

不同产地黄秋葵中5种黄酮成分HPLC分析

唐云¹, 李国鹏¹, 殷启霖^{1,3}, 易伟², 曾皓², 李伟^{1*}

1. 宜春学院 江西省天然活性成分重点实验室, 江西 宜春 336000

2. 宜春市公安局刑事科学技术研究所, 江西 宜春 336000

3. 山东步长制药股份有限公司, 山东 菏泽 274000

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定 12 个不同产地黄秋葵中槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮的含量, 为其合理开发利用提供参考。方法 采用 COSMOSIL 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.4 μm); 以乙腈和 0.2% 的磷酸水溶液为流动性进行梯度洗脱, 检测波长为 353 nm, 体积流量 1 mL/min。结果 槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮分别在 15.72~251.50 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、15.47~247.50 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、14.41~230.50 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、21.88~350.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、17.25~276.00 μg/mL ($r=0.999\ 1$) 浓度范围内呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 97.46%、96.74%、100.21%、95.66%、98.35%, RSD 为 1.97%、1.37%、1.86%、2.72%、2.23%。结论 方法简单易行、准确度高, 适合于同时测定槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮的含量, 可作为黄秋葵质量评价的方法之一。

关键词: 黄秋葵; 黄酮; HPLC; 槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷; 槲皮素-3-*O*-芸香糖苷; 异槲皮苷; 槲皮素; 5,7,4'-三羟基黄酮
中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)14-3797-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.026

Content determination of five flavonoids in *Abelmoschus esculentus* from different habitats by HPLC

TANG Yun¹, LI Guo-peng¹, YIN Qi-lin^{1,3}, YI Wei², ZENG Hao², LI Wei¹

1. Jiangxi Key Laboratory of Natural Active Pharmaceutical Ingredients, Yichun University, Yichun 336000, China

2. Institute of Forensic Science, Public Security Bureau of Yichun, Yichun 336000, China

3. Shandong Buchang Pharmaceuticals Co., Ltd., Heze 274000, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of quercetin-3-*O*-gentiobioside, quercetin-3-*O*-rutinoside, isoquercitrin, quercetin, and 5,7,4'-trihydroxyflavone in *Abelmoschus esculentus* from 12 different regions of China. **Methods** COSMOSIL column (250 mm × 4.6 mm, 5.4 μm) was used. The gradient elution was carried out with acetonitrile and 0.2% phosphoric acid aqueous solution. The detection wavelength was 353 nm and the flow rate was 1 mL/min. **Results** The contents of quercetin-3-*O*-gentiobioside, quercetin-3-*O*-rutinoside, isoquercitrin, quercetin and 5,7,4'-trihydroxyflavone had good linear relationship in the ranges of 15.72—251.50 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 15.47—247.50 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 14.41—230.50 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 21.88—350.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$), and 17.25—276.00 μg/mL ($r=0.999\ 1$). The average sample recovery rate was 97.46%, 96.74%, 100.21%, 95.66%, 98.35%, and RSD was 1.97%, 1.37%, 1.86%, 2.72%, 2.23%, respectively. **Conclusion** This method is simple and accurate. It is suitable for simultaneous determination of quercetin-3-*O*-gentiobioside, quercetin-3-*O*-rutinoside, isoquercitrin, quercetin and 5,7,4'-trihydroxyflavone. The content of the five flavones can be used as one of the methods for evaluating the quality of *A. esculentus*.

Key words: *Abelmoschus esculentus* (Linn.) Moench; flavonoids; HPLC; quercetin-3-*O*-gentiobioside; quercetin-3-*O*-rutinoside; isoquercitrin; quercetin; 5,7,4'-trihydroxyflavone

黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (Linn.) Moench 性寒的特性, 黄秋葵富含蛋白质、多不饱和脂肪酸、黄酮和果胶多糖, 营养价值高, 是一种药食同是锦葵科秋葵属药食同源类植物。黄秋葵具有味淡、

收稿日期: 2019-11-03

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ151024); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ161040)

作者简介: 唐云 (1984—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0795)3201985 E-mail: tangyun-2008-happy@163.com

*通信作者 李伟 (1985—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0795)3201985 E-mail: nobel2025@163.com

源的保健品^[1]，被很多国家和地区作为运动员指定使用的保健食品^[2]。在医药典籍《唐本草》中记载：“主治肾虚阳痿、尿频、腰膝无力、筋骨酸痛。”具有保护肝脏、强肾补肾、清咽利喉、调经下乳、降血糖、调血脂、抗癌、抗疲劳、抗氧化、抗溃疡、增强机体免疫力^[3]等功效。黄秋葵的种植已经十分久远，最早在印度种植，后引入我国内陆^[4-5]，主要分布在温带和热带地区^[6]。如今，在我国云南、山东、河北、河南、江苏、福建、重庆、江西、湖南、湖北、海南、浙江等地区均有种植。

黄秋葵中含有多种化学活性成分，黄酮类化合物是黄秋葵中一类主要的化学成分，药理研究表明黄秋葵中的黄酮类化合物具有良好的生物活性。袁珂等^[12]从黄秋葵果实的抗疲劳有效部位中分离鉴定了槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素等 16 个单体化合物，其中槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷含量相对较高，且活性较强。黄秋葵的乙醇提取物以及黄秋葵中分离出的异槲皮苷和槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷在小鼠体内有明显降低血糖的作用^[7]。研究表明，槲皮素具有抗氧化、抗癌、抗突变等作用，异槲皮苷具有抗炎、抗氧化、降压等生物活性。为了更全面地分析全国不同产地黄秋葵中黄酮成分的情况，本实验选取了不同产地黄秋葵所共有的 5 种黄酮成分作为评价指标。通过查阅文献方法^[8-9]确定了使用 HPLC 对黄秋葵中分离出的槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮进行含量测定，并且收集了 12 个不同产地的黄秋葵进行比较，为其合理开发利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 样品

药材于 2017 年 6—8 月收集于 12 个地区，编号为 S1~S12。全部样品经宜春学院周秀玲教授鉴定为锦葵科秋葵属植物黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (Linn.) Moench 的果实。详细信息见表 1。

1.2 药品及试剂

对照品槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮均购自成都克洛玛生物科技有限公司，质量分数均大于 98%；乙腈（色谱纯）购于美国 GRACE 公司；蒸馏水购于杭州娃哈哈集团有限公司；磷酸（江苏强盛功能化学股份有限公司）；其他溶剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	纬度 (N)
S1	海南三亚	18.2°~18.6°
S2	福建漳州	23.6°~25.3°
S3	云南昆明	24.4°~26.4°
S4	浙江温州	27.1°~28.6°
S5	江西宜春	27.6°~29.1°
S6	湖南长沙	27.9°~28.7°
S7	重庆	28.2°~32.2°
S8	湖北宜昌	29.9°~31.6°
S9	江苏盐城	32.6°~34.5°
S10	河南南阳	34.6°~34.7°
S11	山东青岛	35.6°~37.2°
S12	河北邢台	36.8°~37.8°

1.3 仪器

1200 型 HPLC (Ailgent) 包括四元梯度泵、真空脱气机、进样器、柱温箱、DAD 检测器、色谱工作站；BT125D 型分析天平 (Sartorius)；AR224CN 型电子天平 (奥豪斯仪器有限公司)；YP2001 型电子天平 (上海良平仪器有限公司)；KQ-300E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)；EYELA N1100 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司)；UPWS-9-10T 型超纯水器 (杭州永洁达净化科技有限公司)；D2F-6050 型真空干燥箱 (上海博讯医疗器械厂)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮对照品适量置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解后，用甲醇定容，摇匀，得到混合对照品溶液：质量浓度分别为槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷 251.50 μg/mL、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷 247.50 μg/mL、异槲皮苷 230.50 μg/mL、槲皮素 350.00 μg/mL、5,7,4'-三羟基黄酮 276.00 μg/mL。

2.2 供试品溶液的制备

将不同产地的黄秋葵干燥、粉碎。每个产地样品各取 1.00 g，分别置于三角瓶中，用 70% 甲醇溶液 30 mL 超声提取 2 次，每次 20 min。把 2 次的黄秋葵提取液进行合并、滤过。滤液减压浓缩至干，用甲醇溶液溶解后，置于 10 mL 量瓶，甲醇定容，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: COSMOSIL C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-0.2%的磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~30 min, 13%~32% A; 30~50 min, 32%~50% A; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 353 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。理论塔板数均大于 8 000。色谱图见图 1。

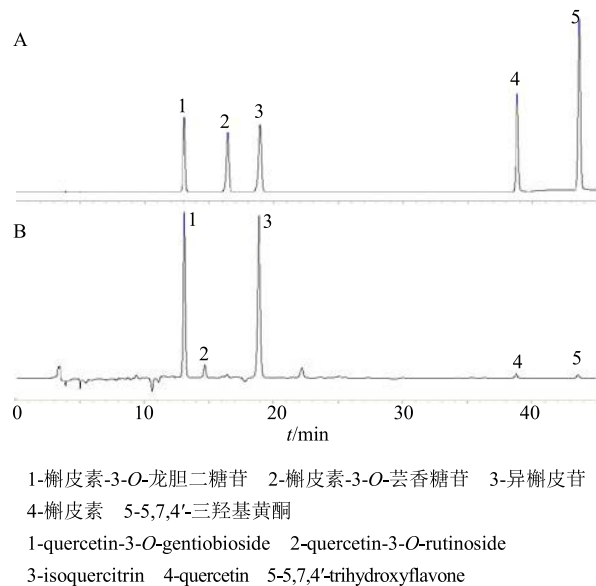


图1 混合对照品 (A) 和黄秋葵样品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC analysis of mixture of reference substance (A) and *A. esculentus* samples (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密吸取混合对照品溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 定容, 逐级稀释, 即得各系列的混合对照品溶液。按照“2.3”项下条件进样分析, 其中槲皮素-3-O-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮以峰面积 (Y) 对对照品质量浓度 (X) 进行线性回归, 得各对照品回归方程、相关系数 (r) 及线性范围, 见表 2。

2.4.2 精密度试验 精密量取混合对照品溶液, 在“2.3”项的色谱条件下, 连续注入高效液相色谱仪 6 次, 分别记录 5 个对照品色谱峰的峰面积。测得槲皮素-3-O-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮 5 个色谱峰的峰面积 RSD 分别为 1.42%、1.39%、1.46%、1.19%、1.37%。说明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 分别取同一产地粉碎的黄秋葵 (S11) 6 份, 每份 1.00 g。按照“2.2”项的方法制备供试品溶液, 再按照“2.3”项的色谱条件进样分析。用外标法计算含量, 计算出槲皮素-3-O-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮 5 种成分的质量分数的 RSD 分别为 1.59%、2.37%、1.65%、1.73%、2.33%。

表2 对照品的线性回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 Linear regression equation, correlation coefficient and linear range of reference

化合物	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
槲皮素-3-O-龙胆二糖苷	$Y=7.396\ 9\ X+45.925$	0.999 5	15.72~503.00
槲皮素-3-O-芸香糖苷	$Y=7.644\ X+45.229$	0.999 6	15.47~495.00
异槲皮苷	$Y=10.338\ X+62.771$	0.999 5	7.21~461.00
槲皮素	$Y=7.915\ 7\ X+26.717$	0.999 7	10.94~350.00
5,7,4'-三羟基黄酮	$Y=17.07\ X+129.32$	0.999 1	4.32~276.00

2.4.4 加样回收率试验 分别取同一产地粉碎的黄秋葵 (S2) 5 份, 每份 0.5g, 再分别精密加入 1.0 mL 各对照品溶液 (槲皮素-3-O-龙胆二糖苷 0.80 mg/mL、槲皮素-3-O-芸香糖苷 15.70 μg/mL、异槲皮苷 1.38 mg/mL、槲皮素 28.10 μg/mL、5,7,4'-三羟基黄酮 1.20 μg/mL), 按“2.2”项制备供试品溶液, 在“2.3”项的色谱条件进样分析, 计算出每份样品中槲皮素-3-O-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、槲皮素、5,7,4'-三羟基黄酮的平均加样回收率分别为 97.46%、96.74%、100.21%、95.66%、

98.35%, RSD 分别为 1.97%、1.37%、1.86%、2.72%、2.23%。

2.5 样品的含量测定

精密称量 12 个产地粉碎的黄秋葵各 1.00 g。按“2.2”项的方法制备供试品溶液, 每个产地的黄秋葵平行制备 3 份, 再按“2.3”的色谱条件进样, 分析。以外标法计算出 5 种黄酮成分的含量。结果见表 3。所测定的 12 个产地的中, 其中 11 个产地 (除福建漳州外) 5 种黄酮的含量依次为槲皮素-3-O-龙胆二糖苷>异槲皮苷>槲皮素>槲皮素-3-O-芸香

表 3 12 个产地黄秋葵中 5 种黄酮的含量
Table 3 Content of five flavonoids in *A. esculentus* from 12 producing areas

编号	质量分数/%				
	槲皮素-3- <i>O</i> -龙胆二糖苷	槲皮素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	异槲皮苷	槲皮素	5,7,4'-三羟基黄酮
S1	0.149 0	2.54×10^{-3}	0.113 0	3.61×10^{-3}	6.79×10^{-4}
S2	0.080 1	1.57×10^{-3}	0.138 0	2.80×10^{-3}	8.86×10^{-4}
S3	0.107 0	1.42×10^{-3}	0.092 0	1.62×10^{-3}	7.06×10^{-4}
S4	0.072 0	1.23×10^{-3}	0.048 0	1.79×10^{-3}	6.76×10^{-4}
S5	0.078 0	8.51×10^{-4}	0.064 0	3.39×10^{-4}	6.66×10^{-4}
S6	0.136 0	1.33×10^{-3}	0.052 0	4.32×10^{-4}	7.47×10^{-4}
S7	0.086 0	1.16×10^{-3}	0.053 0	1.67×10^{-3}	8.02×10^{-4}
S8	0.118 0	1.29×10^{-3}	0.066 0	5.27×10^{-4}	6.33×10^{-4}
S9	0.076 0	1.54×10^{-3}	0.018 0	3.62×10^{-4}	5.80×10^{-3}
S10	0.140 0	1.73×10^{-3}	0.057 0	8.14×10^{-4}	5.75×10^{-4}
S11	0.077 0	9.63×10^{-4}	0.067 0	1.23×10^{-3}	1.16×10^{-3}
S12	0.065 0	6.18×10^{-4}	0.053 0	1.76×10^{-3}	1.12×10^{-3}

糖苷>5,7,4'-三羟基黄酮；福建漳州（S2）的 5 种黄酮含量依次为异槲皮苷>槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷>槲皮素>槲皮素-3-*O*-芸香糖苷>5,7,4'-三羟基黄酮；5 种黄酮含量的纵向对比可以发现，海南三亚产黄秋葵（S1）的 5 种黄酮含量均为最高（福建漳州除外），由此可以推测，所测定 5 种黄酮的含量可能与光照时长、温度等因素有关系。

测定的黄秋葵 5 种黄酮成分中具有显著的体内抗氧化活性的是槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷。12 个产地的黄秋葵都测出了较高含量的槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷，故所有产地的黄秋葵都具有较高的价值。从槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷的含量及 5 种黄酮含量的总量来看，河北、浙江、江苏三地的含量最低，海南的含量最高，受光照、降水、土壤 pH 值的影响，黄秋葵的生长情况可能不同。黄秋葵最早在印度引进，和印度气候条件接近的海南黄秋葵的质量更好，黄酮类成分的含量更高。疫病是黄秋葵生产过程中一种毁灭性病害，主要在雨水多、田间湿度大的情况下容易发生疫病。菌核病也是黄秋葵在生长期问容易产生的病害，多雨的天气下病斑会迅速扩展，全叶变腐烂。全国天气条件差距大，黄秋葵种植，南方的春天气温较高，2 月后即可进行种植，北方地区因为气温偏低，需要等到 5 月的时候才能进行播种。从槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷的含量来看，北方地区河南（安阳）的含量是河北（邢台）的 2.15 倍，南方地区海南（三亚）的含量是浙江（温州）的 2.07

倍。由黄秋葵种植时间和影响黄秋葵生长的条件推测：南北地区影响黄秋葵黄酮含量的因素可能不同，北方地区光照强度是主要影响因素，南方地区降雨是主要影响因素。

3 讨论

在提取方法上比较了超声波提取法和回流提取法，最后选用了超声波提取法，其提取效率高，时间短，所需的温度低，在提取中出现的杂质少，方便快捷。提取溶剂进行比较后，选用了 70% 的甲醇溶液，其提取效率明显高于其他溶剂。在使用 HPLC 法对黄秋葵中黄酮成分进行含量测定时发现，黄秋葵中所含成分较为复杂，且分离出的黄酮类成分极性差别小，流动相的选择对出峰时间和分离效果都有很大影响。流动相选择不佳会使色谱峰出现滞后或分离不开。本实验采用乙腈-0.2% 磷酸水溶液作为流动相，采用梯度洗脱的方法，所测量的 5 种黄酮成分分离完全，峰形也较好。在波长选择过程中发现在 353 nm 处，基线平稳，并且 5 中黄酮在此波长下分离效果明显，干扰少。

在测定黄秋葵 5 种黄酮成分中，槲皮素-3-*O*-龙胆二糖苷、异槲皮苷含量远高于其他 3 种黄酮成分含量，在不同产地的黄秋葵中这 5 种黄酮成分差异性显著。查阅文献发现^[10-11]，影响植物体内次生代谢物含量的因素较多，包括光照、温度等，其中一个主要因素就是光照，因为本实验采集样品产地跨度较大，不同产地样品的生长环境存在着一定差

异,有一定的局限性,进一步研究将探索不同光照强度下主要次生代谢物含量变化情况,为科学合理利用药用植物资源,实施针对性调节次生代谢物含量提供理论依据。

参考文献

- [1] 钟惠宏,郑向红,李振山.秋葵属的种及其资源的收集研究和利用[J].中国蔬菜 1996(2): 49-52.
- [2] 龚衍兰,戴雪花.黄秋葵高质优产栽培技术[J].特种经济动植物,2004, 7(5): 40.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [4] 王金亭.黄秋葵的活性成分及其生理活性研究进展[J].食品研究与开发,2018, 39(19): 208-211.
- [5] 练冬梅,姚运法,洪建基,等.黄秋葵研究进展[J].中国热带农业,2017(6): 74-77.
- [6] Camciuc M, Deplagne M, Vilarem G, *et al.* Okra-*Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) a crop with economic potential for set aside acreage in France [J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 7(2/3): 257-264.
- [7] 李莹,李婧毓,高铭彤,等.黄秋葵提取物对 2 型糖尿病小鼠的降糖作用及与基因 TNF- α 和 IDE 的相关性研究[J].中草药,2017, 48(15): 3131-3137.
- [8] Fan S J, Zhang Y, Sun Q H, *et al.* Extract of okra lowers blood glucose and serum lipids in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice [J]. *J Nutrit Biochem*, 2014, 25(7): 702-709.
- [9] 周浓,杨勤,杨敏,等. HPLC 法同时测定川楝子中芦丁、异槲皮苷和槲皮素的含量[J].药物分析杂志,2013, 33(2): 225-229.
- [10] 房慧勇,朱虹,丁海麦,等.影响愈伤组织中次生代谢产物含量的因素研究进展[J].中国中药杂志,2014, 39(15): 2846-2850.
- [11] 王宇,刘洋,刘佳,等.不同光照强度对黄芪主要次生代谢物含量的影响[J].应用与环境生物学报,2017, 23(5): 928-933.
- [12] 袁珂,刘华亮,廖海兵,等.黄秋葵的化学成分及其药效作用研究[A] // 2013 全国中药与天然药物高峰论坛暨第十三届全国中药和天然药物学术研讨会论文集[C].杭州:中国药学会中药和天然药物专业委员会、浙江省药学会,2013.