

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定大豆中异黄酮素含量

林胜军, 刘国平, 薛荣旋, 卢丽明, 温伊蕾, 黄莹偲
(中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403)

摘要:目的 以染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素的含量为指标, 建立超高效液相色谱-串联质谱测定大豆中异黄酮素总量的方法。方法 样品用乙醇-水(3+1, V/V)提取, 经过 β -葡萄糖苷酶水解后, 用Acquity UPLC[®] BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m)分离, 以甲醇和0.1%甲酸溶液(含5 mmol/L乙酸铵)作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾负离子模式(ESI⁻)电离, 多反应监测模式进行检测。结果 染料木黄酮、大豆苷元在5.0~500 μ g/L范围内线性关系良好($r>0.995$), 方法的检出限分别为2.7、4.0 mg/kg, 在300.0、600.0、1 200 mg/kg添加水平的平均回收率为89.4%~102.2%, 相对标准偏差($n=6$)为1.5%~4.6%; 黄豆黄素在0.5~50.0 μ g/L范围内线性关系良好($r>0.995$), 方法的检出限为0.6 mg/kg, 在30.0、60.0、120.0 mg/kg添加水平的平均回收率为85.7%~104.0%, 相对标准偏差($n=6$)为1.3%~2.8%。结论 该方法简单、灵敏、准确可靠, 适用于大豆中异黄酮素含量的测定。

关键词:染料木黄酮; 大豆苷元; 黄豆黄素; 大豆; 异黄酮素

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)03-0374-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.03.009

Determination of isoflavone in soybean by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIN Shengjun, LIU Guoping, XUE Rongxuan, LU Liming, WEN Yilei, HUANG Yingsi
(Zhongshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhongshan 528403, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of isoflavone in soybean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with the contents of genistein, daidzein and glycitein as the indexes. **Methods** The samples were extracted by ethanol-water (3+1, V/V), separated by Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ column (3.0 mm ×150 mm, 1.7 μ m) and then eluted by methanol and 0.1% formic acid solution (containing 5 mmol/L ammonium acetate) as mobile phase, detected by UPLC-MS/MS under the electrospray ionization (ESI⁻) anion ion mode with multiple reaction monitoring mode. **Results** The linear relationship between genistein and daidzein was good in the range of 5.0-500 μ g/L ($r>0.995$), the detection limits were 2.7 and 4.0 mg/kg, respectively. The average recoveries at the addition levels of 300.0, 600.0, and 1 200 mg/kg were 89.4% to 102.2% and the relative standard deviations ($n=6$) were 1.5% to 4.6%. The linear relationship of glycitein was good in the range of 0.5-50.0 μ g/L ($r>0.995$), the detection limit was 0.6 mg/kg. The average recoveries at the addition levels of 30.0, 60.0, and 120.0 mg/kg were 85.7% to 104.0% and the relative standard deviations ($n=6$) were 1.3% to 2.8%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and accurate, which is suitable for the determination of isoflavone in soybean.

Key words: Genistein; daidzein; glycitein; soybean; isoflavone

大豆中的异黄酮素也称大豆异黄酮, 是大豆生长过程中形成的次生代谢物, 是一类含有多个酚羟基结构的化合物。目前, 人们发现大豆中的异黄酮素主要有12种^[1], 分为3大类: 染料木苷类、大豆苷类和黄豆苷类, 它们分别以游离型、葡萄糖苷型、乙

酰基葡萄糖苷型和丙二酰基葡萄糖苷型4种形式存在^[2]。

异黄酮素的分子结构与植物雌激素很相似, 能够和雌激素一样与受体结合而发挥雌激素作用。近年来, 异黄酮素被证实具有抗肿瘤^[3]、抗氧化和提高机体免疫功能等作用: 能够预防和治疗乳腺癌、结肠癌和皮肤癌^[4], 改善骨质疏松^[5], 减轻女性更年期不适症状^[6], 抗溶血和预防心血管疾病^[7]。然而, 异黄酮素摄入量过高会有雌激素副作用的风险。例如, 研究人员发现中国早期乳腺癌妇女中大豆异

收稿日期: 2021-06-28

基金项目: 中山市医学科研项目(2018J173)

作者简介: 林胜军 男 副主任技师 研究方向为理化检验

E-mail: zscdclsj@163.com

黄酮摄入量较高的患者出现躯体症状的风险增加^[8],而美国在生物监测中也已开展了异黄酮类化合物的测定分析。因此,开展异黄酮素测定方法的研究,对于了解大豆中异黄酮素的含量和分布,对于指导人们健康膳食具有重要的意义。

国内外用于测定异黄酮素的方法主要有高效液相色谱法^[9-13]和液质联用法^[14-17],其中高效液相色谱法具有灵敏度高、准确度高、线性范围宽的特点而得到广泛应用,但是该法的特异性不够好,色谱峰容易受干扰,一般只能测定其中的几种目标物。液质联用法的优点是分析速度快、灵敏度高、特异性好,而且定性和定量可以同时进行。在现有的分析方法中,人们需要测定大豆中各种异黄酮素(至少12种)的含量,才能比较准确地计算出异黄酮素的总量。大豆中的异黄酮糖苷经过 β -葡萄糖苷酶水解会产生相应的游离型苷元——染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素,此时测定提取液中3种异黄酮苷元的含量可以计算出大豆中异黄酮素的总量。本研究旨在利用上述酶解反应的原理和过程,探索超高效液相色谱-串联质谱法测定大豆中异黄酮素含量的样品前处理和仪器条件,建立基于液质联用技术的新方法,为测定大豆中异黄酮素含量的技术提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

Nexera X2 LC-30AD 超高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司);4000QTRAP 串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Milli-Q Element 超纯水机(美国 MILLIPORE 公司);AB265-S 电子天平(感量 0.1 mg, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司);G560E 涡旋混合器(美国 SCIENTIFIC INDUSTRIES 公司);3-30K 低温超高速离心机(德国 SIGMA 公司);BILON22-600B 超声波提取仪(上海比朗仪器有限公司)。

黑曲霉 β -葡萄糖苷酶(CAS#9001-22-3,100 U/g),购自上海源叶生物科技有限公司;染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素标准物质,均购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司(纯度 $\geq 98\%$);二甲基亚砜,纯度 99%;乙醇、甲醇为色谱纯,甲酸、冰醋酸和乙酸铵为优级纯试剂;实验中使用的都是超纯水机制备的一级用水。

1.2 实验方法

1.2.1 主要溶液的配制

异黄酮素标准溶液:称取适量染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素标准品,用二甲基亚砜溶解并且定容至 50 mL,配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,然后用乙醇将其稀释成标准工作液,使染料木黄酮、大豆苷元浓度均为 1 000 ng/mL,黄豆黄素为 100 ng/mL。

β -葡萄糖苷酶溶液:称取 β -葡萄糖苷酶 2 g,用水溶解并且稀释至 10 mL,制得 β -葡萄糖苷酶溶液,含量为 200 mg/mL(临用时配制)。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm);流动相:0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵),甲醇(B);梯度洗脱程序:0~0.5 min, 15% B; 0.5~2.0 min, 15%~35% B; 2.0~4.5 min, 35%~98% B;保持 2.5 min; 7.0~7.5 min, 98%~15% B;保持 2.5 min。柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;样品室温度:15 $^{\circ}\text{C}$;进样量:2 μL 。

1.2.3 质谱条件

电喷雾负离子模式(Electrospray ionization, ESI);离子化电压(IS):-4 500 V;离子源温度:550 $^{\circ}\text{C}$;气帘气压强:68.95 kPa;喷雾气压强:137.9 kPa;辅助加热气压强:137.9 kPa;碰撞器:Medium;去簇电压(DP):-80 V;检测方式:多反应监测(Multiple reaction monitoring mode, MRM);监测离子对和碰撞能量等参数见表 1。

表 1 异黄酮素的质谱参数

Table 1 Mass parameters for isoflavone

物质名称	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV	离子丰度比
染料木黄酮	4.81	268.9	132.9*, 158.9	-39, -38	0.426
大豆苷元	4.64	252.9	222.9, 208.0*	-45, -43	0.825
黄豆黄素	4.65	283.1	267.9*, 239.9	-26, -34	0.331

注:*表示定量离子

1.2.3 样品前处理条件

使用 β -葡萄糖苷酶水解大豆中的异黄酮素,其酶解效率会随着温度、酸度、时间和酶用量的改变而发生变化。本文以染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素的总含量为指标,通过单因素试验考察温度、酸度、时间和酶用量对异黄酮糖苷水解效果的影

响,每个因素设置 5 个水平,每个水平重复 2 次试验,结果取平均值。然后,根据单因素试验的结果,以染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素的总量为指标,对酶解反应的温度、酸度、时间和酶用量 4 个因素设计正交试验 L₉(3⁴),重复测定 2 次,结果取平均值,再对试验结果进行统计分析,优化试验条件。

1.2.4 样品测定

从市场购买 500 g 常温保存的黄豆(含水量 11.2%),用研磨器将其磨成粉状,过 80 目筛,制备成试样。称取 0.1 g 试样(精确至 0.1 mg)于 50 mL 塑料离心管,加入提取溶剂乙醇-水(3+1, V/V) 20 mL,涡旋混匀,超声提取 20 min, 10 000 r/min 离心 10 min(相对离心力为 10 956 \times g),转移上清液至 50 mL 容量瓶。残渣用提取溶剂复溶,重新提取一次,合并上清液,并且用提取溶剂稀释至刻度,摇匀,得到异黄酮素的提取液。

取 5.00 mL 异黄酮素提取液作为底物与 1.25 mL β -葡萄糖苷酶溶液(200 mg/mL)混合于 50 mL 比色管,加入 40 mL 水;然后加入 0.25 mL 冰醋酸调节溶液的酸度,再用水稀释至 50 mL 刻度,摇匀,置于 45 °C 的恒温箱中水解 1.5 h。最后,将得到的水解溶液过 0.22 μ m 滤膜,取 2 μ L 注入到超高效液相色谱-串联质谱仪中进行测定。

1.3 数据处理

将实验获得的数据通过质谱工作软件“MultiQuant 3.0.3”进行分析,得到目标物的测定值,进而分析得到相关的线性范围、检测限、定量限和离子丰度比等信息。然后,把上述实验结果导入到 Microsoft Office Excel 工作表中,进行统计分析,计算各目标物的回收率和相对标准偏差 RSD 并且绘制趋势图。最后,将采集的样品数据信息导入“OriginPro8.5”绘图软件,制作实验结果的 MRM 色谱图。

2 结果

2.1 质谱条件的选择

异黄酮素的组分在质谱上都具有很强的正离子响应,一般情况下会选择[M+H]⁺准分子离子峰作为母离子,采用正离子扫描的方式进行检测。然而,染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素的分子量比较小,而且都含有极性的酚羟基结构,在溶液中容易失去一个氢离子而带上负电荷,所以也可以在电喷雾负离子模式下检测其准分子离子[M-H]⁻。

本文用质谱法分析的异黄酮素属于大豆中的主要抗氧化组分,其含量通常比较高,需要经过多倍稀释或者减少称样量才能进行准确测定。同时,用质谱测定目标物,其正离子模式的响应值要比负离子模式至少高一个数量级,所以用负离子模式测定含量较高的目标物时反而更有优势,可以采用较少的稀释倍数或者增加试样的称样量。将目标物的标准溶液(500 ng/mL)注入到质谱中,采用一级质谱对目标物进行母离子全扫描,得到[M-H]⁻分子

离子峰;然后以[M-H]⁻作为母离子,采用二级质谱对 DP、碰撞能量(CE)等参数进行优化,选择干扰小、响应值高的离子作为定性、定量离子,3 种异黄酮素优化后的质谱参数见表 1。

2.2 色谱条件的选择

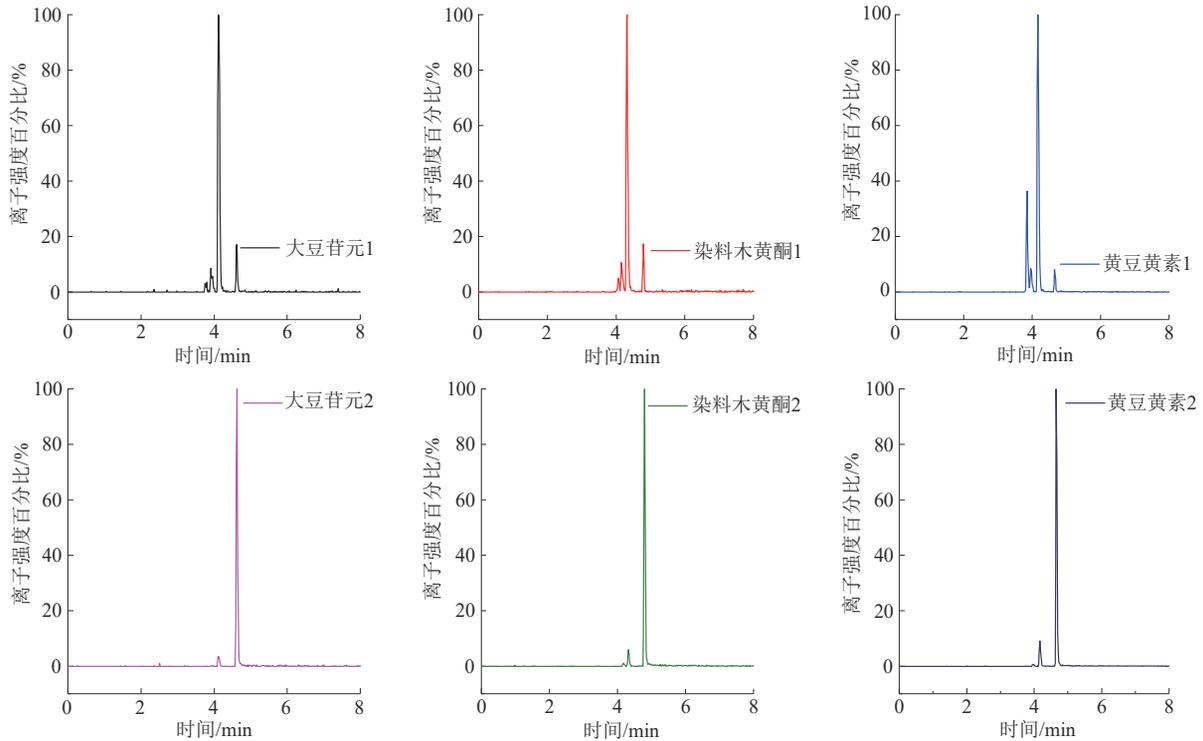
在流动相中添加少量铵盐,可以促使目标物形成[M-H]⁻准分子离子,提高离子的转化率;添加少量甲酸可以改善离子峰形,但是酸浓度过高则会抑制目标物的离子化。葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型和丙二酰基葡萄糖苷型的异黄酮糖苷,在离子化的时候容易发生源内裂解而形成与其苷元相同的准分子离子,所以用质谱分析异黄酮素时应设法降低源内裂解或者将裂解峰与目标峰分离。本研究比较了流动相中含有 0.05%、0.1%、0.2% 甲酸等 3 种情况下,测定同一目标物的色谱分离效果,发现 0.1% 甲酸的色谱峰分离较好,响应值也比较高。用 Acquity UPLC[®] HSS T₃ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m)和 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m)分离目标物,结果两者都能把选择性离子对的目标峰分离;只是在流动相同时添加 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵的情况下,C₁₈ 柱的分离效果更加好。异黄酮素离子色谱峰的分离效果如图 1 所示。

2.3 样品前处理条件的优化

2.3.1 提取条件与酶解条件

异黄酮素易溶于醇溶液,超声提取法可以利用超声波的空化作用、机械效应和热效应提高目标物的提取效率^[18-20]。本文以异黄酮苷元的回收率为指标,通过比较试验最终选择乙醇-水(3+1, V/V)作为提取溶剂、超声提取时间为 20 min。

β -葡萄糖苷酶水解大豆中异黄酮素的条件可以通过单因素试验和正交试验进行优化,以染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素的总量(异黄酮素总量)为指标,单因素试验的因素水平和结果如表 2 所示。从表 2 的结果可以看出:1)当温度为变量时,异黄酮素含量随着温度的增加呈现出先增加后减少的趋势,当反应温度为 40 °C 时,产物的测定值最高,而随着温度升高后产物测定值反而下降,可能是酶的活性受到了抑制。2)冰醋酸用量为变量时,异黄酮素含量随着介质中冰醋酸含量的增加也呈现出先增加后减少的趋势,当冰醋酸加入量为 0.25 mL 时,所得产物的含量最高;当酸加入量过多时,产物含量可能因催化酶的活性受到抑制而减少。3)反应时间为变量时,异黄酮素含量随着反应时间的延长呈现出先增加后减少的趋势,而在酶解反应时间为 2 h 时,反应产物的测定值最高。4)酶用量为变



注:图中的染料木黄酮、大豆苷元和黄豆黄素均出峰在后,前者是由其它结合态异黄酮产生的离子色谱峰;大豆苷元1、染料木黄酮1和黄豆黄素1是大豆提取液未进行酶解反应的色谱峰,大豆苷元2、染料木黄酮2和黄豆黄素2则是经过酶解反应后的结果

图1 异黄酮素的MRM色谱图

Figure 1 MRM chromatogram for isoflavone

表2 大豆异黄酮酶解实验的单因素试验结果

Table 2 Single factor experimental results of enzymatic hydrolysis of soybean isoflavones

试验序号	试验因素和水平				异黄酮素含量/(mg/kg)
	反应时间/h	乙酸用量/mL	反应温度/℃	酶用量/(mg/mL)	
1	1.0	0	40.0	4.0	629.8
2	1.0	0.25	40.0	4.0	1 180.8
3	1.0	0.50	40.0	4.0	1 107.2
4	1.0	1.00	40.0	4.0	773.2
5	1.0	2.00	40.0	4.0	397.2
6	1.0	0.25	20.0	4.0	857.7
7	1.0	0.25	40.0	4.0	1 186.8
8	1.0	0.25	60.0	4.0	1 091.6
9	1.0	0.25	80.0	4.0	777.1
10	1.0	0.25	100.0	4.0	513.9
11	0.5	0.25	40.0	4.0	952.8
12	1.0	0.25	40.0	4.0	1 174.9
13	2.0	0.25	40.0	4.0	1 223.3
14	4.0	0.25	40.0	4.0	1 148.6
15	8.0	0.25	40.0	4.0	1 071.5
16	2.0	0.25	40.0	0	62.9
17	2.0	0.25	40.0	2.0	866.3
18	2.0	0.25	40.0	4.0	1 209.2
19	2.0	0.25	40.0	8.0	1 213.1
20	2.0	0.25	40.0	12.0	1 177.8

量时,产物的测定值随着酶用量的增加呈现出先递增的趋势;当酶用量>4.0 mg/mL时,测定的异黄酮素含量趋于稳定,此时染料木苷和大豆苷基本完全

被酶催化转化。

在同等条件下,大豆异黄酮糖苷的适宜酶解条件分别是:反应时间 2 h、乙酸用量 0.25 mL、反应温度 40 °C 和酶用量 4.0 mg/mL(该条件下酶用量 8.0 mg/mL 的结果 1 213>1 209,但是从酶的利用率考虑,4.0 mg/mL 的酶用量优于 8.0 mg/mL)。

2.3.2 正交试验与结果

根据上述单因素试验的结果,对酶解的温度、冰醋酸用量、时间和酶用量进行 4 因素 3 水平的正交试验,各因素的水平见表 3,正交试验结果见表 4。根据正交试验和极差分析的结果可知:各试验因素对水解效果影响的顺序为 D>A>C>B,其中酶用量 D 的影响最大;由各因素对异黄酮素含量的贡献水平,得出酶解条件的最佳组合为 A₃B₂C₁D₃,即 0.2 mg/mL 的大豆提取液,在温度为 45 °C、加入冰醋酸 0.25 mL 的条件下,用 5.0 mg/mL 的 β-葡萄糖苷酶水解 1.5 h。

表3 大豆异黄酮酶解实验的试验因素和水平

Table 3 Experimental factors and levels of enzymatic hydrolysis of soybean isoflavones

水平	试验因素			
	温度/℃	冰醋酸用量/mL	时间/h	酶用量/(mg/mL)
	A	B	C	D
1	35	0.20	1.5	3.0
2	40	0.25	2.0	4.0
3	45	0.30	2.5	5.0

表4 大豆异黄酮酶解实验的正交试验及结果
Table 4 Orthogonal experiment and results of enzymatic hydrolysis of soybean isoflavones

试验序号	因素				异黄酮含量 /(mg/kg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1 159.2
2	1	2	2	2	1 177.1
3	1	3	3	3	1 198.6
4	2	1	1	3	1 209.3
5	2	2	3	1	1 181.0
6	2	3	2	2	1 194.4
7	3	1	3	2	1 168.0
8	3	2	1	3	1 222.3
9	3	3	2	1	1 174.8
K1	3 534.9	3 536.5	3 590.8	3515	
K2	3 584.7	3 580.4	3 546.3	3 539.5	
K3	3 565.1	3 567.8	3 547.6	3 630.2	
k1	1 178.3	1 178.8	1 196.9	1 171.7	T=10 684.7
k2	1 194.9	1 193.5	1 182.1	1 179.8	
k3	1 188.4	1 189.3	1 182.5	1 210.1	
R	16.6	14.6	14.8	38.4	

本研究通过优化色谱条件,采用反相 C18 色谱柱使裂解峰和目标峰(游离苷元)得到有效分离,同时采用酶解的方法把结合型的异黄酮糖苷转化为游离型苷元,进一步降低了裂解峰对检测结果的影响,

各种异黄酮素离子色谱峰的分离效果如图 1 所示。从图 1 可以看出:大豆提取液经过 A₃B₂C₁D₃ 组合条件的酶解反应后,其结合态的糖苷已经基本转化成游离态的苷元。

2.4 方法适用性检验

2.4.1 方法的线性范围、检出限和定量限

配制染料木黄酮、黄豆苷元和黄豆黄素的混合标准溶液系列进行测定,其中染料木黄酮和黄豆苷元质量浓度系列均为 5.0、10.0、20.0、50.0、100、200、500 μg/L,黄豆黄素的质量浓度系列为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/L。然后,根据离子强度的峰面积对质量浓度进行线性回归计算,以目标峰的 3 倍信噪比(S/N)确定染料木黄酮、黄豆苷元和黄豆黄素的检出限(Limit of detection, LOD),以目标峰的 10 倍信噪比(S/N)确定染料木黄酮、黄豆苷元和黄豆黄素的定量限(Limit of quantitation, LOQ),详细结果见表 5。结果显示:3 种异黄酮素混合标准溶液在上述浓度系列范围内的线性关系良好($r>0.995$),其检出限和定量限均满足大豆中异黄酮素的分析要求。

表5 异黄酮素的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 5 Linear equations, correlation coefficients (r), LODs and LOQs of isoflavones

物质名称	线性方程	相关系数 r	LODs/(mg/kg)	定量限/LOQs/(mg/kg)
染料木黄酮	$y = 318.37x + 692.33$	0.998 7	2.7	9.1
大豆苷元	$y = 242.26x + 831.44$	0.999 3	4.1	13.5
黄豆黄素	$y = 1 370.27x + 131.82$	0.998 9	0.6	2.0

2.4.2 方法的准确度和精密度

将磨成粉状的大豆样品经过 80 目筛制成均匀试样,作为样品加标回收试验的本底。取一定量的试样,加入上述 3 种异黄酮素的混合标准溶液,使染料木黄酮和黄豆苷元的添加水平分别为 300.0、600.0、1 200 mg/kg,而黄豆黄素的添加水平分别为 30.0、60.0、120.0 mg/kg。然后,按照“1.3.4”的方法进行处理和测定,每个添加水平测定 6 次,计算上述 3 种异黄酮素的回收率和相对标准偏差。结果显示:3 种异黄酮素的平均加标回收率范围是 85.7%~104.0%,精密密度为 1.3%~4.6%。本研究的方法回收率在 60%~120% 范围内,相对标准偏差 $RSD<5%$,符合食品检测质量标准的规定。

2.5 方法的应用

用建立的方法对本地生产的 6 份大豆样品进行测定,测得异黄酮素的含量水平为 1 110.6~1 425.3 mg/kg,详细结果见表 7 和图 2。

3 结论

本研究建立了测定大豆中异黄酮素总含量的

表6 异黄酮素的加标回收和精密密度试验结果($n=6$)

Table 6 Recoveries and RSDs of isoflavones ($n=6$)

物质名称	本底值/ (mg/kg)	加标值/ (mg/kg)	测定平均 值/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
染料木 黄酮	642.0	300.0	922.0	93.3	3.4
		600.0	1 236.0	99.0	3.6
		1 200	1 715.0	89.4	2.5
大豆苷元	524.0	300.0	797.0	91.0	4.6
		600.0	1 137.0	102.2	2.9
		1 200	1 698.0	97.8	1.5
黄豆黄素	59.4	30.0	85.1	85.7	2.8
		60.0	121.0	102.7	1.6
		120.0	184.8	104.0	1.3

表7 大豆中异黄酮素的测定结果(mg/kg)

Table 7 Determination of isoflavone in soybean (mg/kg)

编号	苷元测定值			异黄酮素总量
	染料木黄酮	大豆苷元	黄豆黄素	
1	640.5	524.2	57.1	1 221.8
2	572.3	484.7	53.6	1 110.6
3	735.6	624.5	65.2	1 425.3
4	672.5	584.0	59.4	1 315.9
5	622.4	518.9	56.3	1 197.6
6	711.2	607.5	64.2	1 382.9

超高效液相色谱-串联质谱法,在选定的色谱条件下,目标物的色谱峰都能够被有效分离,方法的准

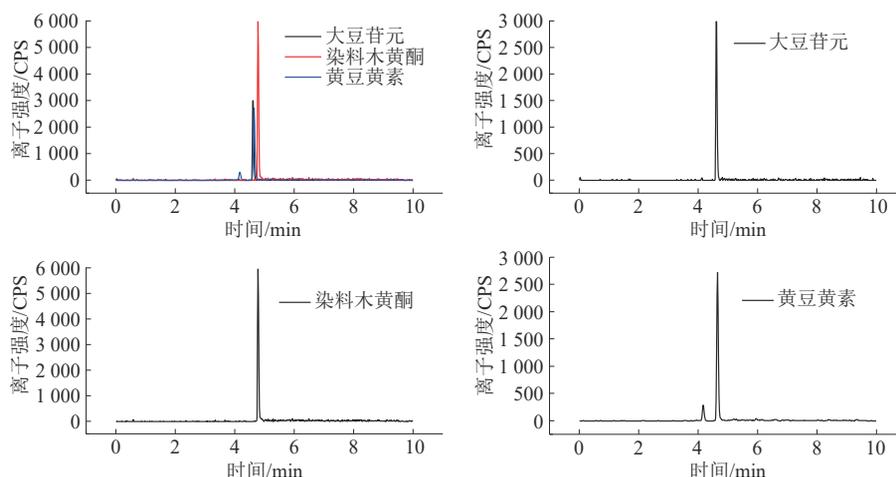


图2 样品中异黄酮素的MRM色谱图

Figure 2 MRM Chromatogram of isoflavone in samples

确度、精密度和检出限等指标均满足分析方法的要求。该法简单、灵敏、结果准确可靠,适用于大豆中异黄酮素总含量的测定。

参考文献

- [1] 于淼, 李佳梅, 孙东立, 等. 大豆异黄酮色谱检测技术研究进展[J]. 现代化农业, 2019(4): 34-35.
YU M, LI J M, SUN D L, et al. Research progress in chromatographic detection of soybean isoflavones [J]. Modernizing Agriculture, 2019(4): 34-35.
- [2] 杨学东, 邓志成, 王晶, 等. 反相高效液相色谱法制备纯化大豆异黄酮糖苷[J]. 色谱, 2006, 24(4): 363-366.
YANG X D, DENG Z C, WANG J, et al. Preparation and purification of soybean isoflavone glycosides by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 2006, 24 (4): 363-366.
- [3] HSIEH P L, LIAO Y W, HSIEH C W, et al. Soy isoflavone genistein impedes cancer stemness and mesenchymal transition in head and neck cancer through activating miR-34a/RTCB axis [J]. Nutrients, 2020, 12 (7): 1924.
- [4] 李硕, 王建. 大豆异黄酮临床应用的研究进展[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 633-640.
LI S, WANG J. Research progress on the clinical application of soybean isoflavones [J]. Soybean Science, 2020, 39 (4) : 633-640.
- [5] ZHANG X S, LIU Y H, XU Q, et al. The effect of soy isoflavone combined with calcium on bone mineral density in perimenopausal Chinese women: A 6-month randomised double-blind placebo-controlled study[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2020, 71 (4): 473-481.
- [6] 刘鹿, 吕春健, 张新胜, 等. 大豆异黄酮干预对围绝经期女性综合征及性激素水平的影响研究[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(11): 60-63.
LIU L, LV C J, ZHANG X S, et al. Study on the effect of soybean isoflavones intervention on the levels of sexual hormones and syndrome in perimenopausal women [J]. China Food and Nutrition, 2020, 26 (11): 60-63.
- [7] 陈嘉序, 陈如扬, 连媛, 等. 大豆异黄酮的生物转化及功能活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(09): 176-182.
CHEN J X, CHEN R Y, LIAN Y, et al. Research progress in the biotransformation and functional activity of soybean isoflavones [J]. Food Research and Development, 2021, 42 (9): 176-182.
- [8] LEI Y Y, HO S C, CHENG A, et al. The association between soy isoflavone intake and menopausal symptoms after breast cancer diagnosis: A prospective longitudinal cohort study on Chinese breast cancer patients[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2020, 181 (1): 167-180.
- [9] 常凤启, 陈桂茹, 韩会新, 等. HPLC法测定食品中染料木黄酮[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(6): 500-504.
CHANG F Q, CHEN G R, HAN H X, et al. Determination of genistein in foods by HPLC [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2003, 15 (6): 500-504.
- [10] 徐世芳, 陈爱瑛, 姜丽霞. 微胶囊大豆异黄酮有效成分的HPLC含量测定[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 473-475.
XU S F, CHEN A Y, JIANG L X. HPLC determination of effective components in soybean isoflavones microcapsule. Food Science, 2007, 28(11): 473-475.
- [11] 马饴然, 张洛莎, 王鹏, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱测定食品中大豆异黄酮含量的方法研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 147-153.
MA X R, ZHANG L S, WANG P, et al. Determination of soy isoflavones in food by solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. China Brewing, 2018, 37(11): 147-153.
- [12] 曹明舰, 余承佑, 武云龙, 等. 高效液相色谱法(HPLC)检测豆浆中大豆异黄酮含量的研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(1): 49-52.
CAO M J, YU C Y, WU Y L, et al. Detection of isoflavones in soybean milk by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2018, 29(1): 49-52.
- [13] 胡莉, 靳可婷, 仲伶俐, 等. 高效液相色谱法同时测定粮食中6种大豆异黄酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8 (11): 4368-4374.

- HU L, JIN K T, ZHONG L L, et al. Determination of 6 kinds of isoflavones in food crops by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(11): 4368-4374.
- [14] 胡珀, 金华. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定保健食品中大豆异黄酮含量[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 193-196.
- HU P, JIN H. Rapid determination of isoflavones content of soybean in health foods by UPLC-tandem mass spectrometry. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 193-196.
- [15] 曾妮, 范小龙, 江丰, 等. UPLC-MS/MS法测定植物蛋白饮料中6种大豆异黄酮[J]. *食品科技*, 2018, 43(8): 303-307.
- ZENG N, FAN X L, JIANG F, et al. Determination of six soybean isoflavones in vegetable protein drinks by UPLC-MS/MS. *Food Science and Technology*, 2018, 43(8): 303-307.
- [16] 龚凌霄, 苏宝根, 魏作君, 等. 高效液相色谱-质谱法快速测定大豆异黄酮含量[J]. *中国油脂*, 2006, 31(2): 50-52.
- GONG L X, SU B G, WEI Z J, et al. Rapid determination of soybean isoflavones by HPLC-MS. *China Oils and Fats*, 2006, 31(2): 50-52.
- [17] 金米聪, 龚文杰, 马建明. 大豆及其制品中12种大豆异黄酮的HPLC及HPLC-MS法测定研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005(8): 900-903.
- JIN M C, GONG W J, MA J M. Determination of 12 soybean isoflavones in soybeans and soy-based foods by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2005(8): 900-903.
- [18] 朱仕房, 王善利, 魏东芝, 等. 大豆异黄酮提取条件的研究[J]. *食品科学*, 2001, 22(3): 54-57.
- ZHU S F, WANG S L, WEI D Z, et al. Study on extraction technology of soybean isoflavones. *Food Science*, 2001, 22(3): 54-57.
- [19] 宋冰, 王丕武, 张秀艳, 等. 大豆异黄酮提取工艺的优化[J]. *大豆科学*, 2008, 27(2): 343-346.
- SONG B, WANG P W, ZHANG X Y, et al. Optimization of the extraction technique of soybean isoflavones. *Soybean Science*, 2008, 27(2): 343-346.
- [20] 田琳, 尉震, 石军, 等. 超声波法在大豆异黄酮提取中的应用[J]. *科技创新导报*, 2009, 6(12): 111.
- TIAN L, YU Z, SHI J, et al. Application of ultrasonic wave method in the extraction of soybean isoflavones[J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2009, 6(12): 111.