 我国从印度引进, 已有 70 多年的栽培历史。黄秋葵果荚的一个生长周期在 20 d 左右, 可食用的黄秋葵果荚是 5~7 d(许如意等, 2011)。随着时间的推移, 黄秋葵果荚木质化严重, 口感不佳, 不可食用; 黄秋葵食用嫩果中可以提取果胶(黄剑波等, 2007)。果胶作为一种食品添加剂, 主要用于果酱、果冻、食品包装膜等方面, 而黄秋葵种子能提炼黄秋葵籽油(徐丽等, 2014), 还能提取咖啡碱(郑鸿雁等, 2016)。通过长期多方面的试验研究证明, 黄秋葵具有很高的营养价值, 而且对很多疾病具有预防、治疗的效果, 属于药食同源的新型保健植物(李欣和王玉英, 2012)。可见, 黄秋葵有很高的商业价值。

在黄秋葵的成分测定与分析中测得了黄秋葵荚果中总黄酮含量为 2.56%, 蛋白质、多糖、总糖和黄酮的含量随着果实的老化而变少, 而脂肪的含量随着果实的成熟而增加的(黄阿根等, 2007)。黄酮类物质具有多种生理活性功能, 在生物体内清除自由基, 抗氧化作用显著, 还具有抗癌、抗菌、降血糖等药理作用。前人对黄秋葵的黄酮提取工艺及理化性质进行了一系列的研究(李南奇等, 2013; 刘爱敬等, 2015; 王博等, 2015; 高愿军等, 2016), 并对黄秋葵黄酮提取物的抗疲劳及抗氧化活性进行了研究(李加兴等, 2014; 徐天姿等, 2014)。然而, 鲜有对黄秋葵的各黄酮类

物质的分离, 并测定含量的文献。通过对文献的综合研究, 本研究以黄秋葵食用嫩荚果为实验样品进行研究, 为黄秋葵的黄酮类物质的提取分离鉴定提供了研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 荚果于 2013 年 12 月在湖南省农科院高桥基采集。

1260 infinity 高效液相色谱-6460 三重四级杆质谱联用, 购于美国安捷伦公司; BX5200H 超声波清洗仪, 购于上海新苗医疗器械制造有限公司; WB-2002 水浴锅, 购于郑州长城科工贸有限公司。

芦丁标准品(98%)、黄芩素标准品(99%)、黄芩苷标准品(99%)、柚皮素标准品(99%)、槲皮素标准品(99%), 购于天津一方科技有限公司; 无水乙醇(分析纯), 购于中国化工; 乙腈(色谱纯), 购于德国默克公司。

1.2 黄酮提取、液质联用检测方法建立及方法评估

1.2.1 检测条件优化 称取黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁这 5 种标样各 1 mg, 配制成 1 mg · mL⁻¹ 的标样原液, 逐级稀释成 6 个浓度梯度, 并配制成 6 组梯度混合标样, 备用。6 组梯度混合标样, 不断优化液相条件(洗脱梯度, 流动相中酸的浓度优化)及质谱条件(毛细管电泳优化, 裂解能量优化), 得到最佳分离检测条件。

1.2.2 提取条件优化 超声波辅助提取过程中主

要影响因素有提取溶剂浓度、料液比和处理时间等。为了考察各因素对提取效果的影响,进行单因素试验,以提取溶剂浓度(50%,75%,100%)、料液比(1:7.5,1:10,1:12.5,1:15)和处理时间(45、60、75、90 min)作为考察因素,以黄秋葵果荚样品中测得的芦丁含量为标准(芦丁是中国药典中用于检测总黄酮的标准物质)。

1.2.3 方法评估 将优化的超声提取条件和优化的检测条件合并后得到最优的黄秋葵提取检测方法,并将三组不同浓度的混合标样从提取到检测,得到整个提取检测方法的绝对回收率。

1.3 黄秋葵荚果中五种黄酮类物质含量测定

黄秋葵荚果经过烘干,磨粉,过筛后得到含水量为(16.11±0.38)%的干粉。取2 g干粉,按照最优的黄酮提取方法提取得到的提取液过0.45 μm微孔滤膜,按照最佳的液质联用检测条件进样,得到各个黄酮类物质的含量。

2 结果与分析

2.1 黄酮提取、液质联用检测方法与方法评估

通过对五种混合标样的检测,得到最佳分离

检测条件,即色谱条件:华谱 unitary C18(2.1 mm × 150 mm,5 μm)色谱柱;流动相:A为乙腈,B为含0.1%甲酸的水;洗脱梯度:80%B~60%B(0~4 min),60%B(4~10 min),60%B~55%B(10~12 min),5%B(12.1~18 min),5%B~80%B(18~20 min),80%B(20.1~25 min);柱温40℃,进样量10 μL。质谱条件:毛细管电压为4 000 V,气体温度为330℃,气体流速为12 L·min⁻¹,喷雾器压力为275.8 kPa;优化得到黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁这五个标样的裂解能量为34、22、30、18、34 eV;特征碎片分别为122.9、153、228.9、271、300。黄芩苷、槲皮素、柚皮素和黄芩苷采用阳离子模式,芦丁采用阴离子模式进行检测,将其汇总,得到图1和表1。从表1可以看到,黄芩苷、槲皮素、柚皮素和黄芩素采用阳离子模式,芦丁采用阴离子模式,同时也找到了每个标准品的最佳裂解能量和特征碎片,按照优化得到的参数设定质谱仪。

从图1可见,五个样品峰完全分开,五个标样峰在11 min之前出峰,而余下的时间用来清洗色谱柱,在高效分离样品的同时,对仪器进行了清洗,节约了实验时间。

表1 五种标样的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of five standards

名称 Name	结构式 Molecular formula	极性 Polarity	质量数 Mass number	母离子 Precursor ion	特征碎片 Product ion	裂解能量 Collision energy
芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	阴离子 -	610.15	609.1	300	34
黄芩苷 Baicalin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	阳离子 +	446.08	447.1	271	18
槲皮素 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	阳离子 +	302.04	303.1	228.9	30
柚皮素 Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阳离子 +	272.07	273.1	153	22
黄芩素 Baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	阳离子 +	270.05	271.1	122.9	34

2.2 提取条件优化

2.2.1 提取溶剂浓度 实验采用的有机溶剂为乙醇,在固定提取时间为60 min,料液比为0.08 g·mL⁻¹的条件下,不同提取溶剂浓度对黄秋葵荚果中

芦丁含量的影响,如图2。由图2可见,随着提取溶剂浓度的上升,提取得到的芦丁的含量也不断升高,而当提取溶剂浓度较高>75%时,却出现了芦丁含量降低的情况,说明提取溶剂中有有机溶剂和

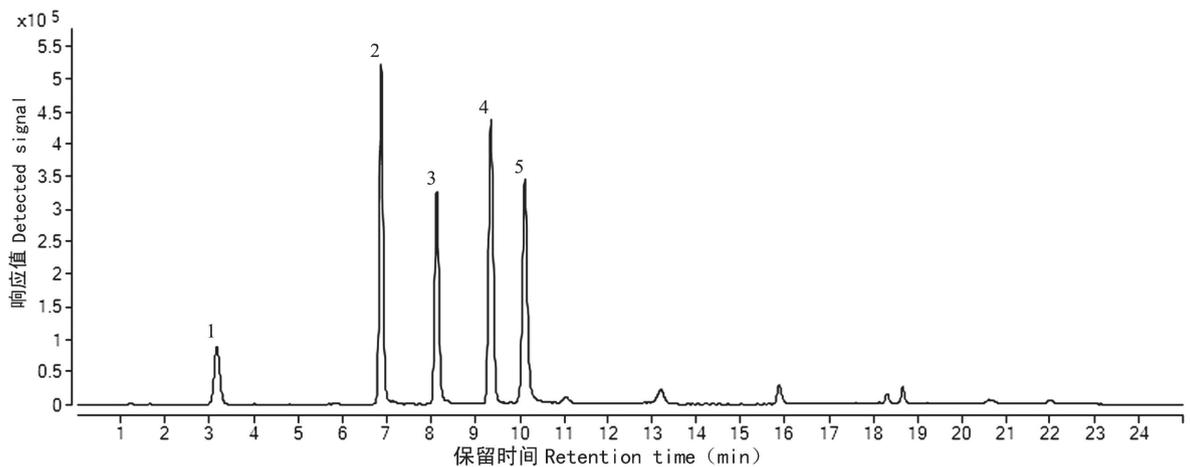


图 1 梯度洗脱标样色谱图 1. 芦丁; 2. 黄芩苷; 3. 槲皮素; 4. 柚皮素; 5. 黄芩素。

Fig. 1 Chromatogram of five standards 1. Rutin; 2. Baicalin; 3. Quercetin; 4. Naringenin; 5. Baicalein.

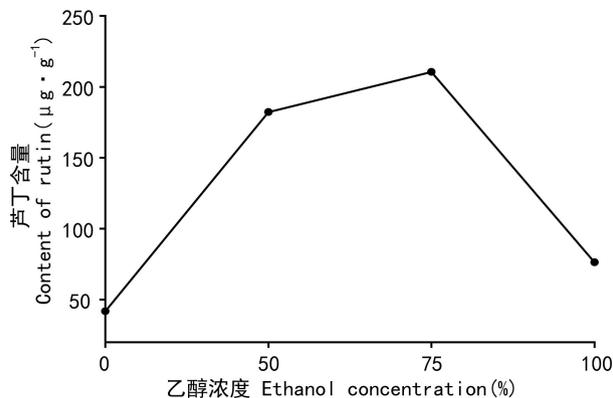


图 2 黄秋葵茱果中芦丁含量与提取溶剂浓度的关系
Fig. 2 Relationship between rutin content and solvent concentration

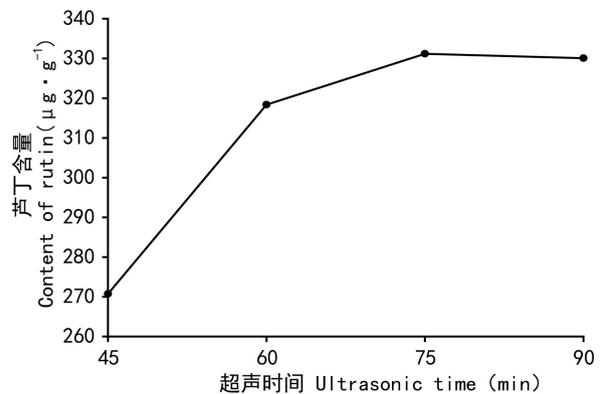


图 4 黄秋葵茱果中芦丁含量与提取时间的关系
Fig. 4 Relationship between rutin content and extraction time

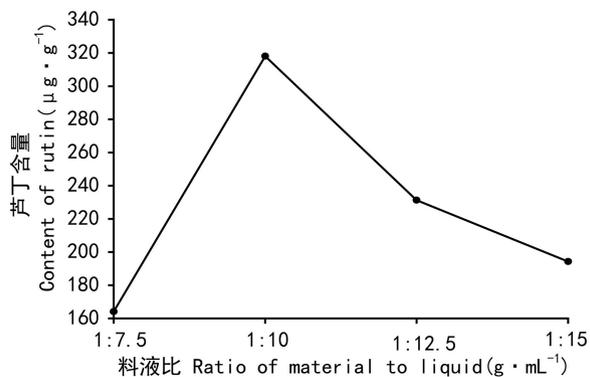


图 3 黄秋葵茱果中芦丁含量与料液比的关系
Fig. 3 Relationship between rutin content and ratio of material to liquid

水的配比十分重要。

2.2.2 料液比 在固定提取时间为 60 min, 提取溶剂浓度为 75% 的乙醇的条件下, 不同料液比对黄秋葵茱果中芦丁含量的影响, 如图 3。由图 3 可见, 随着料液比的上升, 提取得到的芦丁的含量也不断升高, 而当料液比 $< 1:10$ 时, 芦丁含量降低, 这是由于在一定量的黄秋葵茱果中, 溶剂用量的增加可以使黄秋葵茱果与溶剂的接触面积增大, 有利于提取, 当料液比继续增大, 固液浓度差升高, 使得提取能力降低。

2.2.3 提取时间 在固定料液比为 1:10, 提取溶

表 2 5 种标样的方法评估

Table 2 Evaluation of method for the five flavonoids

名称 Name	保留时间 Retention time (min)	保留时间相对 标准偏差 RSD of retention time (%)	峰面积相对 标准偏差 RSD of peak area (%)	回收率 Recovery (%)	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	最低检测限 LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
芦丁 Rutin	2.92	0.20	1.98	101.91 \pm 0.61	0.999 7	25~1 110	8
黄芩苷 Baicalin	6.79	0.06	2.95	87.23 \pm 6.61	0.999 8	1~1 700	0.1
槲皮素 Quercetin	8.05	0.20	6.46	100.66 \pm 1.83	0.998 4	10~1 260	0.1
柚皮素 Naringenin	9.27	0.05	0.80	98.79 \pm 2.04	0.999 7	5~1 100	0.1
黄芩素 Baicalein	10.04	0.30	2.05	93.65 \pm 3.66	0.998 5	20~1 000	8

剂浓度为 75% 的乙醇的条件下,不同超声波提取时间对黄秋葵荚果中芦丁含量的影响,如图 4。由图 4 可以看出,随着超声提取时间的延长,芦丁的检出量不断升高,当提取时间在 45~75 min 之间时,芦丁的检出量不断提高,当处理时间超过 75 min 时,芦丁的检出量逐渐平缓,说明随着处理时间的延长,提取物与提取溶剂之间达到了动态平衡。因此实验采用 75% 乙醇为提取溶剂,1:10 的料液比,超声提取 75 min,对黄秋葵荚果进行黄酮提取。取 2 g 黄秋葵荚果干粉,加入 20 mL 浓度为 75% 的乙醇溶液,称定质量,超声处理 75 min,放冷,再称重,用 75% 的乙醇补足缺失的质量,将溶液过滤,再将滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

通过液质联用对 6 个梯度浓度的混合标样进行进样检测,得到均 ≥ 0.99 的良好相关系数,线性范围以及最低检测限,同时通过保留时间和峰面积的标准偏差可以表明该检测方法具有良好的稳定性、可重复性和精密度,通过质谱的定性筛选,能排除可能出现的干扰离子,是检测结果更加可靠;同时,将三组不同浓度的混合标样从提取到检测,得到了整个提取检测方法的绝对回收率,结果见表 2。

从表 2 可见,黄芩素回收率较低。主要是由于黄芩素对光不稳定(姚亚红等, 2006)。尽管采用了避光提取分析,但对黄芩素的回收率仍然造成

了影响;黄芩苷回收率较低可能是由于溶剂的酸碱性造成的(于波涛等, 2002)。因此,在以后的实验中应对黄酮标准品的稳定性进行评估,以提高其回收率。

2.3 黄秋葵荚果中五种黄酮类物质含量测定

将采集的新鲜样品称重,烘干后再称重,测得含水量,便于计算鲜样中黄酮物质的含量。称取干粉 2 g,进行超声波提取(75% 的乙醇,1:10 的料液比,超声 75 min),样品过滤,进样检测,检测结果为黄芩素(8.46 \pm 0.08) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、黄芩苷(11.59 \pm 1.51) e^{-3} $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、芦丁(53.32 \pm 0.05) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、槲皮素(231.17 \pm 0.18) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、柚皮素(0.74 \pm 4.57) e^{-5} $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论与结论

本实验将芦丁、黄芩苷、槲皮素、柚皮素和黄芩素作为黄酮检测的初步研究,这五种黄酮类物质具有一定的代表性,并首次建立了超高效液相色谱—质谱联用方法测定黄秋葵荚果中的芦丁、黄芩素、黄芩苷、槲皮素及柚皮素这五种黄酮类物质的含量,可用于黄秋葵黄酮类物质的定量分析。与此同时,采用超高效液相色谱—质谱联用的优势就在于线性检测范围最低达到了 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,而文献中线性检测范围最低为 700 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (廖海兵

等,2012;孙敏等,2015),有效地提高了黄酮的线性检测范围,这就使得待测黄秋葵品种中一些黄酮类物质也能通过该方法得以检测。

同时,本研究对黄秋葵蔬果中黄酮的超声波提取方法进行优化,优化因素包括提取溶液浓度,提取时间及料液比,通过优化的提取方法,加以优化后的液质联用检测方法,使得更多的黄酮类物质得以检出。在后来的实验中,可以在检测方法中不断添加黄酮类物质标准品,使得黄秋葵样品中黄酮类物质能够得到更全面的检测,为黄秋葵的相关产品提供测定黄酮的实验方法,为鉴定其品质提供数据支撑。

参考文献:

GAO YJ, WANG JJ, ZHOU JQ, et al, 2016. Discussion of extraction technology of flavonoids from okra [J]. Food Sci Technol, 41(3): 213-217. [高愿军,王晶晶,周婧琦,等.2016.秋葵中总黄酮提取工艺探讨[J].食品科技,41(3):213-217.]

HUANG JB, SUN ZH, ZHANG YH, et al, 2007. Study on extraction of pectin from Okra [J]. Mod Food Sci Technol, 23(2):51-53. [黄剑波,孙哲浩,张英慧,等.2007.黄秋葵果胶提取工艺的初步研究[J].现代食品科技,23(2):51-53.]

HUANG AG, CHEN XH, GAO YZ, et al, 2007. Determination and analysis of ingredient in Okra [J]. J Food Sci, 28(10): 451-455. [黄阿根,陈学好,高云中,等.2007.黄秋葵的成分测定与分析[J].食品科学,28(10):451-455.]

LIAO HB, SHI XJ, LIU T, et al, 2012. RP-HPLC simultaneous determination of three glycosyl flavones in *Abelmoschus esculentus* L. [J]. Chin J Pharm Anal, 32(12): 2194-2197. [廖海兵,施湘君,刘婷,等.2012.RP-HPLC法同时测定黄秋葵中3个黄酮苷的含量[J].药物分析杂志,32(12):2194-2197.]

LI JX, CHEN X, DENG JQ, et al, 2014. Extraction and antioxidant activity *in vitro* of Okra flavonoids [J]. J Food Sci, 35(10): 121-125. [李加兴,陈选,邓佳琴,等.2014.黄秋葵黄酮的提取工艺和体外抗氧化活性研究[J].食品科学,35(10):121-125.]

LI NQ, SUN W, XIAO F, et al, 2013. On extraction techniques of total flavonoids from *Abelmoschus esculentus* by orthogonal test [J]. J Guangzhou Univ Trad Chin Med, 16(2):74-76. [李南奇,孙炜,肖锋,等.2013.正交试验优选黄秋葵总黄酮提取工艺的研究[J].广西中医药大学学报,16(2):74-76.]

LI X, WANG YY, 2012. Introduce a new type of vegetable which is homology of medicine and food—Okra [J]. Sci Breed, (10):50-51. [李欣,王玉英,2012.介绍一种药食同源的新型蔬菜——黄秋葵[J].科学种养,(10):50-51.]

LIU AJ, LIAO ZZ, GUO L, et al, 2015. Purification technology of flavone from *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench with macroporous resins and research of the antioxidant ability *in vitro* [J]. Sci Technol Food Ind, 36(16): 284-288. [刘爱敬,廖争争,郭琳,等.2015.大孔树脂纯化黄秋葵黄酮及其体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,36(16):284-288.]

SUN M, LIU JM, ZHANG LP, et al, 2015. Determination of four kinds of flavonoids in lotus leaves [J]. Guizhou Agric Sci, 45(5):72-74. [孙敏,刘嘉铭,张丽萍等.2015.荷叶中4种黄酮类物质含量的测定[J].贵州农业科学,45(5):72-74.]

WANG B, HUANG YP, QU JR, 2015. Study on the extraction of flavonoids of Okra [J]. J Qilu Univ Technol, 29(3): 61-64. [王博,黄翊鹏,曲静然,2015.黄秋葵中黄酮的提取工艺研究[J].齐鲁工业大学学报(自然科学版),29(3):61-64.]

XU RY, LUO F, YUAN TQ, et al, 2011. Effect of picking time on the fruit characters of Okra [J]. J Changjiang Veget, 1(2): 18-20. [许如意,罗丰,袁廷庆,等.2011.不同采摘期对黄秋葵果实性状和品质的影响[J].长江蔬菜,1(2):18-20.]

XU L, LIU DF, ZHANG RL, et al, 2014. Review of the characteristics of nutrition and seeds of *Abelmoschus esculentus* [J]. Chin Agric Sci Bull, 30(22):97-101. [徐丽,刘迪发,张如莲,等.2014.黄秋葵种子研究进展[J].中国农学通报,30(22):97-101.]

XU TZ, SAN XF, SUN W, et al, 2014. Study on anti-fatigue effect of flavones from Okra in mice [J]. Chin Arch Trad Chin Med, 32(1):880-882. [徐天姿,单雪峰,孙炜,等.2014.黄秋葵黄酮抗小鼠运动性疲劳的作用及其机理研究[J].中华中医药学刊,32(1):880-882.]

YAO YH, ZHANG LW, 2006. Study on stability of Baicalein [J]. Chin J Spectrosc Lab, 23(2): 346-348. [姚亚红,张立伟,2006.黄芩素稳定性研究[J].光谱实验室,23(2):346-348.]

YU BT, ZHANG ZR, LIU WS, et al, 2002. Study on stability of Baicalin [J]. Chin Trad Herb Drugs, 33(3): 218-220. [于波涛,张志荣,刘文胜,等.2002.黄芩苷稳定性研究[J].中草药,33(3):218-220.]

ZHENG HY, GAO Y, WANG HB, 2016. Optimization of extraction process of caffeine from Okra seed and evaluation of antioxidative activity [J]. Food Sci Technol, 41(6):230-236. [郑鸿雁,高阳,王慧彬,2016.黄秋葵种子咖啡碱提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品科技,41(6):230-236.]