

超高效液相色谱-稳定性同位素稀释质谱法测定预包装食品中不同阶段美拉德反应产物含量

李华韬¹, 张巧智¹, 鲍宗燠¹, 蔡庆霆¹, 倪皓洁¹, 郑睿行², 张书芬², 曹丽丽², 王彦波¹, 傅玲琳^{1*}
(1.浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018; 2.宁波市食品检验检测研究院, 浙江 宁波 315048)

摘要: 建立基于稳定同位素内标稀释的超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱同步检测预包装食品中羧甲基赖氨酸(*N*^ε-(carboxymethyl)-lysine, CML)、羧乙基赖氨酸(*N*^ε-(carboxyethyl)-lysine, CEL)、甲基乙二醛-羟基咪唑酮异构体(methyglyoxal-derived hydroimidazolones, MG-H1、MG-H2、MG-H3)、乙二醛-氢咪唑酮(glyoxal-derived hydroimidazolone, G-H1)、糠氨酸7种不同阶段美拉德反应产物(Maillard reaction products, MRPs)的含量。采用Kinetex C₁₈色谱柱进行分离,多反应监测模式进行定量分析。该方法的加标回收率为88.4%~111.3%,精密度相对标准偏差小于9%,检出限和定量限分别为2.1~14.2 ng/mL和7.4~41.2 ng/mL。采用该方法对134种常见预包装食品中的7种MRPs进行定量,并对得到的数据进行主成分分析和相关性分析。结果表明,CML、MG-H1/3、MG-H2和G-H1是预包装食品中主要的MRPs,各MRPs含量之间呈显著正相关,而且与蛋白质、脂肪、总糖含量呈显著正相关。该方法表现出良好的线性度、准确度和精密度,适用于预包装食品中不同种MRPs的快速检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱; 美拉德反应产物; 预包装食品; 羧甲基赖氨酸; 甲基乙二醛-羟基咪唑酮异构体

Detection of Maillard Reaction Products at Different Stages in Prepackaged Foods by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry

LI Huatao¹, ZHANG Qiaozhi¹, BAO Zongyu¹, CAI Qingting¹, NI Haojie¹, ZHENG Ruixing²,
ZHANG Shufen², CAO Lili², WANG Yanbo¹, FU Linglin^{1*}

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;
2. Ningbo Institute For Food Control, Ningbo 315048, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of seven Maillard reaction products (MRPs), namely *N*^ε-(carboxymethyl)-lysine (CML), *N*^ε-(carboxyethyl)-lysine (CEL), methyglyoxal-derived hydroimidazolones (MG-H1, MG-H2 and MG-H3), glyoxal-derived hydroimidazolone (G-H1) and furosine in prepackaged foods by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS). The chromatographic separation was performed on a Kinetex C₁₈ column and quantification was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The recoveries of the method ranged from 88.4% to 111.3% with relative standard deviations (RSDs) less than 9% in terms of precision, and the limit of detection and the limit of quantification were 2.1–14.2 and 7.4–41.2 ng/mL, respectively. The developed method was applied to 134 typical prepackaged foods, and the obtained data was analyzed by principal component analysis (PCA) and correlation analysis (CA). The results showed that CML, MG-H1/3, MG-H2 and G-H1 were the major MRPs in prepackaged foods, and they had significant positive correlations with each other and with protein, fat and total sugar contents. This method shows acceptable linearity, accuracy and precision and is suitable for the rapid determination of multiple MRPs in prepackaged foods.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry; Maillard reaction products; prepackaged foods; *N*^ε-(carboxymethyl)-lysine; methyglyoxal-derived hydroimidazolones

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221026-272

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)08-0293-08

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871735); 国家自然科学基金青年科学基金项目(32202202)

第一作者简介: 李华韬(1998—)(ORCID: 0000-0002-7761-8568), 男, 硕士, 研究方向为食品安全与检测。

E-mail: 1125372818@qq.com

*通信作者简介: 傅玲琳(1981—)(ORCID: 0000-0001-5623-3047), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。

E-mail: fulinglin@mail.zjgsu.edu.cn

引文格式:

李华韬, 张巧智, 鲍宗焯, 等. 超高效液相色谱-稳定性同位素稀释质谱法测定预包装食品中不同阶段美拉德反应产物含量[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 293-300. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221026-272. <http://www.spkx.net.cn>

LI Huatao, ZHANG Qiaozhi, BAO Zongyu, et al. Detection of Maillard reaction products at different stages in prepackaged foods by ultra-high performance liquid chromatography-stable isotope dilution mass spectrometry[J]. Food Science, 2023, 44(8): 293-300. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221026-272. <http://www.spkx.net.cn>

美拉德反应, 是在食品热加工、烹饪和贮存过程中自发且广泛存在的一种反应, 也称为非酶褐变反应, 是羰基化合物(还原糖或脂质氧化产物的羰基)和氨基化合物(蛋白质、肽、脂质、核酸的自由氨基或游离氨基酸)间经过一系列复杂反应最终生成棕色甚至黑色稳定聚合产物的过程。美拉德反应通常分为3个阶段: 初级阶段、中间阶段和高级阶段, 各阶段会产生多种美拉德反应产物(Maillard reaction products, MRPs)^[1]。其中, 糠氨酸是赖氨酸生成Amadori产物的间接指标, 被认为是美拉德反应初级阶段的标志物^[2]。甲基乙二醛-羟基咪唑酮异构体(methylglyoxal-derived hydroimidazolones, MG-H1、MG-H2、MG-H3)和乙二醛-氢咪唑酮(glyoxal-derived hydroimidazolone, G-H1)是美拉德反应中间阶段的产物, 可用于评估加工食品中的美拉德反应程度^[3]。晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs), 如羧甲基赖氨酸(*N*^ε-(carboxymethyl)-lysine, CML)、羧乙基赖氨酸(*N*^ε-(carboxyethyl)-lysine, CEL)等, 通常被认为是美拉德反应高级阶段的产物^[4]。不同阶段MRPs均可以在热加工后的食品中发现, 如巴氏杀菌、消毒、烘烤、油炸等, 且在生理条件下的组织和体液中也可以普遍检测到^[5-6]。现今, 研究人员已经认识到, MRPs在体内的过度积累会促进氧化应激和炎症, 并密切参与多种慢性非传染性疾病的发病机制, 如2型糖尿病^[6-7]、慢性肾衰竭^[8]、心血管疾病^[9]、神经退行性疾病^[10]和某些类型的癌症^[11]。因此, 针对加工食品中MRPs的研究已成为近年来的热点和焦点。

目前已有一些研究报道了乳制品^[12]、加工坚果^[13]、熟肉^[14-15]、烘烤和油炸食品^[16-17]等食品类别中典型MRPs的含量。常用的定量分析技术如酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)法和液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)法等。其中, ELISA法^[18]的检测结果易因样品预处理、基质等原因会产生较大偏差, 定量准确性较低, 且仅能提供半定量结果, 因此备受诟病; GC-MS法^[19]需要额外的衍生步骤, 操作繁琐且回收率低, 不适用于大批量食品的检测。相比之下, LC-MS/MS具有较高的灵敏度和特异性, 因此已被广泛用于定量食品基质中的各类MRPs^[20-22]。然而, 目前现有的研

究仅针对食品中的一种或少数几种MRPs进行定量, 即CML、CEL和MG-H1^[23-25]。食品中MRPs种类多样, 且食品基质复杂, 不同类别之间组分差异较大, 亟需建立一种定量分析食品中多种MRPs的统一有效的检测方法。

本研究建立基于稳定同位素内标稀释的超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry, UPLC-QqQ-MS/MS)法, 可实现同时定量预包装食品中7种不同美拉德反应阶段的MRPs。进一步利用该方法分析134种常见预包装食品中MRPs的含量, 结合预包装食品主要营养成分信息, 使用主成分分析(principal component analysis, PCA)、相关性分析等统计学方法, 揭示不同预包装食品类别中MRPs的含量分布及其与主要宏量营养成分间的关系, 为食品中不同阶段MRPs的含量检测及对膳食MRPs摄入量的评估提供重要参考, 这对未来深入探究食品中MRPs在人类疾病中的作用具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

实验所用预包装食品均根据中国消费者的饮食习惯选择, 购自于浙江省杭州市内各大超市。

CML标准品(纯度≥95%)、CEL标准品(纯度≥95%) 美国Cayman Chemical公司; MG-H1标准品(纯度≥96%)、MG-H2标准品(纯度≥94%)、MG-H3标准品(纯度≥99%)、G-H1标准品(纯度≥98%)、糠氨酸标准品(纯度≥98%)、CML-*D*₄标准品(纯度≥99%)、CEL-*D*₄标准品(纯度≥99%)、MG-H1-*D*₃标准品(纯度≥99%)、G-H1-¹³C₂标准品(纯度≥98%) 德国Iris Biotech GmH公司; 硼氢化钠(纯度≥98%)、四硼酸钠十水合物(纯度≥99.5%)、氢氧化钠、盐酸、氯仿、甲醇(均为分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲酸铵、甲酸、乙腈(均为色谱纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

ExionLC UPLC仪、QTRAP 5500 QqQ-MS/MS仪 美国AB SCIEX公司; Kinetex C₁₈色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 美国Phenomenex公司;

Allegra X-30R型多功能台式高速离心机 德国Beckman Coulter公司; LGJ-12型真空冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; MS204/A型电子天平 瑞士Mettler Toledo公司; N-20型多功能氮吹仪 山东云网数据科技有限公司; ED56型自然对流烘箱 德国Binder GmbH公司; Milli-Q Advantage A10超纯水仪 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别准确称量5.0 mg CML、CEL、G-H1、MG-H1、MG-H2、MG-H3、糠氨酸、CML- D_4 、CEL- D_4 、G-H1- $^{13}C_2$ 和MG-H1- D_3 溶于5.0 mL超纯水中, 配制质量浓度为1.0 mg/mL的标准储备溶液, 贮存在-20 °C。用超纯水将标准储备溶液按一定比例稀释, 配制含有CML、CEL、G-H1、MG-H1、MG-H2、MG-H3、糠氨酸的质量浓度为5.0 μ g/mL的混合标准溶液, 同时制备含有CML- D_4 、CEL- D_4 、G-H1- $^{13}C_2$ 和MG-H1- D_3 的质量浓度为1.0 μ g/mL的内标溶液, 贮存在-4 °C。制作标准曲线时, 用超纯水稀释混合标准溶液, 配制质量浓度分别为5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、600.0、800.0 ng/mL的混合标准系列溶液^[26], 将含有CML- D_4 、CEL- D_4 、G-H1- $^{13}C_2$ 和MG-H1- D_3 的内标溶液分别加入上述混合标准溶液中, 其最终质量浓度均为100.0 ng/mL, 准备进行后续处理分析。

1.3.2 样品前处理

样品前处理方法在Scheijen等^[24]研究的基础上, 进行适当地修改。去除样品不可食用的部分, 将剩余部分真空冷冻干燥后研磨成均匀的粉末, 置于-20 °C保存。称量一份含有5.0~10.0 mg蛋白质当量的样品粉末(液体样品可直接称量)于离心管中, 加入9.0 mL氯仿-甲醇(2:1, V/V), 充分涡旋振荡, 5 500×g离心10 min, 弃去上清液, 重复以上脱脂步骤3次后, 在氮气流下吹干沉淀物至粉末状。为了防止在酸水解过程中果糖赖氨酸重新形成MRPs, 加入1.0 mL硼氢化钠溶液(1.0 mol/L溶于0.1 mol/L NaOH溶液)和2.0 mL硼酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 9.2)对样品进行还原, 室温下静置3 h。然后将样品在4 000×g下离心10 min, 弃去上清液, 将沉淀物在氮气流下吹至近干, 转移至消解管。然后, 向消解管中加入3 mL 6.0 mol/L的盐酸, 于110 °C下水解样品24 h。水解后的样品在真空下干燥, 加入4.5 mL超纯水复溶, 加入准备好的内标溶液(CML- D_4 、CEL- D_4 、G-H1- $^{13}C_2$ 和MG-H1- D_3), 每种内标的最终质量浓度为100.0 ng/mL。然后, 将溶液经0.22 μ m滤膜过滤, 进行后续UPLC-QqQ-MS/MS分析。

1.3.3 UPLC-QqQ-MS/MS条件

Kinetex C₁₈色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2.6 μ m); 流速0.12~0.22 mL/min; 流动相: A为含有5.0 mmol/L甲

酸铵的0.1%甲酸溶液, B为含有5.0 mmol/L甲酸铵的乙腈溶液; 梯度洗脱程序如表1所示; 柱温40 °C; 进样量3 μ L。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流速/(mL/min)	流动相体积分数/%	
		A	B
0.0	0.12	98	2
3.0	0.12	98	2
6.0	0.22	96	4
9.0	0.20	5	95
10.0	0.20	5	95
10.2	0.12	98	2
12.0	0.12	98	2

质谱条件: 电喷雾正离子模式; 多反应监测模式; 离子源温度500 °C; 喷雾电压5 500 V; 帘气压力30 psi; 雾化气压力50 psi; 辅助气压力50 psi; 其他质谱参数见表2。

表2 多反应监测模式采集参数

Table 2 MRM acquisition parameters for each analyte

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压/V
CML	205.0	130.0*	16.0	80.0
		84.0	27.0	
CML- D_4	209.0	134.0*	16.0	90.0
		88.0	26.0	
CEL	219.0	130.0*	17.0	90.0
		84.0	26.0	
CEL- D_4	223.0	134.0*	18.0	90.0
		88.0	27.0	
G-H1	215.2	116.1*	19.0	100.0
		152.2	20.0	
G-H1- $^{13}C_2$	217.1	153.9*	18.0	35.0
		118.1	17.0	
MG-H1/3	229.1	114.1*	20.0	70.0
		210.8	12.0	
MG-H2	229.1	116.0*	19.0	80.0
		70.0	30.0	
MG-H1- D_3	232.2	70.0*	32.0	80.0
		213.8	14.0	
糠氨酸	255.2	130.0*	17.0	60.0
		84.0	28.0	

注: *.定量离子。

1.4 数据处理

每个样品至少平行测定分析3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 25.0软件对数据进行统计学分析, $P < 0.05$, 差异显著, 采用GraphPad Prism 8.3.1软件作图。

2 结果与分析

2.1 MRPs的UPLC-MS/MS分析

CML、CEL、G-H1、MG-H1、MG-H2、MG-H3、糠氨酸的极性较强, 很难在一般的色谱柱上保留, 本研究选择能够为多种极性化合物提供良好保留效果的

Kinetex C₁₈色谱柱^[25,27],对样品中的MRPs进行分离以便进行后续的MS/MS分析,MRPs的保留时间见图1。通过监测每个分析物在多反应监测模式下的信号反应,对MS/MS参数进行优化,优化后的最终条件见1.3.3节。优化后,在单次色谱运行中大多数分析物具有良好的分离效果和峰形,并能得到所有分析物可靠的MS/MS光谱。尽管在多反应监测模式下运行的QqQ具有高选择性和高灵敏度,可以对分离良好的分析物进行定量,但由于MG-H1和MG-H3具有相同的保留时间、分子质量和MS/MS图谱,因此无法分辨它们的响应信号^[26,28]。Akillioğlu等^[28]指出,在酸水解过程中,MG-H1异构体可能部分转化为MG-H3异构体,进而导致对该2种化合物的定量出现误差。因此,考虑到上述现象,在本研究中,MG-H1和MG-H3的浓度值将基于这2种异构体的峰面积之和进行计算,统称为MG-H1/3。

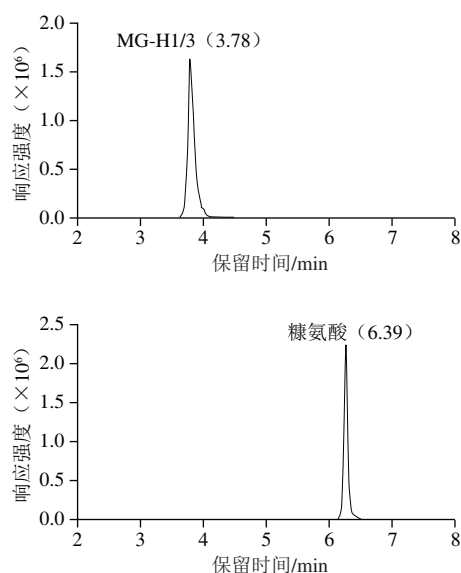
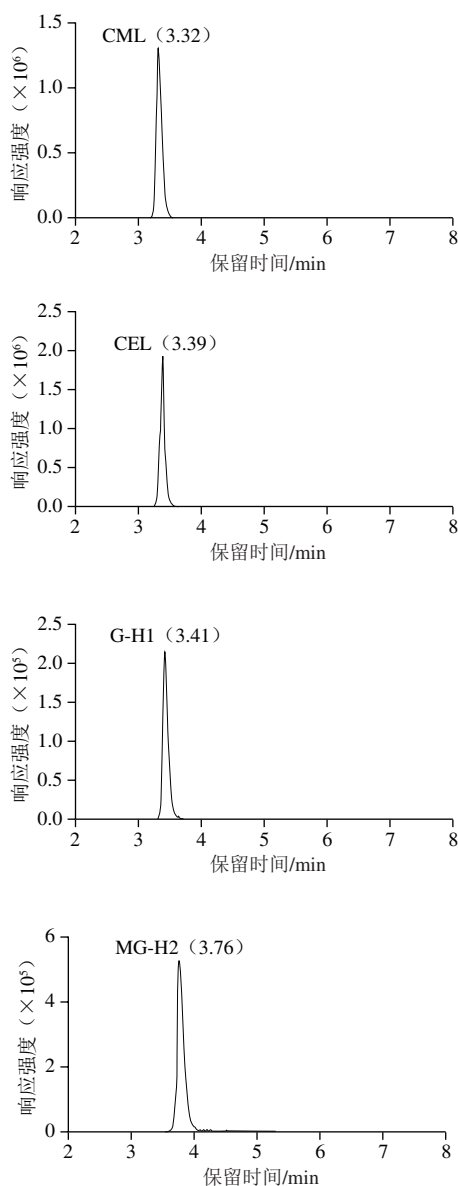


图1 目标分析物的离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatograms of the target analytes

2.2 方法学评价

2.2.1 线性范围、检出限及定量限结果

制备质量浓度为5.0~800.0 ng/mL的混合标准系列溶液,以分析物质量浓度为横坐标(x),以分析物定量离子对信号响应峰面积与对应内标物峰面积比值为纵坐标(y),绘制标准曲线。如表3所示,每种分析物在5.0~800.0 ng/mL范围内均具有良好的线性关系, $R^2 > 0.999$ 。不断稀释标准溶液的质量浓度,当信噪比分别为3.0和10.0时,得到目标分析物的检出限和定量限。目标分析物的检出限和定量限分别为2.1~14.2 ng/mL和7.4~41.2 ng/mL,低于朱玉洁^[16]报道的UPLC-MS/MS方法(15.0 ng/mL和45.0 ng/mL)和Lin Qin等^[29]报道的UPLC-Q-TOF/MS方法(100.0 ng/mL和300.0 ng/mL)。

表3 UPLC-MS/MS方法的标准曲线、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 3 Calibration curve equations, linear ranges, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantification of the UPLC-MS/MS method

分析物	线性范围/(ng/mL)	标准曲线	相关系数 R^2	检出限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
CML	5.0~800.0	$y=0.011\ 43x+0.000\ 163$	0.999	4.3	11.2
CEL	5.0~800.0	$y=0.028\ 32x-0.013\ 47$	0.999	5.3	16.1
G-H1	5.0~800.0	$y=0.009\ 13x-0.001\ 37$	0.999	7.5	22.3
MG-H1/3	5.0~800.0	$y=0.008\ 78x-0.002\ 38$	0.999	14.2	41.2
MG-H2	5.0~800.0	$y=0.005\ 19x-0.001\ 10$	0.999	10.8	31.5
糠氨酸	5.0~800.0	$y=0.155\ 99x+0.426\ 12$	0.999	2.1	7.4

2.2.2 加标回收率及精密度结果

为了验证该方法的准确性,以UHT牛奶、白面包和蚝油作为食品基质样品,根据UHT牛奶、白面包和

蚝油样品中MRPs的含量分布, 每种分析物的加标量选择200.0 ng/mL进行加标回收实验。对加标样品平行测定6次, 连续测量3 d, 计算得到日内和日间的精密度, 结果见表4。该方法得到的所有分析物的加标回收率在UHT牛奶中为89.1%~111.3%, 在白面包中为88.4%~102.0%, 在蚝油中为90.6%~101.4%, 日内精密度分别为3.1%~6.8%、2.1%~7.9%和3.6~6.3%, 日间精密度分别为4.2%~8.7%、3.4%~8.7%和5.1~7.3%。结果表明此方法的准确度和精密度良好, 符合食品中MRPs的定量分析要求。

表4 MRP的加标回收率和精密度

Table 4 Recoveries and precision for MRPs spiked in milk, bread and oyster sauce

分析物	%								
	加标回收率			日内精密度			日间精密度		
	UHT牛奶	白面包	蚝油	UHT牛奶	白面包	蚝油	UHT牛奶	白面包	蚝油
CML	91.4	92.1	93.2	6.8	3.5	4.6	8.5	5.0	7.3
CEL	101.4	91.3	95.1	5.7	2.8	3.9	6.7	5.8	5.9
G-H1	90.4	88.4	94.7	4.6	7.9	5.7	8.7	8.5	6.4
MG-H1/3	89.1	95.6	90.6	5.0	2.1	6.3	6.3	6.9	7.1
MG-H2	111.3	102.0	95.3	3.1	3.1	4.2	4.2	8.7	6.6
糠氨酸	94.7	96.2	101.4	4.9	2.3	3.6	6.1	3.4	5.1

2.3 常见预包装食品样品含量测定结果

利用所建立的检测方法分析134种常见预包装食品中MRPs的含量(以每1 kg湿质量计), 结果如图2所示。总体上, 坚果制品(33.49~661.45 mg/kg)、糖果和零食(31.29~308.44 mg/kg)、糕点和饼干(16.53~278.22 mg/kg)、豆制品(11.36~143.06 mg/kg)和肉制品(12.46~167.54 mg/kg)中总MRPs的水平显著高于酱汁和调味品(3.15~107.69 mg/kg)、面包(70.74~98.85 mg/kg)、谷物制品(40.51~66.66 mg/kg)、乳制品(0.93~65.05 mg/kg)、蛋(25.31~39.23 mg/kg)、水果(11.79 mg/kg)、油(0~3.76 mg/kg)和饮料类食品(0~3.56 mg/kg)。CML、MG-H1/3、MG-H2和G-H1是大多数食品中发现的主要MRPs, 相比之下, CEL和糠氨酸虽然可以在大多数食品样品中检测到, 但其含量相对较低。这与Poojary等^[26]的研究结果一致, 建立一种UPLC-MS/MS方法同时定量食品样品中的不同MRPs, 发现MG-H1/3、G-H1、糠氨酸、CML和CEL是在热加工食品(如UHT牛奶和烤鸡胸肉)中形成的主要MRPs。Hull等^[23]和Scheijen等^[24]采用UPLC-MS/MS法分别检测了西方饮食中257种食品中CML的含量和190种食品中CML、CEL、MG-H1的含量, 初步形成了膳食MRPs数据库。

上述数据库中涉及的食物均根据西方消费者的习惯进行选择, 且仅针对其中一种或少数几种MRPs(即CML、CEL和MG-H1)进行测定^[23-24,30-32]。本研究根据中国消费者的饮食习惯选择134种预包装食品并对其中7种不同的MRPs进行定量分析, 进一步扩充了膳食MRPs数据库, 这为未来评估中国消费者饮食中MRPs的摄入量提供一个值得参考的数据库。

在分析的134种常见预包装食品中, 坚果制品的MRPs含量最高, 主要是MG-H1/3、MG-H2和G-H1。其中, 蜜焗和烤制增加了花生中MRPs的含量, 这归因于体系中高含量的葡萄糖和不饱和脂肪酸在剧烈的热处理下加速了MRPs的生成^[33]。Scheijen等^[24]研究发现, 烤制过的坚果中MG-H1的含量(16.6~26.6 mg/100 g)较未加工的坚果高出20倍以上, 这与本实验得到的结果相类似。此外, 糖果和零食、烘焙产品中MRPs的含量也相对较高, 这同样与这类食品经历了较长时间的干热处理有关^[34-35]。在乳制品中, 冰淇淋和巴氏杀菌奶中MRPs的含量明显低于UHT牛奶, 这可能是由于前者较低的食品加工温度所致^[23]。房红娟等^[36]在牛血清白蛋白-葡萄糖热加工模型体系中发现, 加工条件如加热时间, 加工温度及初始pH值对MRPs的形成有重要影响。不仅是在模型体系中, Uribarri等^[30]利用ELISA分析了549种食品中CML的水平, 发现高温和干热的加工方式会剧烈加速MRPs的生成。

此外, 在肉制品和豆制品中也检测到了较高水平的MRPs, 同时发现三文鱼罐头中MRPs的水平远高于烟熏三文鱼, 这可归因于罐头制品通常采用更剧烈的杀菌处理和需经长期贮存的作用^[37]。在豆制品中, 除酱油(老抽和生抽)外, 发酵豆制品中的MRPs浓度, 特别是CML高于未发酵和加工程度低的豆制品(白豆腐和豆浆)。这是因为在发酵过程中, 蛋白质和碳水化合物部分水解成多肽和单糖作为美拉德反应的底物导致。相比之下, 常见的饮料和油类中MRPs的含量相对较低, 可以忽略不计。总体上, 不同类别预包装食品中MRPs的含量差距较大, 这与食品的加工条件和组分差异密切相关。一系列外部和内部因素会对美拉德反应及MRPs的形成过程产生影响, 特定MRPs的含量差异可用样品前处理方式、检测方法和食品组分的不同解释。基于得到的预包装食品MRPs数据库, 后续研究可以利用多种模型体系或食品模式基质探究影响食品中不同MRPs生成的具体影响因素和机制。

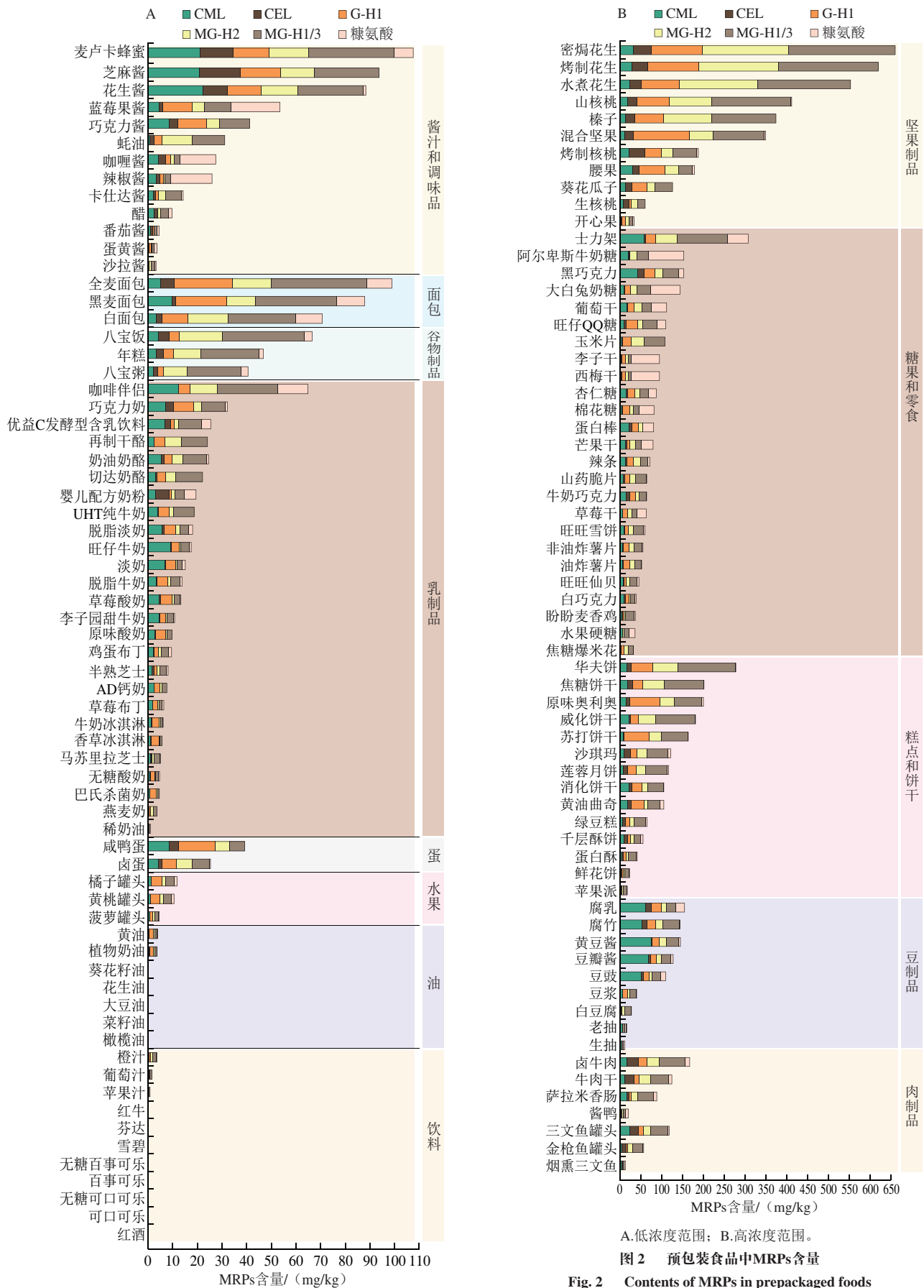


图2 预包装食品中MRPs的含量

Fig. 2 Contents of MRPs in prepackaged foods

2.4 PCA及相关性分析

为了进一步了解预包装食品中MRPs的形成特点,对上述数据进行PCA,结果如图3A所示。共提取2个特征值大于1的PC,PC1与PC2累计贡献率占总方差的90.51%,表明2个PCs能反映90.51%的总信息,其中PC1占78.59%,较能反映预包装食品中MRPs的含量分布情况。预包装食品中主要的MRPs,即CML、CEL、G-H1、MG-H2和MG-H1/3与总MRPs的含量密切相关,且可基本由PC1定义。各个单个MRP与总MRPs含量之间相关性最强的是MG-H2 ($r=0.964, P<0.001$)和MG-H1/3 ($r=0.960, P<0.001$),该两者可以作为预包装食品中MRPs含量的总体评价指标。

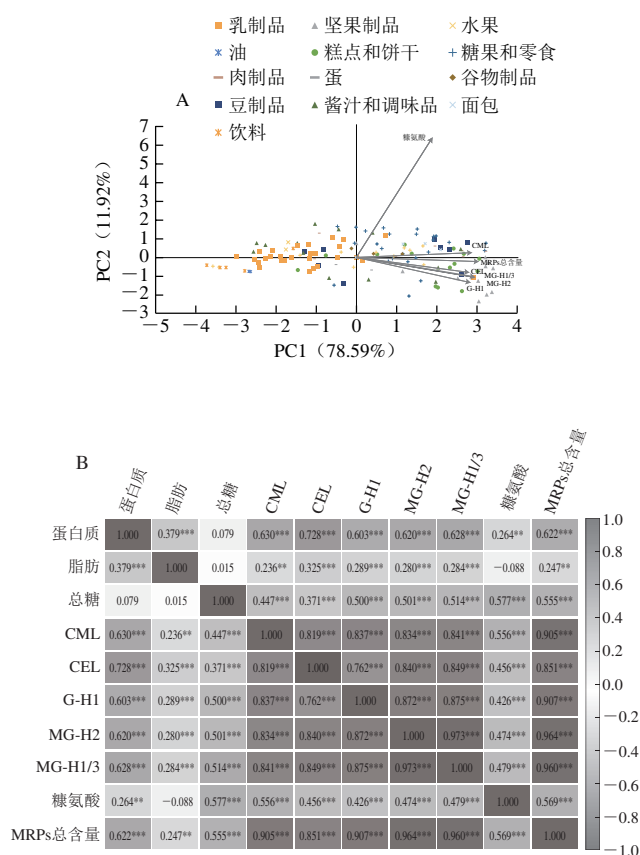


图3 预包装食品中所有指标的PCA (A) 及相关性分析 (B)
Fig. 3 PCA loading plot (A) and correlation heatmap (B) of all tested indicators in prepackaged foods

进一步分析各MRPs含量与食品中宏量营养素水平的相关性。根据预包装食品营养成分标签上的信息得到对应食品中蛋白质、脂肪、总糖的含量,将其与各类MRPs的含量进行相关性分析,结果如图3B所示。可见,MRPs含量与蛋白质含量之间的相关性最强,其次是总糖和脂肪;除糖氨酸与脂肪之间不存在相关性外,其余均呈显著正相关。这可能是由于蛋白质和糖类是美拉德反应的主要反应物,而脂质过氧化可能会产生二羰基化合物作

为反应性中间物,导致额外的MRPs形成^[38]。安婧等^[39]发现市售鱼加工产品中CML、CEL、MG-H1含量与蛋白质含量呈负相关,而CML、CEL与总糖含量不相关,这可能是由于该研究中食品种类的单一性所致。本实验样品数量大,种类分布广泛,可真实反映预包装食品中MRPs的含量分布及内在相关性。类似地,刘慧琳等^[40]发现在牛血清白蛋白-葡萄糖体系中CML的生成量与蛋白质、葡萄糖浓度之间呈正相关。由于不同食品基质和美拉德反应本身的复杂性,今后的研究可采用模型体系探究不同成分或加热方式在MRPs形成中的作用及机制。

3 结论

通过建立一种基于稳定同位素稀释的UPLC-QqQ-MS/MS方法,实现同时定量预包装食品中7种不同阶段的MRPs (CML、CEL、G-H1、MG-H1/3、MG-H2、糖氨酸),并进一步利用该方法分析134种常见预包装食品中的MRPs含量,提出了首个中式预包装食品MRPs数据库。经数据分析发现,CML、MG-H1/3、MG-H2和G-H1是大多数食品中主要的MRPs,且在坚果制品、糖果和零食、糕点和饼干、豆制品和肉制品中含量较高。在预包装食品中,7种MRPs含量之间存在显著正相关,且与食品中蛋白质、脂肪、总糖含量呈显著正相关。本研究为食品中MRPs的检测分析以及对饮食中MRPs摄入量的准确评估提供了数据支撑,有利于研究人员在观察性和干预性研究中探究食源性MRPs在人类疾病中的病理作用。

参考文献:

- [1] ALJAHDALI N, CARBONERO F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(3): 474-487. DOI:10.1080/10408398.2017.1378865.
- [2] ERBERSDOBLER H F, SOMOZA V. Forty years of furosine-forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(4): 423-430. DOI:10.1002/mnfr.200600154.
- [3] DELGADO-ANDRADE C, VINCENZO F. Dietary advanced glycosylation end-products (dAGEs) and melanoidins formed through the Maillard reaction: physiological consequences of their intake[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2018, 9: 271-291. DOI:10.1146/annurev-food-030117-012441.
- [4] GONG R Z, WANG Y H, WANG Y F, et al. Simultaneous determination of N^ε-(carboxymethyl) lysine and N^ε-(carboxyethyl) lysine in different sections of antler velvet after various processing methods by UPLC-MS/MS[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3316. DOI:10.3390/molecules23123316.
- [5] AHMED N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2005, 67(1): 3-21. DOI:10.1016/j.diabres.2004.09.004.

- [6] CAI W J, RAMDAS M, ZHU L, et al. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(39): 15888-15893. DOI:10.1073/pnas.1205847109.
- [7] VLASSARA H, STRIKER G E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2011, 7(9): 526-539. DOI:10.1038/nrendo.2011.74.
- [8] RABBANI N, THORNALLEY P J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease[J]. Kidney International, 2018, 93(4): 803-813. DOI:10.1016/j.kint.2017.11.034.
- [9] BASTA G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 9-21. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.025.
- [10] SHARMA A, WEBER D, RAUPBACH J, et al. Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease[J]. Redox Biology, 2020, 34: 101546. DOI:10.1016/j.redox.2020.101546.
- [11] EVA T A, BARUA N, CHOWDHURY M M, et al. Perspectives on signaling for biological-and processed food-related advanced glycation end-products and its role in cancer progression[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(10): 2655-2672. DOI:10.1080/10408398.2020.1856771.
- [12] LI Y, WU Y R, QUAN W, et al. Quantitation of furosine, furfurals, and advanced glycation end products in milk treated with pasteurization and sterilization methods applicable in China[J]. Food Research International, 2021, 140: 110088. DOI:10.1016/j.foodres.2020.110088.
- [13] ZHANG G, HUANG G W, XIAO L, et al. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(22): 12037-12046. DOI:10.1021/jf202515k.
- [14] EGGEN M D, GLOMB M A. Analysis of glyoxal-and methylglyoxal-derived advanced glycation end products during grilling of porcine meat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(50): 15374-15383. DOI:10.1021/acs.jafc.1c06835.
- [15] CHEN G J, SCOTT S J. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 190-195. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.06.081.
- [16] 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): 4. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2019.07.024.
- [17] JOST T, HENNING C, HEYMANN T, et al. Comprehensive analyses of carbohydrates, 1,2-dicarbonyl compounds, and advanced glycation end products in industrial bread making[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3720-3731. DOI:10.1021/acs.jafc.0c07614.
- [18] MATSUI T, JOO H D, LEE J M, et al. Development of a monoclonal antibody-based ELISA system for glyceraldehyde-derived advanced glycation end products[J]. Immunology Letters, 2015, 167(2): 141-146. DOI:10.1016/j.imlet.2015.08.008.
- [19] MILKOVSKA-STAMENOVA S, SCHMIDT R, FROLOV A, et al. GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(25): 5911-5919. DOI:10.1021/jf505757m.
- [20] POULSEN M W, HEDEGAARD R V, ANDERSEN J M, et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 60: 10-37. DOI:10.1016/j.fct.2013.06.052.
- [21] HELLWIG M, HUMPF H U, HENGSTLER J, et al. Quality criteria for studies on dietary glycation compounds and human health: opinion of the senate commission on food safety (SKLM) of the german research foundation (DFG)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(41): 11307-11311. DOI:10.1021/acs.jafc.9b04172.
- [22] TAREKE E, FORSLUND A, LINDH C H, et al. Isotope dilution ESILC-MS/MS for quantification of free and total N^ε-(1-carboxymethyl)-l-lysine and free N^ε-(1-carboxyethyl)-l-lysine: comparison of total N^ε-(1-carboxymethyl)-l-lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 4253-4259. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.07.003.
- [23] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.08.055.
- [24] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.06.049.
- [25] CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, LA BARBERA G, et al. Chromatographic column evaluation for the untargeted profiling of glucosinolates in cauliflower by means of ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry[J]. Talanta, 2018, 179: 792-802. DOI:10.1016/j.talanta.2017.12.019.
- [26] POOJARY M M, ZHANG W, GRECO I, et al. Liquid chromatography quadrupole-orbitrap mass spectrometry for the simultaneous analysis of advanced glycation end products and protein-derived cross-links in food and biological matrices[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1615: 460767. DOI:10.1016/j.chroma.2019.460767.
- [27] GRITTI F, GUIOCHON G. Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C₁₈ particles in gradient elution chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(10): 1604-1615. DOI:10.1016/j.chroma.2010.01.008.
- [28] AKILLIOĞLU H G, LUND M N. Quantification of advanced glycation end products and amino acid cross-links in foods by high-resolution mass spectrometry: applicability of acid hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130601. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130601.
- [29] LIN Q, ZHENG X Y, CHEN C, et al. Application of ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry in determination of CML and CEL in baking foods[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(3): 297-304. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2017.03.001.
- [30] URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2010, 110(6): 911-916. DOI:10.1016/j.jada.2010.03.018.
- [31] TAKEUCHI M, TAKINO J, FURUNO S, et al. Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan[J]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0118652. DOI:10.1371/journal.pone.0118652.
- [32] GOLDBERG T, CAI W J, PEPPA M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2004, 104(8): 1287-1291. DOI:10.1016/j.jada.2004.05.214.
- [33] 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 and Technology, 2018, 82: 32-45. DOI:10.1016/j.tifs.2018.09.020.
- [34] NURSTEN H E. The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications[M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005: 1-30. DOI:10.1039/9781847552570.
- [35] 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. DOI:10.1021/acs.jafc.0c07575.
- [36] 房红娟, 李红姣, 张双凤, 等. 加工条件对BSA-Glucose模拟体系中晚期糖基化末端产物形成的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 6-10.
- [37] ANNA M, JOANNA H, GRZEGORZ Ł, et al. Effect of drying parameters on the formation of early and intermediate stage products of the Maillard reaction in different plum (*Prunus domestica* L.) cultivars[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65(C): 932-938.
- [38] MIAKAR A, SPITELLER G. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1994, 1214(2): 209-220. DOI:10.1016/0005-2760(94)90046-9.
- [39] 安婧, 张琪, 于楠, 等. 市售鱼加工食品中3种晚期糖基化终末产物分析及与组分的相关性[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 15-21. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210725-294.
- [40] 刘慧琳, 陈晓默, 吴春玲, 等. 不同加工条件对模拟体系中晚期糖基化终产物生成的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(7): 96-100; 110. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2017.07.010.