

实验技术与方法

基于蛋白沉淀法超高效液相色谱-串联质谱法检测面包中两种蛋白结合型晚期糖基化终末产物

江冠桦¹,余海立²,王培¹,汪强¹,陈梁凯¹,张彦²,刘烈刚¹

(1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系,湖北武汉 430030;

2. 安琪酵母股份有限公司酵母功能湖北省重点实验室,湖北宜昌 443000)

摘要:目的 建立面包中两种典型晚期糖基化终末产物(AGEs)的超高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法以结合型羧甲基赖氨酸(CML)和羧乙基赖氨酸(CEL)为检测对象,面包样品经还原孵育、蛋白沉淀、加同位素内标、酸水解、氮吹、九氟戊酸水溶液复溶后,多反应监测定性及定量分析。结果 方法的检出限 CML 为 4.5 ng/g,CEL 为 0.5 ng/g;定量限 CML 为 20 ng/g,CEL 为 2 ng/g;CML 加标回收率为 89.62%~95.65%,CEL 的加标回收率为 86.38%~97.17%;标准曲线线性范围为 CML 2.5~800 ng/mL 和 CEL 0.25~80 ng/mL,决定系数均大于 0.999。结论 该方法准确且灵敏,能够满足面包中 AGEs 的检测需求。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱;面包;羧甲基赖氨酸;羧乙基赖氨酸

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)04-0517-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.04.005

Determination of two protein-bound advanced glycation end-products in bread by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on protein precipitationJIANG Guanhua¹, YU Haili², WANG Pei¹, WANG Qiang¹, CHEN Liangkai¹,
ZHANG Yan², LIU Liegang¹

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 2. Yeast Function Hubei Provincial Key Laboratory, Angel Yeast Co, Ltd., Hubei Yichang 443000, China)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of two typical advanced glycation end products (AGEs) in bread. **Methods** Protein-bound carboxymethyl lysine (CML) and carboxyethyl lysine (CEL) were used as the detection objects. Bread sample was subjected to reduction incubation, protein precipitation, addition of isotope internal standard, acid hydrolysis, nitrogen blowing, reconstitution with nonafluorovaleric acid aqueous solution, and then underwent multi-reaction monitoring to quantitative analysis. **Results** The detection limit and quantification limit of the method were 4.5 ng/g and 20 ng/g for CML, and 0.5 ng/g and 2 ng/g for CEL. The spike recovery rates of CML and CEL were 89.62%-95.65% and 86.38%-97.17%. The linear range were 2.5-800 ng/mL and 0.25-80 ng/mL, and the coefficients of determination were both above 0.999. **Conclusion** The method was accurate and sensitive, and could meet the detection requirements of AGEs in bread.

Key words: Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; bread; carboxymethyl lysine; carboxyethyl lysine

晚期糖基化终末产物(Advanced glycation end -

products, AGEs)是蛋白质、脂类或核酸的自由氨基与还原糖的羰基发生非酶促反应,形成一系列化合物的总称^[1]。目前研究较多的食源性 AGEs 主要有羧甲基赖氨酸(Carboxymethyl lysine, CML)、羧乙基赖氨酸(Carboxyethyl lysine, CEL)、甲基咪唑酮(Methyl imidazolidone, MG-H1)等^[2-3],这些食源性 AGEs 的暴露与糖尿病、心脑血管疾病等一系列衰

收稿日期:2021-12-22

基金项目:国家自然科学基金(81773423)

作者简介:江冠桦 男 在读研究生 研究方向为营养流行病学/食品卫生学 E-mail:m201975365@hust.edu.cn

通信作者:刘烈刚 男 教授 研究方向为营养流行病学/食品卫生学 E-mail:lgliu@mails.tjmu.edu.cn

老和代谢相关性疾病的发生发展息息相关^[4-6]。

富含碳水化合物、脂肪和蛋白质的热加工食品是食源性 AGEs 的重要来源之一,也是目前该领域的研究热点^[7-9]。面包作为典型的热加工食物,与其他食物种类相比,面包中 AGEs 含量处于相对较高的水平^[10]。随着面包市场的扩大,我国各年龄人群通过进食面包摄入的食源性 AGEs 也在逐年增长。而建立简便且低成本的面包中 AGEs 含量检测方法是生产加工过程中抑制面包 AGEs 生成进而减少相应食源性 AGEs 暴露的重要基础。

目前国内外尚无食品中 AGEs 的限量或检测标准,文献报道的 AGEs 检测方法主要有酶联免疫吸附法、液相色谱-荧光检测法、气相色谱-质谱法及液相色谱-质谱法等^[3,11-13]。酶联免疫吸附法虽然操作快速简便但易受基质干扰,特异性低;荧光检测法只能检测部分具有荧光特性的 AGEs,灵敏度也较低;气相色谱-质谱法需衍生化,前处理复杂;而液相色谱-质谱法在具有较好分离效果的同时前处理也较为简便。

当前研究多使用液相色谱-质谱方法对生物或食物样品的 AGEs 进行定量^[3],并已有研究基于液质方法建立了西方膳食模式下食物 AGEs 的数据库^[2,10]。但这些研究报道的方法多使用昂贵、繁琐且耗时的固相萃取法作为前处理基础,因此,本研究拟建立一套采用相对经济且简便的蛋白沉淀法作为前处理基础的超高效液相色谱-串联质谱(Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)方法,以期实现对面包样品中蛋白结合型 CML、CEL 的定量检测。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、1200SL 超高效液相色谱系统、6460 三重串联四级杆质谱均购自美国 Agilent Technologies, Waters Oasis HLB 固相萃取小柱(1 cc/30 mg, 30 μm, 美国 Waters),电子分析天平, Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore), KZ-III 研磨仪, ALPHA1-4 LD plus 冷冻干燥机(德国 Christ)。

Na₂B₄O₇·10H₂O、NaBH₄、H₃BO₃、CH₂O₂、C₂H₄O₂、C₂HCl₃O₂、CHCl₃、HCl(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司), C₂HO₂F₃(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司), CML、CML-d₂、CEL、CEL-d₄(分析纯,德国 Iris Biotech GmbH), 乙腈、九氟戊酸均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制

混合标准溶液:将 2 种 AGEs 标准溶液用超纯水分别稀释配制成 10 μg/mL 的标准储备液,用超纯水稀释配制成 CML:2.5、5、10、20、50、100、200、400、800 ng/mL, CEL:0.25、0.5、1、2、5、10、20、40、80 ng/mL 的混合标准曲线工作溶液。

混合内标溶液:将 10 μg/mL 的 CML-d₂、CEL-d₄ 内标储备液以超纯水稀释并配制成 CML-d₂:1 μg/mL, CEL-d₄:0.5 μg/mL 的混合内标使用液。

1.2.2 面包样品前处理

取经冻干并粉碎的粉末状面包样品,加入去离子水进一步研磨后配制成 0.05 g/mL 的悬浊液,充分涡旋后取 25 μL 至 7 mL 玻璃管。加入 500 μL 含 0.1 mol/L NaBH₄ 的硼酸盐(Na₂B₄O₇, 0.05 mol/L)缓冲液(pH=9.2),静置 2 h;加入 2 mL -20 °C 预冷无水乙醇沉淀蛋白质,4 000 r/min 低速离心 10 min,弃上清液留沉淀,即只保留蛋白结合型 AGEs;向沉淀中加入 50 μL 混合内标溶液(CML-d₂:1 μg/mL, CEL-d₄:0.5 μg/mL)、500 μL 6 mol/L 盐酸,拧紧瓶盖后 110 °C 酸解 18 h;酸解后 80 °C 氮吹至干,加入 500 μL 超纯水复溶,涡旋后转移至 1.5 mL EP 管,14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 于新 1.5 mL EP 管,80 °C 下氮吹至干;加入 400 μL 5 mmol/L 九氟戊酸水溶液复溶,涡旋后 14 000 r/min 离心 10 min,过 0.22 μm 滤膜后即为待测进样液。

1.2.3 仪器条件

色谱柱温:30 °C;流动相:乙腈(A相)和 5 mmol/L 九氟戊酸水溶液(B相),流速:0.25 mL/min,梯度洗脱流程:0~1 min, 96%B;1~4 min, 96%B→80%B;4~7 min, 80%B→60%B;7~8 min, 60%B→40%B;8~9 min, 40%B→20%B;9~11 min, 20%B;11~11.5 min, 20%B→96%B;11.5~17 min, 96%B。进样量:10 μL;质谱离子源:电喷雾,扫描模式:多反应监测;离子源温度:350 °C,气流 11 L/min,喷雾电压为 4 000 V。定性离子对:CML:205.1→130.0, CEL:219.1→130.0;定量离子对:CML:205.1→84.1, CEL:219.1→84.0。

2 结果

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 前处理方法的选择

目前研究报道的蛋白结合型 AGEs 方法前处理一般采用固相萃取(Solid-phase extraction, SPE)法^[14],但 SPE 小柱价格较高,且萃取步骤繁琐而耗时较长,包括了活化、平衡、上样、淋洗、洗脱等步

骤。有研究报道固相萃取法对极性较大的化合物纯化效果一般^[15]。故针对极性较强的 CML、CEL, 本试验比对使用 Waters Oasis HLB 小柱的固相萃取法与使用-20 °C 预冷无水乙醇的蛋白沉淀法对面包样品进行前处理的效果, 发现两种方法处理后 CML、CEL 的回收率均在方法学分析要求的±15% 范围内, 两种方法处理的样品在液相色谱图上基线均较平稳, 在目标 AGEs 出峰的出峰时间段内基本无干扰杂峰; 虽然固相萃取法在样品回收率及变异系数等方面优于蛋白沉淀法, 但在引入同位素内标后, 低、中、高 AGEs 水平的面包样品经两种方法处理后的定量结果差异无统计学意义 ($P>0.05$), 详见表 1。即采用简便且经济的蛋白沉淀法作为前处理方法同样可以实现对面包样品中两种蛋白结合型 AGEs 的定量检测。

2.1.2 蛋白沉淀试剂的选择

分别取甲醇-乙腈(1:3, V/V)混合溶液、三氯乙酸、丙酮、盐酸(6 mol/L)、三氯甲烷、-20 °C 预冷无水乙醇各 2 mL 作为蛋白沉淀试剂, 对面包混合样品进

表 1 固相萃取法及蛋白沉淀法定量结果比较($n=3$)
Table 1 Comparison of quantitative results between solid phase extraction and protein precipitation ($n=3$)

目标物	样品编号	固相萃取法/ (mg/kg)		蛋白沉淀法/ (mg/kg)		显著性
		定量结果	SD	定量结果	SD	
CML	1	6.37	0.53	5.14	0.67	—
	2	23.46	1.32	20.91	1.17	—
	3	42.60	2.56	39.77	3.02	—
CEL	1	2.78	0.30	2.39	0.35	—
	2	25.17	1.77	27.98	2.51	—
	3	43.72	1.38	43.79	3.40	—

注:SD:标准差;—: $P>0.05$

行前处理并上机检测, 试验溶液 AGEs 浓度为 CML 437.13±20.36 ng/mL、CEL 442.52±21.30 ng/mL。以 CML、CEL 峰面积即响应值作为指标比较, 试验重复 3 次。结果见表 2, 从 CML、CEL 响应值大小看, -20 °C 预冷无水乙醇沉淀蛋白质的效果明显好于三氯乙酸、丙酮、盐酸、三氯甲烷等试剂, 略优于甲醇-乙腈(1:3, V/V)混合溶液, 故选择-20 °C 预冷无水乙醇作为本试验前处理的蛋白沉淀试剂。

表 2 6 种蛋白沉淀试剂比较结果($n=3$)

Table 2 Comparison results of 6 kinds of protein precipitation reagents ($n=3$)

沉淀试剂	CML		CEL	
	响应值	SD	响应值	SD
甲醇-乙腈(1:3, V/V)	5 269 328.33	264 550.60	5 300 196.33	339 315.71
三氯乙酸	4 481 195.66	283 194.16	4 569 539.00	325 836.68
丙酮	4 375 279.00	383 987.48	4 927 684.33	308 451.74
盐酸(6 mol/L)	3 578 098.66	520 278.00	3 809 690.66	433 907.63
三氯甲烷	4 467 133.66	402 073.07	4 767 240.00	132 061.57
-20 °C 预冷无水乙醇	5 565 120.00	197 735.13	5 321 281.66	222 271.39

注:响应值:化合物在质谱图中的峰面积;SD:标准差

2.1.3 离子对试剂的考察

本试验比较了 0.5、1、2、5、8 mmol/L 浓度的三氟乙酸、甲酸、乙酸及九氟戊酸水溶液作为复溶液及水相的效果, 试验混合标准溶液 AGEs 浓度为 CML 50 ng/mL、CEL 5 ng/mL。结果发现 5 mmol/L 的九氟戊酸水溶液作为复溶液及水相取得了较理想的保留时间、分离效果及色谱峰型。25 °C 气温条件下 pH 计检测 5 mmol/L 九氟戊酸的 pH 值为 2.33~2.35, 在 C₁₈ 色谱柱耐受的 pH 值范围 2~8 内。故采用 5 mmol/L 的九氟戊酸水溶液作为复溶液及水相(B 相)。研究建议梯度洗脱流程以高水相开始而低水相结束可以减少有机盐或亲脂性有机物在色谱柱中的沉积而延长色谱柱的寿命^[16], 故为了提高 CML、CEL 的分离度, 减少拖尾改善峰形, 提高柱效, 最终确定的梯度洗脱流程如下:0~1 min, 96%B; 1~4 min, 96%B→80%B; 4~7 min, 80%B→60%B; 7~8 min, 60%B→40%B; 8~9 min, 40%B→20%B; 9~11 min, 20%B; 11~11.5 min, 20%B→96%B; 11.5~17 min,

96%B。

2.1.4 CML、CEL 的典型色谱图

空白样品、加标空白样品(加标浓度 CML: 20 ng/mL, CEL: 2 ng/mL)以及面包样品的典型色谱图见图 1, 各色谱峰型良好, 实际样品中 CML、CEL 的保留时间分别为 8.49、8.96 min, 空白样品对应的出峰时间无明显内源性干扰存在。

2.2 基质效应的评价

取烘焙温度 150 °C、烘焙时间 8 min 的面包芯样品, 按前处理方法从添加内标步开始处理成待测进样液, 将其稀释 1 倍后上机检测结果为低于检出限, 取该稀释后的待测进样液作为空白基质溶液, 并建立基质匹配标准曲线, 与溶剂标准曲线进行比较。CML、CEL 的基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线斜率比值为 0.83、0.81(超出 1±0.15 范围), 面包基质会在一定程度上限制目标 AGEs 的离子产生。在两种标准曲线中加同位素内标后发现斜率比值为 0.91、0.96, 即在加入同位素内标后可以忽略面

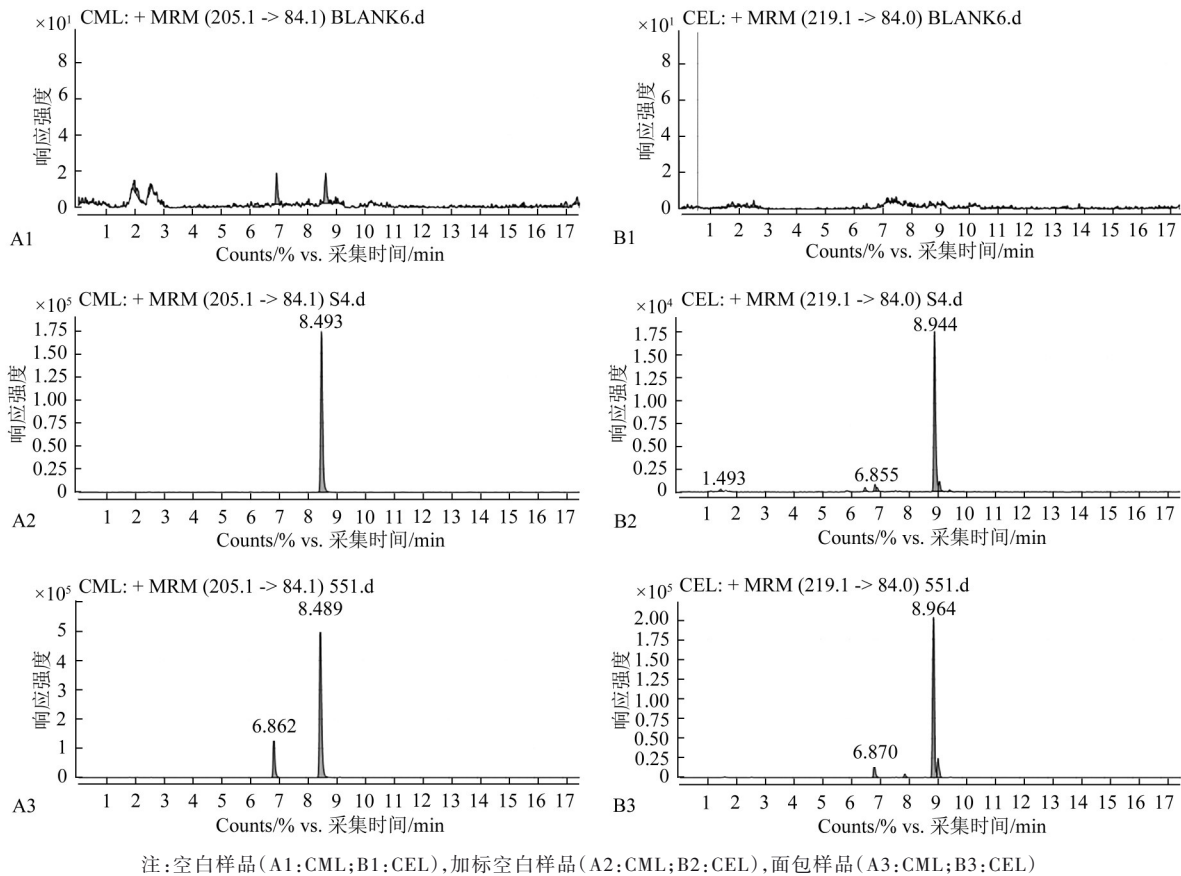


图1 UPLC-MS/MS典型色谱图

Figure 1 Typical chromatograms of UPLC-MS/MS

包基质对目标化合物电离的影响,因此采用制作较简便的加入同位素内标的溶剂标准曲线进行定量。

2.3 方法检出限、定量限、标准曲线、回收率

方法检出限、定量限根据加标空白样检测信号信噪比为3和10的浓度确定,即CML 4.5、20 ng/g; CEL 0.5、2 ng/g。与其他使用液质方法检测面包AGEs的研究相比^[17-18],本研究的检出限及定量限均较低。CML标准曲线的9个浓度点为2.5、5、10、20、50、100、200、400、800 ng/mL,浓度点范围内线

性良好,线性方程: $y=0.022444x+0.132779$,决定系数 $R^2>0.999$;CEL标准曲线的9个浓度点为0.25、0.5、1、2、5、10、20、40、80 ng/mL,浓度点范围内线性良好,线性方程: $y=0.048061x-0.010915$,决定系数 $R^2>0.999$ 。空白基质溶液加低、中、高浓度标的结果见表3,其中CML的平均回收率为89.62%~95.65%,相对标准偏差(RSD)为4.14%~10.75%,CEL的平均回收率为86.38%~97.17%,RSD为6.39%~9.92%。

表3 CML、CEL的加标回收率及相对标准差(n=6)

Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviations of CML and CEL (n=6)

目标物	本底值/(ng/mL)	加标量/(ng/mL)	实测值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
CML	0	5	4.48	89.62	10.75
	0	50	47.82	95.65	4.14
	0	500	452.38	90.48	8.40
CEL	0	0.5	0.43	86.38	7.55
	0	5	4.86	97.17	6.39
	0	50	46.47	92.93	9.92

2.4 实际样本测定

酵母添加量1%、糖20%、油8%,烘焙温度为190℃,烘焙时间为20 min条件制成的6个面包样品检测结果显示,面包皮中结合型CML、CEL平均含量为33.69±2.95、30.42±1.31 mg/kg,面包芯中结合型CML、CEL平均含量为7.56±0.83、1.33±

0.09 mg/kg。

3 小结

本试验建立了基于蛋白沉淀法检测面包中两种蛋白结合型AGEs的UHPLC-MS/MS方法。与固相萃取法相比,本试验前处理采用了以-20℃预冷

无水乙醇作为蛋白沉淀试剂的蛋白沉淀法,在能满足方法学要求的同时还具有操作简便、耗时短、经济等特点。使用同位素内标 CML-d₂、CEL-d₄很好地解决了面包基质效应的问题,同时优化了色谱方法以提高对 CML、CEL 定量的准确性。本试验所建立的检测方法具有简便、经济、准确可靠的特点,适用于面包样品中蛋白结合型 CML、CEL 的定量检测。

参考文献

- [1] BROWNLEE M, VLASSARA H, CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1984, 101(4): 527-537.
- [2] HULL G L J, WOODSIDE J V, AMES J M, et al. N^ε-(carboxymethyl) lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(1): 170-174.
- [3] WEI Q Y, LIU T, SUN D W. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 82: 32-45.
- [4] DOBI A, BRAVO S B, VEEREN B, et al. Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production [J]. *Free Radical Research*, 2019, 53(2): 150-169.
- [5] SERGI D, BOULESTIN H, CAMPBELL F M, et al. The role of dietary advanced glycation end products in metabolic dysfunction [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65(1): 1900934.
- [6] BYUN K, YOO Y, SON M, et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 177: 44-55.
- [7] HE J L, ZENG M M, ZHENG Z P, et al. Simultaneous determination of N^ε-(carboxymethyl) lysine and N^ε-(carboxyethyl) lysine in cereal foods by LC - MS/MS[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(3): 367-374.
- [8] INAN-EROGLU E, AYAZ A, BUYUKTUNCER Z. Formation of advanced glycation endproducts in foods during cooking process and underlying mechanisms: A comprehensive review of experimental studies[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2020, 33(1): 77-89.
- [9] CHENG W W, WANG X, ZHANG Z F, et al. Development of an isotope dilution UHPLC-QqQ-MS/MS-based method for simultaneous determination of typical advanced glycation end products and acrylamide in baked and fried foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(8): 2611-2618.
- [10] SCHEIJEN J L J M, CLEVERS E, ENGELEN L, et al. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 1145-1150.
- [11] SCHEIJEN J L J M, HANSEN N M J, VAN GREEVENBROEK M M, et al. Dietary intake of advanced glycation endproducts is associated with higher levels of advanced glycation endproducts in plasma and urine: The CODAM study [J]. *Clinical Nutrition*, 2018, 37(3): 919-925.
- [12] ENGELEN L, STEHOUWER C D A, SCHALKWIJK C G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies [J]. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2013, 15(8): 677-689.
- [13] HELLWIG M, BUNZEL D, HUCH M, et al. Stability of individual Maillard reaction products in the presence of the human colonic microbiota [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(30): 6723-6730.
- [14] YUAN X J, NIE C X, LIU H C, et al. Comparison of metabolic fate, target organs, and microbiota interactions of free and bound dietary advanced glycation end products [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021: 1-22.
- [15] NOVÁKOVÁ L, VLČKOVÁ H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656(1/2): 8-35.
- [16] TILLER P R, ROMANYSHYN L A. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2002, 16(2): 92-98.
- [17] 朱玉洁. UPLC-MS/MS 分析食物煎炸过程中 2 种晚期糖基化终末产物的研究 [J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(7): 88-91.
- ZHU Y J. Analysis of two advanced glycosylation end products in fried foods by UPLCMS/MS during frying process [J]. *Cereals & Oils*, 2019, 32(7): 88-91.
- [18] 程威威, 王霞, 张忠飞, 等. 基于 UPLC-QqQ-MS/MS 同步检测热加工食品中典型晚期糖基化终末产物 [J]. *食品科学*, 2021, 42(10): 316-321.
- CHENG W W, WANG X, ZHANG Z F, et al. Simultaneous determination of typical advanced glycation end products in thermally processed foods by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2021, 42(10): 316-321.