

细胞膜固相色谱法筛查奶粉中 AGEs 特异结合成分

朱毛毛¹, 汪刚², 封亮^{2,*}

(1.南京市产品质量监督检验院, 江苏南京 210028;

2.中国药科大学中药学院, 江苏南京 211198)

摘要:采用细胞膜固相色谱技术检测食品中的晚期糖基化终产物。以含晚期糖基化终产物食品奶粉为研究对象, 借助细胞膜固相色谱技术和 HPLC-MS/MS 技术筛查其相应 AGEs 特异结合成分。结果表明: 羧甲基赖氨酸(CML)、羧乙基赖氨酸(CEL)和吡咯素(Pyr)这3个成分是奶粉中 AGEs 主要成分, 并测得奶粉样品中 CML 含量为 23.38~32.68 mg/(kg 样品); CEL 含量为 12.67~19.76 mg/(kg 样品); Pyr 含量为 84.56~97.36 mg/(kg 样品)。本方法操作简便、快速、特异性好, 可应用于食品中 AGEs 成分的筛查。

关键词:细胞膜固相色谱法, 晚期糖基化终产物, 奶粉, 检测

Screen of AGEs Specific Binding Components in Milk Powder by Cell Membrane Immobilized Chromatography

ZHU Mao-mao¹, WANG Gang², FENG Liang^{2,*}

(1.Nanjing Institute of Product Quality Inspection, Nanjing 210028, China;

2.College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: A method for the determination of advanced glycosylation end products in food was developed using cell membrane immobilized chromatography. The AGEs specific binding components of milk powder containing advanced glycosylation end products were screened by cell membrane immobilized chromatography and HPLC-MS/MS technology. The results showed that the three components of carboxymethyl-lysine, carboxyethyl-lysine and pyralline were the main components of AGEs in milk powder. The content of CML in the milk powder samples was 23.38~32.68 mg/(kg sample), and the content of CEL was 12.67~19.76 mg/(kg sample), and the content of Pyr was 84.56~97.36 mg/(kg sample). This method is simple, rapid and specific, and it is an effective method for the detection of advanced glycosylation end products in food.

Key words: cell membrane immobilized chromatography; advanced glycosylation end products; milk powder; detection

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)22-0257-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.22.045

引文格式: 朱毛毛, 汪刚, 封亮. 细胞膜固相色谱法筛查奶粉中 AGEs 特异结合成分[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 257-261, 269.

食品中的晚期糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)是还原糖和蛋白质、脂肪等通过美拉德反应形成的一类稳定的产物^[1], 常见于咖啡、可乐、巧克力、麦芽制品、浓缩乳或经热加工的乳制品以及肉类制品等食物中, 其含量受加工方式、加工温度、加工时间及其蛋白质、脂肪、碳水化合物、水分含量的共同影响^[2-4]。通过膳食摄入进入体内的过量 AGEs 具有一定的危害性, 可能诱发糖尿病、肾脏疾病、心血管疾病、免疫缺陷、衰老、炎症等多种疾病^[5-6]。AGEs 中的成分如羧甲基赖氨酸

(carboxymethyl-lysine, CML)、羧乙基赖氨酸(carboxyethyl-lysine, CEL)和吡咯素(pyralline, Pyr)、戊糖苷素、交联素等已被认为是食品中潜在的有害因子^[7]。AGEs 的种类繁多, 当前食品中 AGEs 的种类和含量国内报道较少, 国内外相关检测也仅限于以下两类 AGEs 检测方法^[8-9]: 免疫学检测法(ELISA法)与仪器检测法。

细胞膜固相色谱技术是在生命科学和色谱分离技术基础上交叉形成的一种新兴的色谱技术, 利用具有亲和作用的生物大分子, 研究与化学成分间特

收稿日期: 2018-02-05

作者简介: 朱毛毛(1981-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: 25666277@qq.com。

* 通讯作者: 封亮(1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 组分中药制剂及其物质基础和机制研究, E-mail: wenmoxiushi@163.com。

基金项目: 南京市质量技术监督局科技项目(kj2016018)。

异性的结合与分离^[10]。目前,已广泛应用于复杂体系中活性成分的筛选^[11]。血管内皮细胞上存在很多 AGEs 特异结合位点,即 RAGE 受体。AGEs 与 RAGE 结合后,启动多种信号转导途径,如炎症反应、凋亡反应等,诱导细胞因子的合成与释放,促进血管内皮功能紊乱,进而引起多种疾病的发生发展^[12]。这些病理改变与多种 AGEs 成分和细胞膜上受体相互作用有关,这为将细胞膜固相色谱技术应用到食品体系中 AGEs 成分的筛查提供了理论依据。本课题组前期采用人脐静脉内皮细胞与 AGEs 交联成分 MG-H1 共同孵育,通过解离技术和现代色谱 HPLC-DAD 方法,检测到 AGEs 成分 MG-H1 与细胞膜上受体特异性结合,结合率随孵育时间的延长而增加^[13]。

牛奶是最早在食品体系中发现食源性 AGEs 存在的食品^[14],而奶粉的生产过程中需要真空加热干燥,在这个过程中,由于牛奶受热易发生美拉德反应,近年来研究发现奶粉中含有 AGEs 成分^[15-17]。因此,本文以含晚期糖基化终产物食品奶粉为研究对象,借助细胞膜固相色谱技术和 HPLC-MS/MS 技术筛查奶粉中 AGEs 特异性成分,建立快速检测此类特异性化学成分的分析方法,以期对奶粉中 AGEs 的监测和控制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氨水、乙醇 分析纯,南京化学试剂股份有限公司;正己烷、十水合四硼酸钠、硼氢化钠 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;盐酸 分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司;柠檬酸 分析纯,广东汕头市西陇化工厂;甲醇、乙腈、三氟乙酸 色谱纯,美国 TEDIA 公司;实验室用水 Milli-Q 超纯水;DMEM 低糖培养基、胰蛋白酶(酶活 2.5×10^3 U/mg) 江苏凯基生物技术股份有限公司;胎牛血清 杭州四季青生物工程有限公司;奶粉 3 种不同厂家,南京市当地超市;CML 标准品(纯度 98%,CAS 号 5746-04-3)、CEL 标准品(纯度 96%,CAS 号 5746-03-2)、Pyr 标准品(纯度 98%,CAS 号 74509-14-1) 加拿大 TRC 公司。

Agilent 6495 LC/MS/MS 液相色谱质谱联用仪、Agilent ZORBAX SB C18(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m) 液相色谱柱 美国安捷伦公司;Strata-X-C 固相萃取柱 美国 phenomenex 公司;UGC-24M 氮吹仪 北京优晟联合科技有限公司;XB-80A 涡旋振荡器 海门其林贝尔有限公司;Milli-Q 纯水机 美国 Millipore 公司;Allegra 64R 台式高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司;Anke TDL-40B 型低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂;150i 全能型 CO₂ 培养箱 Thermo Electrom 公司;二级生物安全柜 美国 Labconco 公司;LDZX-50KB 立式压力蒸气灭菌器 上海申安医疗器械厂;HH-60 数显恒温搅拌循环水浴锅 国华电器有限责任公司;微量移液器 美国 Thermo 公司;XDS-1B 倒置显微镜 重庆光电仪器总公司;Mettler AL204 十万分之一天

平 梅特勒-托利多仪器有限公司;人脐静脉内皮细胞 江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 根据 Hegele 和 Assar 等^[18-19]的方法,并稍作修改,对奶粉样品进行前处理。称取 1 g 奶粉样品置于 50 mL 带盖耐热试管中,加入 10 mL 正己烷,充分涡旋 1 min,4000 r/min 离心 10 min,弃去正己烷层,重复上述正己烷脱脂过程 3 次,40 $^{\circ}$ C 氮吹至完全挥干正己烷。脱脂后,将样品中加入 10 mL 硼酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH9.2),涡旋混匀后,加入 1 mL 硼氢化钠溶液(2 mol/L,用 0.1 mol/L 氢氧化钠配制),混匀后 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 8 h 进行还原反应。根据 Folch 等^[20]方法,还原反应结束后加入 8 mL 三氯甲烷-甲醇(2:1, V: V)使蛋白质沉淀,于 5000 r/min 离心 10 min 后,弃去上清液。在沉淀物中加入 8 mL 6 mol/L 的盐酸溶液,置于 110 $^{\circ}$ C 烘箱中,酸解 24 h。将酸解样品取出并冷却至室温,用氮气将酸解液吹干,用超纯水再溶解后定容至 50 mL,然后用滤纸过滤并收集滤液。分别依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水洗净和活化 Strata-X-C 固相萃取柱(流速为 1 mL/min),取上述滤液过柱,依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗净杂质后(流速为 0.5 mL/min),用 5 mL 含体积分数 5% 氨水的甲醇溶液洗脱(流速为 0.5 mL/min),收集的洗脱液经氮吹浓缩至干。

1.2.2 溶液的配制 PBS 溶液的配制:氯化钠:8.0 g;氯化钾:0.2 g;磷酸氢二钠:3.49 g;磷酸二氢钾:0.2966 g。将上述试剂置于烧杯中,加入蒸馏水,玻璃棒搅拌,超声,至充分溶解,定容至 1 L,高温高压灭菌(121 $^{\circ}$ C, 103 kPa)后,分装后于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

奶粉 AGEs 提取液:取 5 mg 1.2.1 中固相萃取浓缩后的样品,溶解于 5 mL PBS 溶液中,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,备用。

解离液:10.948 g 磷酸氢二钠,12.911 g 柠檬酸,配成 1 L 溶液,过 0.22 μ m 微孔滤膜,备用。

1.2.3 细胞的培养 复苏:取保存在液氮中的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中,振荡,溶化后装入 15 mL 离心管中,加入含 100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素、10% 胎牛血清的不完全 DMEM(低糖)培养基 10 mL,37 $^{\circ}$ C、2000 r/min 下离心 2 min,吸去培养基。取得到的细胞悬液,加入 75 cm² 培养瓶中,另加入 4 mL 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% O₂ 培养箱中孵育。

换液:每隔 24 h 换一次培养基,吸去原培养基,加入 5 mL 新培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% O₂ 条件下孵育。

传代:细胞长至约 90% 融合度后,对细胞进行传代,吸弃原培养基,PBS 溶液(pH = 7.4)润洗 2~3 次,加入 0.25% 的胰酶 1 mL,消化 2 min 后,加入新培养基洗涤细胞,转移至 15 mL 离心管中,2000 r/min 下离心 2 min,吸弃培养基,再加入 1 mL 新培养基,移液枪吹打均匀,使用细胞计数板进行细胞计数。取 0.5 mL 细胞悬液,加入 75 cm² 培养瓶中,另加入 10 mL 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% O₂ 条件下

孵育。

1.2.4 细胞膜固相方法 细胞膜固相化奶粉中 AGEs 特异结合成分:取 1.2.3 传代后长满的大瓶细胞,使其贴壁正常生长,除去培养基,加入奶粉 AGEs 提取液,于 37 ℃、5% CO₂、95% O₂ 条件下孵育 60 min,取出孵育液,待测。

未结合成分的洗脱:用 PBS 洗涤细胞,弃去上清,反复洗涤,取最后一次 PBS 洗涤液,待测。

细胞膜固相化的奶粉中 AGEs 特异结合成分分解离:贴壁细胞随即加入解离液,于 37 ℃、5% CO₂、95% O₂ 条件下孵育 30 min,使细胞效应靶点失活,上清液为活性成分解离液,取出,待测。

检测样品的制备:取上述所得最后一次 PBS 洗涤液、内皮细胞膜解离液,另取空白解离液作为对照,所有样品氮气吹干。各样品中加入 0.8 mL 甲醇,涡旋 2 min,使其充分溶解,再次氮气吹干。加入 0.2 mL 甲醇复溶,涡旋 2 min,11000 r/min 离心 10 min。取上清过 0.22 μm 有机相滤膜,进行 HPLC-MS/MS 检测。

1.2.5 HPLC-MS/MS 鉴定奶粉中 AGEs 特异结合成分 色谱条件:Agilent ZORBAX SB C18 液相色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm);进样量 10 μL;流速为 0.5 mL/min;柱温:30 ℃;流动相 A 为含有 5 mmol/L 三氟乙酸的高纯水,流动相 B 为含有 5 mmol/L 三氟乙酸的乙腈,梯度洗脱条件:0~3 min, A:95%~88%;3~12 min, A 为 88%;12~25 min, A:88%~55%;25~26 min, 55%~95%;26~30 min, A:95%~95%。

质谱条件:电喷雾离子源 (ESI);正离子扫描模式;多反应监测模式 (MRM);驻留时间:500 ms;离子源温度:200 ℃;脱溶剂温度:380 ℃;脱溶剂气流速:500 L/h;锥孔气流速 50 L/h;进样锥电压 20 V;毛细管电压:3 kV;脱溶剂气和锥孔气为氮气,碰撞气体为氦气。

1.2.6 HPLC-MS/MS 测定奶粉中 AGEs 主要成分含量 采集市场上销售的三种厂家奶粉样品,同 1.2.1 样品前处理,收集的洗脱液经氮吹浓缩后,复溶于 1 mL 初始流动相溶液中,过 0.22 μm 微孔滤膜后,用于 HPLC-MS/MS 分析。

1.3 数据处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。

2 结果与分析

2.1 细胞膜固相色谱筛查出奶粉中 AGEs 特异结合成分鉴定结果

本实验采用奶粉 AGEs 提取液与人脐静脉内皮细胞共孵育 60 min, PBS 洗涤,排除未与细胞膜靶点结合的非活性成分后,加入解离液,使细胞膜靶点失活,解离人脐静脉内皮细胞膜上被结合的活性成分, HPLC-MS/MS 对解离液进行分析。发现 PBS 最后洗涤液与空白解离液均没有色谱峰出现,孵育后的解离液有 3 个色谱峰 (图 1)。结果表明,有 3 个成分为细胞膜固相活性产物,这 3 个物质可能是奶粉中 AGEs 主要成分。

3 个 AGEs 主要成分的质谱图如图 2~图 4。结合食品中已发现的 AGEs 化学成分的文献,综合分析

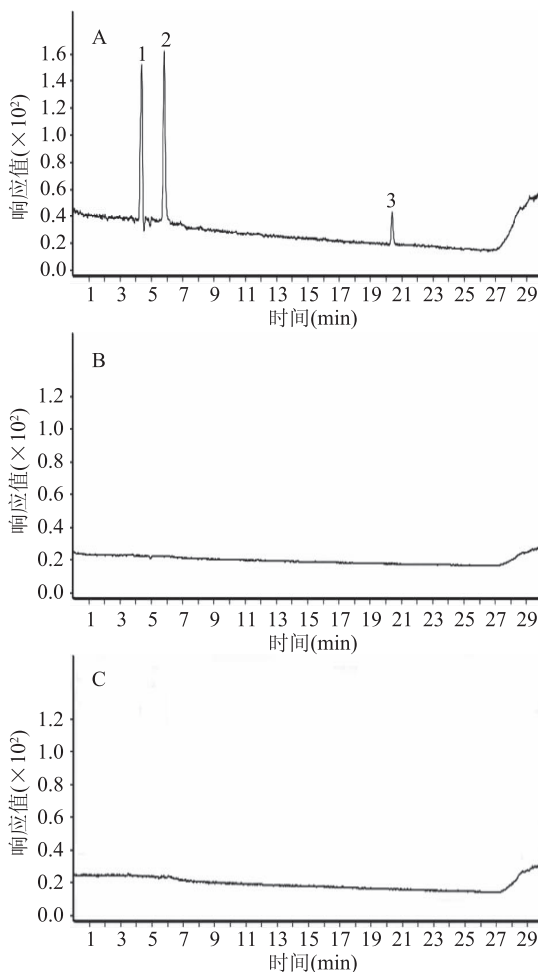


图1 细胞膜固相产物图谱

Fig.1 Chromatogram of the cell membrane immobilized incubation

注:A.内皮细胞膜解离液;B.PBS 最后洗涤液;C.空白解离液。

各化合物的色谱保留时间、相对分子质量、碎片离子信息以及相关文献数据,推测确定了 3 个化合物,分别为羧甲基赖氨酸 (carboxymethyl-lysine, CML)、羧乙基赖氨酸 (carboxyethyl-lysine, CEL) 和吡咯素 (pyralline, Pyr),见表 1,结构式见图 5。在正离子模式下,化合物 1 产生 m/z 205 分子离子峰,丢失甘氨酸 (75) 产生碎片离子 m/z 130,继而丢失甲酸 (46) 产生碎片离子 m/z 84,结合文献[21],推断化合物 1 为羧甲基赖氨酸。化合物 2 也表现出与化合物 1 类似的裂解行为,故参照化合物 1 的推导方法,结合文献,推断化合物 2 为羧乙基赖氨酸^[21]。化合物 3 产生 m/z 255 分子离子峰,丢失 1 分子 H₂O 产生碎片离子 m/z 237,再丢失 1 分子 H₂O 产生碎片离子 m/z 219,继而丢失 1 分子 CO₂ 产生碎片离子 m/z 175,再分别丢失 1 分子氨气 (17) 和 1 分子氰化氢 (27),产生碎片离子 m/z 158 和 m/z 148,结合文献[22]推断化合物 3 为吡咯素。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系、检出限和定量限 分别配制质量浓度为 10、50、100、200、400、800 ng/mL 的 CML、CEL 和 Pyr 混合标准溶液,进行 HPLC-MS/MS 检测。以

表1 HPLC-MS/MS 检测 HUVEC 细胞共孵育后 3 个成分特征碎片

Table 1 Characterizations of 3 components after incubation with HUVEC cells by HPLC-MS/MS

序号	tR (min)	母离子	电离模式	主要碎片离子 (m/z)	化合物
1	4.36	205	ESI +	130,84	羧甲基赖氨酸
2	5.89	219	ESI +	130,84	羧乙基赖氨酸
3	20.45	255	ESI +	237,175	吡咯素

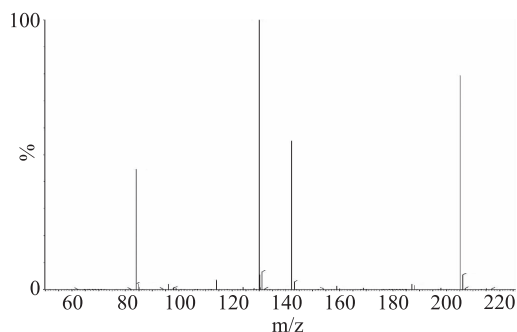


图2 细胞膜固相产物 1 的 MS 解析谱图

Fig.2 MS/MS fragments of compound 1

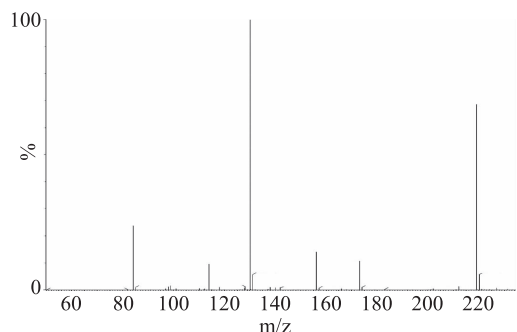


图3 细胞膜固相产物 2 的 MS 解析谱图

Fig.3 MS/MS fragments of compound 2

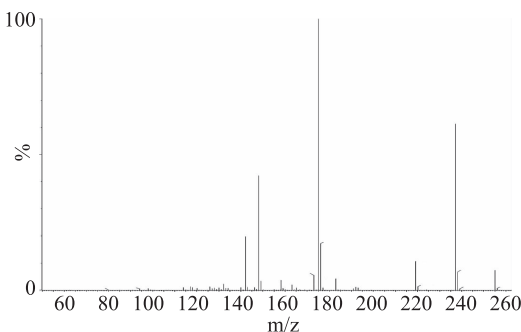


图4 细胞膜固相产物 3 的 MS 解析谱图

Fig.4 MS/MS fragments of compound 3

对照品进样质量浓度为横坐标(X),对照品色谱峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到各物质的线性回归方程,并对检出限和定量限进行验证。CML 线性回归方程为 $Y = 75.19X + 1444.57$, $R^2 = 0.9999$, CEL 线性回归方程为 $Y = 121.30X + 2019.26$, $R^2 = 0.9998$, Pyr 线性回归方程为 $Y = 27.71X + 458.61$, $R^2 = 0.9992$ 。CML、CEL 和 Pyr 的线性范围为 10 ~ 800 ng/mL,相关系数 R^2 均在 0.999 以上,线性关系良好。分别以信噪比(S/N) = 3 和信噪比(S/N) = 10,得到仪器的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。CML、CEL 检出限为 1 ng/mL,定量限为 5 ng/mL;Pyr

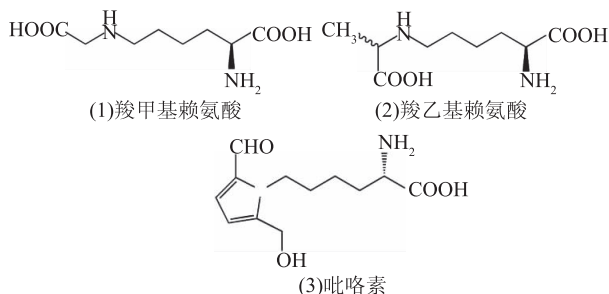


图5 细胞膜固相产物的结构式

Fig.5 The structures of 3 components after incubation with HUVEC cells

检出限为 3 ng/mL,定量限为 7 ng/mL。表明该方法具有较高的灵敏度。

2.2.2 加标回收率与精密度 向奶粉酸解液中加入 CML、CEL、Pyr 标准溶液,分别设置高、中、低三个加标量,使加标量分别为 50、100、200 ng/mL。由于未加标样品含有一定量的 CML、CEL、Pyr(即本底值),因此对未加标样品和加标样品均进行 HPLC-MS/MS 法分析测定,加标回收率(%) = (实测值 - 本底值) / 加标量 × 100,每个加标量平行测定 6 次($n = 6$)。结果见表 2,该方法对 CML 的回收率为 93.02% ~ 100.95% 之间,相对标准偏差(RSD)为 3.62% ~ 5.80%;对 CEL 的回收率为 93.80% ~ 102.62% 之间, RSD 为 2.34 ~ 8.97%;对 Pyr 的回收率为 92.38% ~ 100.71%, RSD 为 1.41% ~ 4.32%。可见该方法对 CML、CEL 和 Pyr 均具有良好的回收率和精密度,适合于奶粉类样品检测。

表2 CML、CEL 和 Pyr 加标回收率及相对标准偏差($n = 6$)Table 2 Spiked recoveries and RSDs of CML,CEL and Pyr($n = 6$)

待测成分	加标量 (ng/mL)	本底值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
CML	50		279.38	93.02	5.80
	100	232.87	328.81	95.94	3.62
	200		434.76	100.95	4.23
CEL	50		165.87	102.62	8.97
	100	114.56	208.36	93.80	2.34
	200		306.58	96.01	4.54
Pyr	50		591.53	92.38	1.41
	100	545.34	641.02	95.68	4.32
	200		746.76	100.71	2.87

2.3 奶粉中 CML、CEL 和 Pyr 含量的测定

采集市场上销售的三种厂家的奶粉样品,根据细胞膜固相筛查出的奶粉中主要 AGEs 成分和已经

建立的 HPLC-MS/MS 方法,对三种不同厂家奶粉中 CML、CEL 和 Pyr 含量进行测定,每个样品平行测定 3 次(n=3),结果见表 3。三种厂家奶粉样品 CML、CEL 和 Pyr 均有检出,几乎所有样品中 Pyr 含量最高,其含量范围为 84.56~97.36 mg/(kg 样品);其次是 CML,其含量范围为 23.38~32.68 mg/(kg 样品);CEL 含量最少;其含量范围为 12.67~19.76 mg/(kg 样品)。由表中数据可以看出,不同来源的奶粉样品中 AGEs 成分含量有所差异。奶粉的加工过程中需要进行真空干燥,不同的加热温度与加热时长会使得奶粉生产加工过程中美拉德反应的程度不同,因此晚期糖基化终产物生成量可能不同,致使不同厂家奶粉中 CML、CEL 和 Pyr 含量有所差异。

表 3 奶粉中结合态 CML、CEL 和 Pyr 含量(n=3)

Table 3 Contents of protein-bound CML, CEL and Pyr in milk powder(n=3)

样品	CML 含量 (mg/kg 样品)	CEL 含量 (mg/kg 样品)	Pyr 含量 (mg/kg 样品)
奶粉 1	26.45 ± 0.34	12.67 ± 1.09	84.56 ± 0.28
奶粉 2	23.38 ± 0.07	14.59 ± 0.87	89.64 ± 0.93
奶粉 3	32.68 ± 2.31	19.76 ± 0.04	97.36 ± 0.48

3 结论

本研究通过对奶粉 AGEs 提取液与血管内皮细胞固相化,发现奶粉中有 3 个物质为细胞膜固相活性产物,经鉴定,这些物质分别是 CML、CEL 和 Pyr,从而明确了奶粉中主要 AGEs 成分。利用建立的 HPLC-MS/MS 方法检测奶粉中 CML、CEL 和 Pyr 含量,CML、CEL 检出限为 1 ng/mL,定量限为 5 ng/mL, Pyr 检出限为 3 ng/mL,定量限为 7 ng/mL。该方法对 CML 的回收率为 93.02%~100.95% 之间,相对标准偏差(RSD)为 3.62%~5.80%;对 CEL 的回收率为 93.80%~102.62% 之间,RSD 为 2.34~8.97%;对 Pyr 的回收率为 92.38%~100.71%,RSD 为 1.41%~4.32%。通过对三种厂家的奶粉样品 CML、CEL 和 Pyr 含量进行测定,发现奶粉 AGEs 成分中 Pyr 含量最高,其次为 CML,CEL 含量最低。建立的细胞膜固相色谱法联合 HPLC-MS/MS 法成功地应用于奶粉中 AGEs 成分的筛查,具有操作简便、快速、特异性好等特点。因此,将细胞膜固相色谱技术首创性地引入到食品体系中 AGEs 成分的筛查,能有效的实施食品中具有潜在危害作用的 AGEs 成分快速检出,实现对食品直观有效的质量控制,具有重要的借鉴意义。

参考文献

[1] Bengmark S.Advanced glycation and lipoxidation end products - amplifiers of inflammation: The role of food[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition,2007,31(5):430-440.
[2] 蔡成岗,张慧,李赫,等.食品中高级糖基化终产物的研究进展[J].食品研究与开发,2013,34(24):280-282.
[3] 房红娟.食品加工过程中晚期糖基化末端产物形成及控制研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2013.
[4] 房红娟,王丽娟,张双凤,等.高蛋白食品加工模拟体系中

晚期糖基化末端产物的形成[J].中国食品学报,2014,14(2):28-34.
[5] Lin J A, Wu C H, Lu C C, et al. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression[J]. Molecular Nutrition and Food Research,2016,60(8):1850.
[6] 兰山,郑宗平,何志勇,等.食品体系中晚期糖基化终产物的研究进展[J].中成药,2013,35(9):1997-2000.
[7] 周燕琼,金成,张英.晚期糖基化终末产物(AGEs)形成途径、检测方法和抑制手段研究进展[J].中国食品学报,2013,13(6):175-184.
[8] Uribarri J, Woodruff S, Goodman S.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.
[9] Feng L, Zhu M M, Zhang M H, et al. N - Epsilon - (carboxymethyl)lysine is unable to induce endothelial dysfunction but is able to attenuate Ages - induced endothelium damage in human umbilical vein endothelial cells[J].Pharmazie,2013,68:251-256.
[10] 袁秉祥,林蓉,贺浪冲.细胞膜色谱—中药复杂体系的新药发现[J].中国药理通讯,2008,25(2):32.
[11] 朱建梁,黄丽妹,卜文婕,等.系膜细胞膜固相色谱法研究丹皮中的效应成分[J].安徽大学学报:自科版,2013,37(1):104-108.
[12] Thomas Kislinger, Caifeng Fu, Birgit Huber, et al. Nε - (Carboxymethyl) lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression[J].Journal of Biological Chemistry,1999,274(44):31740-31749.
[13] Feng L, Xu Y H, Wang S S, et al. Competitive binding between 4, 4' - diphenylmethane - bis (methyl) carbamate and RAGE ligand MG-H1 on human umbilical vein endothelial cell by cell membrane chromatography[J].Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2012,15(881-882):55-62.
[14] Hartkopf J, Pahlke C, Lüdemann G, et al. Determination of Nε-carboxy methyllysine by a reversed-phase high-performance liquid chromatography method[J].Journal of Chromatography A, 1994,672(1-2):242-246.
[15] Fenaille F, Parisod V, Visani P, et al.Modifications of milk constituents during processing:A preliminary benchmarking study [J].International Dairy Journal,2006,16(7):728-739.
[16] 刘慧琳,陈晓默,穆琳,等.HPLC-MS/MS 快速测定常见食品中羧甲基赖氨酸含量[J].食品研究与开发,2016,37(13):99-103.
[17] 黄娟,杨俊青,陈松润,等.HPLC 法测定婴幼儿配方乳粉中羧甲基赖氨酸[J].食品研究与开发,2016,37(3):175-177.
[18] Jörg Hegele, Timo Buetler, Thierry Delatour. Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein - bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products [J].Analytica Chimica Acta,2008,617(1):85-96.

(下转第 269 页)

- 社,1993.
- [2] 刘孟军,汪民.中国枣种质资源[M].北京:中国林业出版社,2009.
- [3] 薛晓芳,赵爱玲,王永康,等.不同枣品种果实矿质元素含量分析[J].山西农业科学,2016,44(6):741-745.
- [4] Rui Yu-kui, Shen Lin, Sheng Ji-ping. Contents of trace elements and heavy metals in Chinese Dong Jujube fruit[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(8): 1928-1930.
- [5] 匡立学,聂继云,李丛涛,等.辽宁省4种主要水果矿质元素含量及其膳食暴露评估[J].中国农业科学,2016,49(20):3993-4003.
- [6] Grzegorz I. The influence of harvest maturity and basic macroelement contents in fruit on the incidence of diseases and disorders after storage of the 'Ligol' apple cultivar[J]. Folia Hort, 2013, 25(1): 31-39.
- [7] 李高燕,孙昭倩,郭庆梅,等.4种大枣的营养成分分析[J].山东科学,2017,30(3):33-39.
- [8] 南海娟,马汉军,杨永慧.3种枣果中主要营养成分和元素比较[J].食品与发酵工业,2014,40(5):161-165.
- [9] Li JW, Fan L P, Ding S Detal. Nutritional composition of Chinese jujube[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 454-460.
- [10] 刘鑫.不同枣吊类型枣果实矿质元素变化规律研究[J].宁夏农林科技,2014,55(7):13-15.
- [11] 杨卫民,杜京旗,赵君.火焰原子吸收光谱法测定不同产地枣果中的矿质元素[J].江苏农业科学,2015,43(9):331-334.
- [12] 隋月红,刘丹,吴翠云,等.嫁接一年生红枣中微量元素含量的差异性研究[J].食品工业,2016,37(3):282-286.
- [13] 邢博,张霖,李杰庆,等.云南野生与栽培茯苓中矿质元素含量研究[J].食品工业科技,2016,37(24):360-379.
- [14] Kalac P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93: 209-218.
- [15] 巴依尔太,余志银,郭童童,等.新疆不同产地沙枣叶微量元素测定及主成分分析[J].化学试剂,2017,39(3):271-275.
- [16] 杨春宁,孙志蓉,曲继旭,等.基于主成分分析的天麻矿质元素综合评价研究[J].中医药导报,2016,22(20):52-61.
- [17] 袁园园,周玉碧,孙菁,等.基于 ICP-OES 对不同产地大白刺果实矿质元素的主成分分析[J].中国中药杂志,2017,42(12):2334-2338.
- [18] 孙景,张霖,赵艳丽,等.ICP-MS 法测定云南野生茯苓中矿质元素含量[J].食品科学,2016,37(14):68-73.
- [19] 熊冬华,李刚凤,杨天友,等.梵净山茶中18种矿物质元素的主成分、相关性和聚类分析[J].天然产物研究与开发,2017,29:1888-1894.
- [20] 全亮,冯一峰,熊仁次,等.生草栽培对枣园微域环境及土壤理化性状的影响[J].北方园艺,2016(9):183-187.
- [21] 柴仲平,王雪梅,孙霞,等.原子吸收光谱法测定新疆灰枣中微量元素含量[J].陕西农业科学,2012,22(1):54-55.
- [22] 赵智慧,周俊义.冬枣、临猗梨果实发育期 K、Ca、Fe、Zn 含量变化[J].河北农业大学学报,2006,29(5):20-23.
- [23] 李春燕,卢桂宾,刘和,等.枣树生长期果实主要矿质营养元素变化规律研究[J].山西林业科技,2010,39(3):25-28,46.
- [24] 翟宇鑫,陈军,李傲,等.ICP-AES 法测定南酸枣及其提取物中矿质元素含量[J].光谱学与光谱分析,2015,35(4):1052-1054.
- [25] Jiang Hui, Han Aizhi, Cai Yuqing, et al. Determination and clustering analysis of microelements and heavy metals in introduced varieties of jujube in Xinjiang[J]. Food Science, 2016, 37(6): 199-203.
- [26] 陈美静,刘倩雯,李雪妹,等.重金属胁迫与植物矿质元素交互作用的研究进展[J].湖北农业学,2016,55(6):2181-2189.
- [27] 匡立学,聂继云,李志霞,等.不同苹果品种果实矿质元素含量的因子分析和聚类分析[J].中国农业科学,2017,50(14):2807-2815.
- [28] 胡淳淳.石榴不同品种器官多酚、黄酮、矿质元素含量比较及抗氧化性评价[D].保定:河北农业大学,2010:1-7.
- [29] 卢新坤,卢艳清,林燕金,等.'琯溪蜜柚'及其芽变品种果实有机酸和矿质元素含量分析[J].中国果树,2017(2):46-48.
- [30] 宋苗语,王树芳,沈元月.草莓果实发育过程中矿质元素含量分析[J].北京农学院学报,2017,32(4):52-55.
- [31] 黄赛金,田润,欧苗,等.补气类中药矿质元素主成分分析和聚类分析研究[J].湖南工程学院学报,2016,26(3):69-72.
- [32] 郝变青,马利平,秦曙,等.苹果、梨、桃和枣4种水果5种重金属含量检测与分析[J].山西农业科学,2015,43(3):329-332,336.
- [33] 芮玉奎,申琳,生吉祥.冬枣果实中微量元素和重金属含量研究[J].光谱学与光谱分析,2008,28(8):1928-1930.
- [34] 叶秋明,李军,黄元财,等.15个水稻品种对镉的积累特性[J].浙江农业科学,2015,56(8):1156-1159.
- [35] 王琳,杜瑞英,王旭,等.不同品种稻米重金属富集差异研究[J].热带农业科学,2015,35(6):56-61.
- [36] 王民炎,王爱云,贺喜全,等.玉米品种 Cd 富集差异研究[J].土壤与作物,2016,5(4):248-254.
- [37] 沈欣,朱奇宏,朱捍华,等.农艺调控措施对水稻镉积累的影响及其机理研究[J].农业环境科学学报,2015,34(8):1449-1454.
- [21] Zhang G, Huang G, 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.
- [22] Hegele J, Parisod V, Richoz J, et al. Evaluating the extent of protein damage in dairy products [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1126: 300-306.

(上接第261页)

- [19] Assar S H, Moloney C, Lima M, et al. Determination of Nepsilon - (carboxymethyl) lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Amino Acids, 2009, 36(2): 317-326.
- [20] Folch J, Less M, Stanley G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226: 497-509.