

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240902001

引用格式: 黄子馨, 陶阳, 韩永斌, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定枇杷果膏中晚期糖基化终末产物和 5-羟甲基糠醛[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 169–175.

HUANG ZX, TAO Y, HAN YB, *et al.* Determination of advanced glycation end products and 5-hydroxymethylfurfural in loquat fruit paste by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 169–175. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱-串联质谱法测定枇杷果膏中晚期糖基化终末产物和 5-羟甲基糠醛

黄子馨^{1,2}, 陶阳¹, 韩永斌¹, 陆胜民^{1,2*}

(1. 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095; 2. 浙江省农业科学院食品科学研究所, 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 杭州 310021)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, HPLC-MS/MS)检测果膏中晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)和 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)的方法。**方法** 枇杷果膏以纯水浸提、超声处理后, 再经离心、固相萃取、氨水-甲醇溶液洗脱得到 AGEs 提取液, 以 0.1%甲酸水和甲醇为流动相, 梯度洗脱, 采用多反应监测正离子源模式检测; 果膏经纯水浸提、乙酸乙酯提取、固相萃取、10%甲醇洗脱得到 5-HMF 提取液, 以体积比 10%甲醇水为流动相, 在柱温 30 °C下检测。**结果** 3 种目标物在浓度范围内均线性关系良好; 检出限和定量限均小于 1 [AGEs/(ng/mL); 5-HMF/(μ g/mL)], 可满足痕量物质的检测要求; 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)均小于 10%, 且在 16 h 样品待测时间范围内低于 0.6%; 加标回收率均大于 85%。**结论** 本研究优化的方法可满足定量分析的基本要求, 具有良好的准确性和稳定性, 为热加工果蔬产品质量与安全研究提供了检测手段。

关键词: 枇杷果膏; 晚期糖基化终末产物; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱-串联质谱法; 高效液相色谱法

Determination of advanced glycation end products and 5-hydroxymethylfurfural in loquat fruit paste by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUANG Zi-Xin^{1,2}, TAO Yang¹, HAN Yong-Bin¹, LU Sheng-Min^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-Products, Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

收稿日期: 2024-09-02

基金项目: 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室资助项目(2021DG700024-ZZ202210); 浙江省“三农六方”科技协作计划项目(2021SNLF013)

第一作者: 黄子馨(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 3322175160@qq.com

*通信作者: 陆胜民(1969—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为果品加工质量与安全控制。E-mail: 1010508971@qq.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of advanced glycation end products (AGEs) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in loquat fruit paste by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** AGEs solution was obtained by extracting loquat fruit paste with pure water and treating with ultrasonic, centrifugation, solid-phase extraction and ammonia methanol solution elution, then separated by using gradient elution with 0.1% formic acid in water and methanol as the mobile phase. The detection method employed multi-reaction monitoring with positive ion. The 5-HMF solution was obtained by extracting the fruit paste in pure water, followed a liquid-liquid extraction with ethyl acetate, solid-phase extraction and 10% methanol elution. The extracts were analyzed at 30 °C with 10% methanol in water as mobile phase. **Results** It was found that the linearity of all the targets was good in the concentration range. The limits of detection and limits of quantification of each target substance were lower than 1 [AGEs/(ng/mL); 5-HMF/(μ g/mL)], which could fulfill the requirements of detecting trace substances. The relative standard deviations (RSDs) of all the substances were less than 10%, and lower than 0.6% in the range of 16 hours of sample waiting time. The recoveries of all the substances were higher than 85%. **Conclusion** Results indicate that the method meet the basic requirement for quantitative analysis and has good accuracy and stability, which offers a detection means of studying on quality and safety of heat-processed fruit and vegetables.

KEY WORDS: loquat fruit paste; advanced glycation end products; 5-hydroxymethylfurfural; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; high performance liquid chromatography

0 引言

枇杷肉质细腻、清甜可口, 含有多酚类、黄酮类、皂苷类、三萜类等化合物^[1], 具有抗炎、镇咳、止喘、化痰、抗肿瘤和增强机体免疫力等功效, 是一种食药同源型水果^[2]。枇杷果膏是一种由枇杷鲜果榨汁浓缩制成的口感酸甜、香气清新的膏状饮品, 具有润肺清热、化痰止咳的功效^[3]。果汁中含有的氨基酸、蛋白质等氨基化合物和还原糖等羰基化合物在高温浓缩过程中会发生美拉德反应和焦糖化反应, 在赋予果膏独特风味的同时, 也会产生甲基咪唑^[4]、晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs)^[5]、5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)^[6] 等热加工伴生危害物。AGEs 作为非酶蛋白质和脂质糖基化以及脂质氧化的终产物, 包括羧甲基赖氨酸 (N^{ϵ} -carboxymethyl-lysine, CML)、羧乙基赖氨酸 (N^{ϵ} -carboxyethyl-lysine, CEL)、吡咯素和戊糖素等。前二者是研究最为广泛的 AGEs, 通常被用作人体和食品中 AGEs 的标记物^[7-8]。研究表明, AGEs 的过度积累与机体炎症、动脉粥样硬化、神经退行性病变和糖尿病并发症的发生高度相关^[9-11]。此外, 摄入过多外源性 AGEs 会诱导产生内源性 AGEs^[12]。而 5-HMF 摄入体内会被代谢转换成具有毒性、致癌和致突变作用的 5-磺基氧甲基糠醛 (5-sulfooxymethylfurfural, 5-SMF)^[13]。5-SMF 的磺基是一种良好的离去基团, 它会加速 5-SMF 与 DNA 之间的亲核加成反应, 生成加合产物, 进而对人体健康造成威胁^[14]。

目前, 食品中 AGEs 的检测方法按照原理的不同可分

为荧光光谱分析法、免疫分析法和色谱-串联质谱法。其中, 荧光光谱分析法能检测具有荧光特性的 AGEs, 如戊糖素等, 方法简便易行, 但对缺乏荧光特性的 CML、CEL、吡咯素等的测定具有局限性。免疫分析法具有简便快速的优点, 但现有的研究表明该法更适用于 AGEs 含量较高的液体样品的测定^[15], 对食品样品的检测不具备普适性, 且食品基质中的脂质和淀粉等都会对检测结果造成影响^[16]。食品中 5-HMF 最常用的检测方法包括分光光度法^[17-18]、高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, HPLC-MS/MS)^[19-20] 和气相色谱-质谱法^[21]。与色谱法相比, 分光光度法具有成本低、时间短、操作简单的优势, 但色谱分析法的选择性更好, 检测灵敏度更高, 更适用于痕量样品的检测。

目前国内外有关 AGEs 的检测大多集中于鱼、肉、烘焙食品、调味品、咖啡、奶制品等产品, 而对于果膏、果酱、浓缩果汁等水果制品中 AGEs 和 5-HMF 的检测研究较少, 方法仍不完善。本研究拟建立枇杷果膏中 AGEs 和 5-HMF 的提取、分离、纯化及检测方法, 为开展热浓缩型或干制果蔬制品中 AGEs 和 5-HMF 的分析测定提供参考, 满足产品质量与安全管理需要。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

大红袍枇杷: 浙江省杭州市临平区塘栖镇枇杷基地提供。

纤维素酶 (30000 U/g)、果胶酶 (20000 U/g) (河南万邦化

工科技有限公司); 白砂糖(太古糖业有限公司); 5-HMF(色谱纯, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 甲醇(色谱纯, 纯度 $\geq 99.9\%$)、氨水(25%~28%)(上海麦克林生化科技股份有限公司); 乙酸乙酯(色谱纯, 纯度 $\geq 99.0\%$, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲酸(色谱纯, 纯度 $\geq 99.0\%$, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); CML(纯度 $\geq 97.0\%$)、CEL(纯度 $\geq 96.0\%$)(加拿大 TRC 公司)。

FE28 pH 计、Quick-Brix 90 手持式折光仪(Mettler Toledo 仪器上海有限公司); DK-500S 型水浴锅(上海精宏试验设备有限公司); JYZ-V907 榨汁机(九阳股份有限公司); C21-L85 电磁灶(杭州九阳生活电器有限公司); KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MCX、HLB 固相萃取(solid phase extraction, SPE)小柱(常德比克曼生物科技有限公司); SHZ-D(III)循环水式多用真空泵(上海秋佐科学仪器有限公司); MD200-1 氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司); 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤器(杭州欧翼仪器设备有限公司); 0.22 μm 有机系微孔滤膜过滤器(兰杰柯科技有限公司); 1 mL 无菌注射器(镇江康利医疗器械有限公司); Megafuge 11R 台式离心机(Thermo Fisher Scientific 中国有限公司); XH-C 旋涡混合器、LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); Sun Fire C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); FA1004N 万分之一电子分析天平(常州幸运电子有限公司); SCIEX 5500+高效液相三重四级杆串联质谱仪(美国 SCIEX 公司); Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 3 mm, 1.8 μm , 美国 Agilent 科技公司); NDJ-79A 旋转粘度计(上海昌吉地质仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取 1.0 mg CML、CEL 标准品, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入纯水定容, 配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, 于 $-19\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。检测时用纯水稀释标准溶液, 配制成不同浓度的 CML、CEL 标准工作液。准确称取 10.0 mg 5-HMF 标准品, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入纯水定容, 配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。检测时取出在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 缓慢解冻, 用纯水稀释标准溶液, 配制成不同浓度的 5-HMF 标准工作液(保持 $4\text{ }^\circ\text{C}$)。

1.2.2 检测方法

(1) HPLC-MS/MS 检测

色谱条件: 色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 3 mm, 1.8 μm); 柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量设置为 1~3 μL ; 流动相为 0.1%甲酸水(A)和甲醇(B); 流速设置为 0.15~0.40 mL/min。梯度洗脱程序为: 0~1.0 min, 95% A; 1.0~4.0 min, 95%~10% A; 4.0~6.0 min, 10% A; 6.0~6.1 min,

10%~95% A; 6.1~8.0 min, 95% A。质谱条件: 离子源模式: 电喷雾离子源正离子(electro spray ionization, ESI+); 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 干燥气温度 $350\text{ }^\circ\text{C}$; 干燥气流速 10 L/min; 喷雾器压力 25 psi; 鞘气温度 $300\text{ }^\circ\text{C}$; 鞘气流速 9 L/min; 毛细管电压 3500 V; 喷嘴电压 400 V; CML、CEL 的碰撞能量分别为 25 V 和 32 V; CML、CEL 的定量离子分别是 m/z 205.1 \rightarrow 84.1 和 m/z 219.2 \rightarrow 84。

(2) HPLC 检测

色谱柱: Sun Fire C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 检测器: 二极管阵列检测器(photo-diode array detector, PAD); 检测波长 285 nm; 流动相: 甲醇:水=10:90 (V:V); 流速为 0.5~1.5 mL/min; 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量为 5~20 μL 。

1.2.3 样品制备

参照严燕^[22]、李红梅等^[23]的方法制备果膏(图 1)。挑选无机械损伤、无病虫害的枇杷鲜果, 清洗干净并沥干水分, 去除果核和果柄, 以榨汁机榨汁。用 0.2%复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:3, m:m)在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴处理果浆 60 min。酶解后用 100 目滤布过滤 2~3 遍, 以无肉眼可见果渣为标准。过滤后的枇杷果汁转入不锈钢锅中, 电磁炉加热至沸腾后换小火慢熬, 当果汁体积浓缩至原体积的 2/3 时加入 10% 白砂糖(以过滤后果汁质量计)继续熬制。熬制过程中需缓慢连续搅拌, 以防糊锅。浓度每升高 5°Brix , 采用旋转粘度计在室温下测定经浓缩后得到的枇杷果膏所对应的黏度, 观察浓缩过程中枇杷果膏的黏度随糖度值变化的趋势, 找出枇杷果膏黏度突变点。此时枇杷果膏达到浓缩终点, 用玻璃瓶(使用前沸水浴 15 min, 烘干备用)灌装。灌装后在沸水浴中保持 3 min 以灭菌, 放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。制备 3 个平行样品。

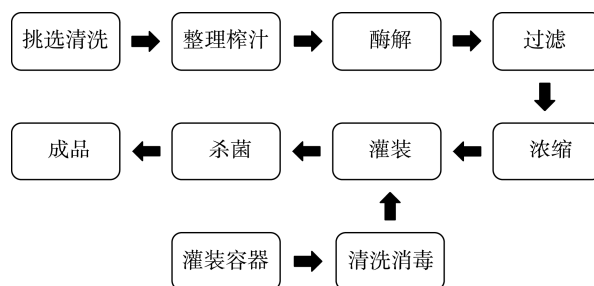


图 1 枇杷果膏制备工艺流程图

Fig.1 Process flowchart for preparing loquat fruit paste

1.2.4 枇杷果膏样品前处理

(1) CML、CEL SPE 方法优化

精确称取 1 g 枇杷果膏样品于 10 mL 离心管中, 加入 8 mL 纯水进行浸提, 使用旋涡仪振荡 30 s 充分混匀后静置 10 min, 超声(200 W)处理 10 min。提取液于 7000 r/min、

4 °C下离心 10 min。取上清液上样过柱[选用 60 mg、3 mL 的 MCX SPE 小柱,依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 纯水活化平衡],弃去流出液,用 9 mL 纯水分 3 次过柱淋洗,弃去淋洗液。分别用 9 mL 含有 0%、5%、10%、15%、20%氨水的氨水-甲醇溶液分 3 次洗脱,用 15 mL 离心管收集洗脱液,氮吹至干,用 2 mL 纯水复溶,涡旋 30 s 混匀,过 0.22 μm 水系微孔滤膜,进行 HPLC-MS/MS 检测。

(2) 5-HMF 液液萃取方法优化

对 MACDONALD 等^[24]的方法进行优化,并按照优化后的方法对枇杷果膏进行前处理。精确称取 1 g 枇杷果膏样品于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 纯水进行浸提,使用旋涡仪振荡 30 s 充分混匀后静置 10 min。转移至 60 mL 分液漏斗中,分别以液液比=1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0 的比例加入乙酸乙酯进行萃取。萃取过程重复 3 次,弃去水相,收集全部有机相,转移至 100 mL 圆底烧瓶,使用旋转蒸发仪于 50 °C下旋蒸至干,加入 10 mL 10%甲醇水复溶。收集至 15 mL 离心管,涡旋 30 s 混匀,使用 HLB SPE 柱(60 mg、3 mL)纯化富集:首先分别使用 3 mL 甲醇和 3 mL 纯水活化平衡 HLB 柱;再将复溶后溶液过柱,弃去流出液;然后用 9 mL 纯水分 3 次淋洗,弃去淋洗液;最后用 10 mL 10%甲醇水溶液洗脱,收集洗脱液。洗脱液过 0.22 μm 水系微孔滤膜,进行 HPLC 检测。

1.2.5 方法学验证

(1) 线性关系

稀释标准储备液,配制质量浓度在 5、10、25、50、100、250、500、1000、1500、2000、2500 ng/mL 的 CML 和 CEL 混合标准溶液以及 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2.00、2.50、5.00 μg/mL 的 5-HMF 标准溶液。过 0.22 μm 水系滤膜后按照 1.2.2 所述方法上样测定。实验重复 3 次。分别计算标准品响应强度下的积分面积。以标准品的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归分析,从而可计算样液中目标物质的含量。

(2) 检出限和定量限

将标准品溶液逐级降低浓度后进样,根据信噪比 $S/N=3:1$ 确定检出限(limit of detection, LOD),10 倍信噪比 ($S/N=10$) 所对应的标准品浓度作为定量限(limit of quantification, LOQ),AGEs 和 5-HMF 的单位分别为 ng/mL 和 μg/mL。

(3) 精密度和稳定性

为考察方法的准确度和重现性,需对其精密度进行测定。取标准溶液在同一天内连续进样 6 次,记录其数据,用所得相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示其日内精密度;对同一标准溶液连续 5 d 测定其峰面积,所得 RSD 即为其日间精密度。取同一供试标准溶液分别于放置 0、2、4、6、8、10、12、14、16 h 后测定,记录数据,根据该组数据的 RSD 值来判断该方法在样品处理后的

待测时间范围内的稳定程度。

(4) 加标回收率

准确称取 0.5 g 枇杷果膏样品 9 份,分别加入低、中、高 3 个不同浓度水平的标准溶液,按照 1.2.4 的方法对样品进行前处理,并按 1.2.2 的方法测定目标物质的含量。以不加标的样品为对照,加标样品测定值减去对照组测定值,再除以加标量,乘 100 即为该方法的加标回收率。

以上所有实验均进行 3 次平行操作。

1.3 数据处理

使用 Microsoft Office Excel 2016 处理实验数据,IBM SPSS Statistics 26 进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)分析,事后多重比较采用 Duncan 法, $P<0.05$ 定义为显著水平,用 Origin 2021(美国 OriginLab 公司)作图。

2 结果与分析

2.1 检测方法优化

2.1.1 进样量的选择

对于 CML、CEL,在进样量分别为 1、2、3 μL 的条件下,观察两峰的保留时间、分离情况以及信号响应值高低。结果发现,随着进样量的增加,色谱峰响应值也升高。当进样量为 1 μL 时,色谱峰存在拖尾现象,而进样量为 3 μL 时,两色谱峰存在部分重叠,分离效果较差。进样量为 2 μL 时,两峰面积与进样量为 3 μL 时接近,且峰形对称,故选择 CML、CEL 进样量为 2 μL。

对于 5-HMF,在进样量为 5、10、20 μL 的条件下,色谱峰响应值也随着进样量增加而增加。当进样量为 10 μL 时,色谱峰峰形尖锐易于积分,响应值适中,而进样量 5 μL 时,难以区分目标峰和杂质峰;进样量 20 μL 时,峰形反而不如进样量为 10 μL 时的好且浪费标准品。综合考虑,选择 5-HMF 的进样量为 10 μL。

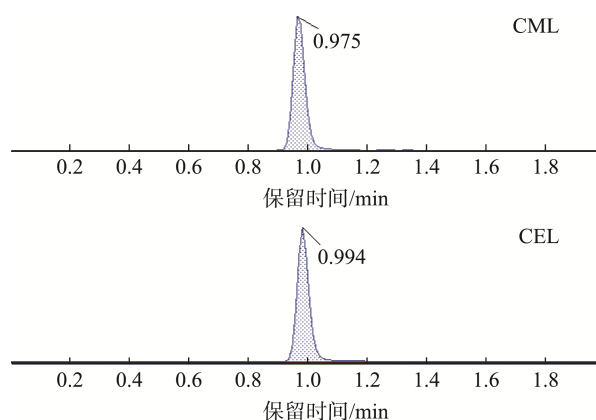
2.1.2 流动相流速的选择

在流速分别为 0.15、0.25、0.40 mL/min 条件下,考察 CML、CEL 物质峰的分离程度和响应情况。结果发现当流速为 0.15 mL/min 时,保留时间长,两峰分离效果较差,且响应值较流速为 0.25 和 0.40 mL/min 时的低;当流速为 0.25 mL/min 时,两峰存在一定的分离度,但考虑到食品基质的复杂性,在实际检测过程中会存在一定的基质干扰,故在二者峰面积相近的情况下,选择分离度更高的流速(0.40 mL/min)。

在流速分别为 0.50、1.00、1.50 mL/min 条件下,考察 5-HMF 目标峰的峰形和响应情况。结果发现,当流速为 0.50 mL/min 时,未检测到明显的色谱峰;随着流速的增大,目标峰的保留时间会缩短,但同时也会使色谱柱压力增大,进而降低色谱柱的使用寿命。当流速为 1.00 mL/min 时,峰形对称,尖锐狭窄,便于对峰面积进行积分。LEE 等^[25]采

用高效液相色谱法测定市售果汁中 5-HMF 含量,选择流速为 0.80 mL/min 时的 LOD 和 LOQ 分别为 0.46 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.40 $\mu\text{g/mL}$,均高于本研究中 5-HMF 测定方法的 LOD 和 LOQ (0.01 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.04 $\mu\text{g/mL}$)。综合考虑,选择流速为 1.00 mL/min。

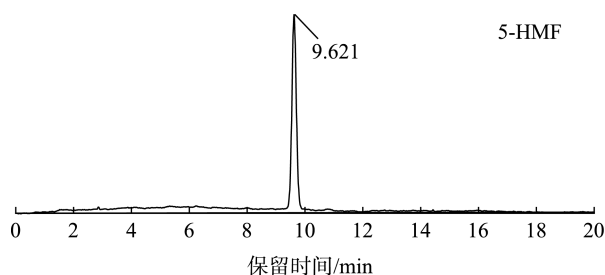
优化后 AGEs 的 HPLC-MS/MS 色谱图和 5-HMF 的 HPLC 色谱图分别见图 2 和图 3。



注: 流速 0.40 mL/min, 进样量 2 μL 。

图 2 AGEs 的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig.2 HPLC-MS/MS chromatograms of AGEs



注: 流速 1.00 mL/min, 进样量 10 μL 。

图 3 5-HMF 的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of 5-HMF

2.2 前处理条件优化

食品样品基质复杂多样,在样品的前处理过程中,应尽量消除其复杂成分带来的基体效应,降低检测过程中的基质干扰以及富集组分带来的离子抑制作用,以提高检测的准确性和可信度。因此,本研究对枇杷果膏样品进行前处理优化,以提高痕量危害物的检测准确性。

2.2.1 SPE 条件优化

AGEs 是羰基化合物和氨基化合物发生羰氨反应的产物。果品中游离氨基酸和蛋白质含量较肉品、烘焙食品少,AGEs 含量低,仅以 ng/mL 计,且果膏样品基质复杂,杂质干扰大。SPE 的原理是使样液流经吸附剂时,被测物质被保留在吸附剂中,用溶液淋洗可除去吸附剂中的杂质,而被测组分被富集,再以另一溶液将其洗脱下来,即可有效降低复杂基质带来的基体效应,减少基质噪声对检测结果的不良影响。CML 和 CEL 是强极性的两性离子化合物。MCX SPE 小柱填料是在高度交联的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物表面键合磺酸基团的混合型强阳离子吸附剂,能同时截留干扰物和选择性离子交换截留 AGEs,最后通过离子交换置换出吸附剂中的 AGEs^[26-27]。研究表明,它比表面积大,离子交换容量大,吸附效率高,具有反向和阳离子交换两种性能,对样品中 AGEs 具有较高的回收率^[28]。本研究对 MCX SPE 小柱洗脱液比例进行优化,并对样品中 AGEs 含量进行测定。

如图 4 所示,随着洗脱液中氨水浓度增加,目标物响应值均呈现先升高后下降的趋势。这表明氨水-甲醇的组合使用可以破坏目标物与吸附剂之间的库仑力和非极性相互作用,但过高浓度的氨水会改变吸附体系的酸碱性,从而对洗脱效果产生影响,导致洗脱不彻底^[29]。其中 CML(图 4A)的检测值在氨水洗脱液浓度为 5% 时达到峰值,而 CEL(图 4B)的检测值在氨水浓度为 10% 时达到顶峰。值得注意的是,当氨水浓度分别为 5% 和 10% 时,CML 含量相差不多。综合考虑,最终选用 10% 氨水-甲醇洗脱液。在该条件下,枇杷果膏中的 CML 和 CEL 含量分别测得为 3.87 $\mu\text{g/kg}$ 和 31.09 $\mu\text{g/kg}$ 。

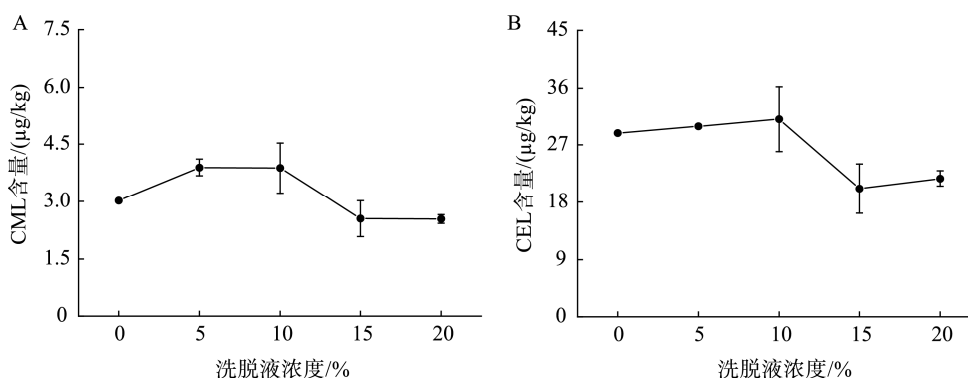


图 4 洗脱液浓度对 SPE 枇杷果膏中 AGEs 含量的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of eluent concentration on content of AGEs extracted by SPE from loquat fruit paste ($n=3$)

2.2.2 液液萃取条件优化

HLB SPE 小柱采用的吸附剂是一种具有强吸附能力和高回收率的大孔共聚物,可分为亲水性的 N-乙烯基吡咯烷酮和疏水性的二乙烯基苯,前者可保留极性化合物,而后者保留非极性化合物, pH 适用范围广。本研究采用乙酸乙酯液液萃取串联 HLB SPE 的方法对样品进行前处理,富集净化 5-HMF 组分,以便测定其含量。

如图 5 所示,随着萃取溶剂比例的升高,5-HMF 萃取效率均不断升高,且 5-HMF 含量在样液:萃取液=1:2.5 (V:V) 时达到峰值。这表明乙酸乙酯的大量存在会增加 5-HMF 向其相扩散的动力^[30]。考虑到避免试剂浪费、降低实验成本的原则,选择 1:2.0 (V:V) 的液液萃取比例。在该条件下,枇杷果膏中的 5-HMF 含量测得为 6.13 mg/kg。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系

以 3 种危害物标准品的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别绘制标准曲线并进行线性回归分析。结果如

表 1 3 种危害物的线性范围、线性回归方程和相关系数(r^2)

Table 1 Linear ranges, linear regression equations and correlation coefficients (r^2) of 3 kinds of hazardous substances

危害物	线性范围	回归方程	r^2
CML	5.00~2500.00 ng/mL	$Y=3579.76508X+1583.81934$	0.99999
CEL	5.00~2500.00 ng/mL	$Y=5226.58057X-672.78032$	0.99928
5-HMF	0.25~5.00 $\mu\text{g/mL}$	$Y=15301.9X$	0.99910

2.3.2 LOD 和 LOQ

根据信噪比 $S/N=3:1$ 和 $S/N=10:1$ 确定了所有目标物质的 LOD 和 LOQ。其中 CML、CEL、5-HMF 的 LOD 分别为 0.159 ng/mL、0.113 ng/mL 和 0.010 $\mu\text{g/mL}$; LOQ 分别为 0.531 ng/mL、0.378 ng/mL 和 0.040 $\mu\text{g/mL}$ (表 2)。所有目标物质的 LOD 和 LOQ 值均小于 1 [AGEs/(ng/mL); 5-HMF/($\mu\text{g/mL}$)], 这反映该检测方法具有较灵敏的痕量物质定量检测能力。

表 2 3 种危害物的 LODs 和 LOQs ($n=3$)
Table 2 LOD and LOQ of 3 kinds of hazardous substances ($n=3$)

危害物	LODs	LOQs
CML	0.159 ng/mL	0.531 ng/mL
CEL	0.113 ng/mL	0.378 ng/mL
5-HMF	0.010 $\mu\text{g/mL}$	0.040 $\mu\text{g/mL}$

2.3.3 精密度和稳定性

CML 的稳定性为 0.58%, 日内精密密度为 8.72%, 日间精密密度为 8.91%; CEL 稳定性为 0.33%, 日内精密密度为 5.62%, 日间精密密度为 6.79%; 5-HMF 稳定性为 0.45%, 日内精密密度 2.94%, 日间精密密度 8.79%。所有物质的 RSDs 均小于 10%, 且在 16 h 样品待测时间范围内低于 0.6%, 说明

表 1 所示, 相关系数(r^2)均大于 0.999, 这表明所有目标物在浓度范围内均线性关系良好。

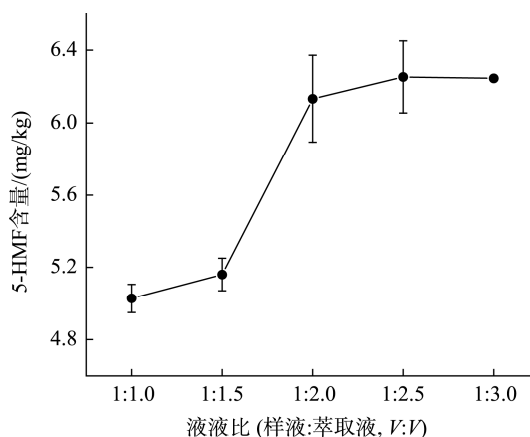


图 5 液液比对固液萃取枇杷果膏中 5-HMF 的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of solution ratio of sample to extractant on content of 5-HMF extracted by solid-liquid extraction from loquat fruit paste ($n=3$)

该方法具有良好的准确性和稳定性。

2.3.4 加标回收率

所有物质的加标回收率均大于 85%, 说明该方法可满足定量分析的基本要求。

3 结论

本研究建立了枇杷果膏中 AGEs 和 5-HMF 的提取、分离纯化与检测分析方法, 分别采用 HPLC-MS/MS 和 HPLC 分析, 研究了不同检测参数及前处理方法对 AGEs 和 5-HMF 检测效果的影响。方法学验证表明, 3 种目标物在浓度范围内均线性关系良好。CML、CEL、5-HMF 的 LOQ 分别为 0.531 ng/mL、0.378 ng/mL 和 0.040 $\mu\text{g/mL}$, 可满足检测痕量物质的检测要求, 且具有良好的准确性和稳定性, 能满足定量分析的基本要求。下一步将本方法应用于更多果蔬制品中 AGEs 和 5-HMF 含量的检测, 扩大其样本容量, 验证该方法的广泛适用性, 为后续果蔬制品中 AGEs 和 5-HMF 形成影响因素及其控制研究奠定基础, 以保障公众对果蔬浓缩制品和干制品质量与安全状况的知情权和对营养健康食品的需求。

参考文献

- [1] 王锦涛, 鲁周民, 陈贤爽, 等. 基于抗氧化活性分析的枇杷干制工艺优

- 化[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 81–86.
- WANG JT, RU ZM, CHEN XS, *et al.* Drying optimization of loquat fruit based on analysis of antioxidant activity [J]. Food Science, 2016, 37(24): 81–86.
- [2] 魏爱红, 李晓虹, 曾煌, 等. 枇杷抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性部位的筛选及其酶动力学[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 53–59.
- WEI AIH, LI XH, ZENG H, *et al.* Screening of effective fraction from *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl with inhibiting activity against α -glucosidase and α -amylase and its inhibition kinetics [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 53–59.
- [3] 隋晶晶, 王素丽, 叶毅, 等. 蜜炼川贝枇杷膏体外抗甲型H1N1流感病毒的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 158–162.
- SUI JJ, WANG SL, YE Y, *et al.* *In vitro* study on anti-influenza virus (H1N1) activities of Millian Chuanbei Pipa Gao [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 36(2): 158–162.
- [4] NADER A, HAMED S, MAHDI J, *et al.* 4-Methylimidazole, a carcinogenic component in food, amount, methods used for measurement; a systematic review [J]. Food Chemistry: X, 2023, 18: 100739.
- [5] LIU YX, LIU C, HUANG XS, *et al.* Exploring the role of Maillard reaction and lipid oxidation in the advanced glycation end products of batter-coated meat products during frying [J]. Food Research International, 2024, 178: 113901.
- [6] IŞIL GA, VURAL G. Investigations on the formation of α -dicarbonyl compounds and 5-hydroxymethylfurfural in fruit products during storage: New insights into the role of Maillard reaction [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130280.
- [7] EGGEN MD, GLOMB MA. 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.
- [8] ZAWADA A, MACHOWIAK A, RYCHTER AM, *et al.* Accumulation of advanced glycation end-products in the body and dietary habits [J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3982.
- [9] AHMAD S, AL-SHAGHDALI K, REHMAN S, *et al.* Nonenzymatic glycosylation of isolated human immunoglobulin-G by D-ribose [J]. Cell Biochemistry and Function, 2022, 40(5): 526–534.
- [10] DENG Y, WIERENGA PA, SCHOLS HA, *et al.* Effect of Maillard induced glycation on protein hydrolysis by lysine/arginine and non-lysine/arginine specific proteases [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69: 210–219.
- [11] WU YK, SHI AY, LI WH, *et al.* The metabolism and transformation of casein-bound lactulosyllysine *in vivo*: Promoting dicarbonyl stress and the formation of advanced glycation end products accompanied by systemic inflammation [J]. Food Chemistry, 2024, 444: 138681.
- [12] TWARDA-CLAPA A, OLCZAK A, BIAŁKOWSKA AM, *et al.* Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs [J]. Cells, 2022, 11(8): 1312.
- [13] NADIYA B, BERNHARD M, HEINZ F, *et al.* Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfoxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural [J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 78(4): 414–419.
- [14] MONIEN BH, FRANK H, SEIDEL A, *et al.* Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse *in vivo* [J]. Chemical Research in Toxicology, 2009, 22(6): 1123–1128.
- [15] GÓMEZ-OJEDA A, JARAMILLO O, WROBEL K, *et al.* Comparative evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-IT-MS/MS for the analysis of N(epsilon)-carboxymethyl lysine in food samples [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 11–18.
- [16] NIU LH, SUN XH, TANG JM, *et al.* Free and protein-bound N^ε-carboxymethyllysine and N^ε-carboxyethyllysine in fish muscle: Biological variation and effects of heat treatment [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 57: 56–63.
- [17] GÜRKAN R, ALTUNAY N. Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 42: 141–151.
- [18] DAĞDEVİREN BS, GÜRKAN R. Selective extraction and enrichment of 5-hydroxymethylfurfural from honey, molasses, jam and vinegar samples prior to sensitive determination by micro-volume UV-vis spectrophotometry [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 95: 103664.
- [19] CACCIOLA F, RIGANO F, DUGO P, *et al.* Comprehensive two-dimensional liquid chromatography as a powerful tool for the analysis of food and food products [J]. Trac-Trend in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115894.
- [20] WEI SY, YANG X, LIN MY, *et al.* Development of a two-step pretreatment and UPLC-MS/MS-based method for simultaneous determination of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural, advanced glycation end products and heterocyclic amines in thermally processed foods [J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136726.
- [21] LEE CH, CHEN KT, LIN J, *et al.* Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods [J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 93: 271–280.
- [22] 严燕. 枇杷膏加工工艺及其抗氧化特性的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- YAN Y. Study on the processing technology and oxidation characteristics of loquat paste [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [23] 李红梅, 陆胜民, 郑美瑜, 等. 浙江2个主栽枇杷品种加工果膏的品质性状比较[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(10): 2277–2285.
- LI HM, LU SM, ZHENG MY, *et al.* Comparison on qualitative characters of fruit paste processed using two main loquat varieties cultivated in Zhejiang Province, China [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(10): 2277–2285.
- [24] MACDONALD S, LONG M, GILBERT J, *et al.* Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study [J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(6): 1387–1394.
- [25] LEE TP, SAKAI R, MANAF NA, *et al.* High-performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia [J]. Food Control, 2014, 38: 142–149.
- [26] LI MY, ZHANG CJ, WANG ZY, *et al.* Simultaneous determination of advanced glycation end products and heterocyclic amines in roast/grilled meat by UPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2024, 447: 138930.
- [27] 周海鹏, 岳振峰, 赵凤娟. 兽药残留检测技术最新进展[J]. 食品科技, 2023, 48(12): 281–289.
- ZHOU HP, YUE ZF, ZHAO FJ. The latest development of veterinary drug residues detection technology [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(12): 281–289.
- [28] CHEN Q, LI Y, DONG LZ, *et al.* Quantitative determination of N^ε-(carboxymethyl)lysine in sterilized milk by isotope dilution UPLC-MS/MS method without derivatization and ion pair reagents [J]. Food Chemistry, 2022, 385: 132697.
- [29] 刘慧琳, 穆琳, 陈晓默, 等. 固相萃取-高效液相色谱法检测食品中吡咯素的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 90–93, 102.
- LIU HL, MU L, CHEN XM, *et al.* Determination of trace pyrrolidine in food samples using solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 90–93, 102.
- [30] BARROSO TLCT, SGANZERLA WG, CASTRO LEN, *et al.* Removal of 5-hydroxymethylfurfural from brewer's spent grains hydrolysates obtained by subcritical water hydrolysis: An approach using liquid-liquid extraction [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2023, 201: 106004.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)