



2024年第二十一届肉类科技大会

烤肉中晚期糖基化终末产物 (AGEs) 和杂环胺 (HAs) 的同时定量检测

汇报人：李明宇

导 师：张德权 研究员

中国农业科学院农产品加工研究所

2024年8月16日 宁夏·银川

目 录

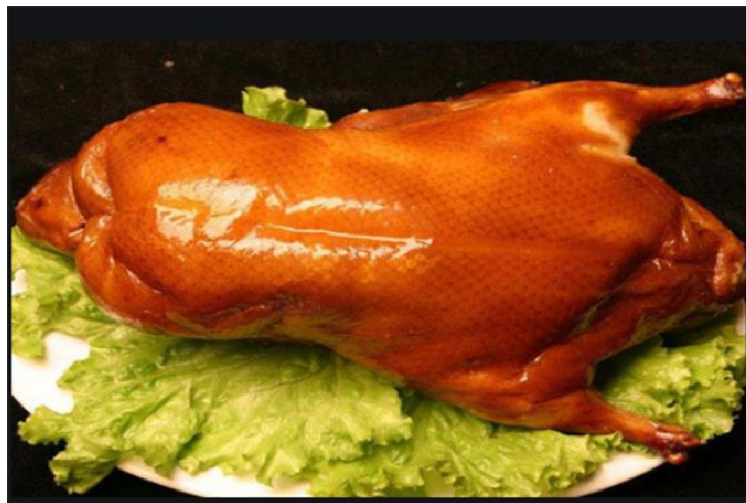
- 一、 研究背景.....●
- 二、 研究内容.....●
- 三、 结果与分析.....●
- 四、 结论与致谢.....●

研究背景

研究内容

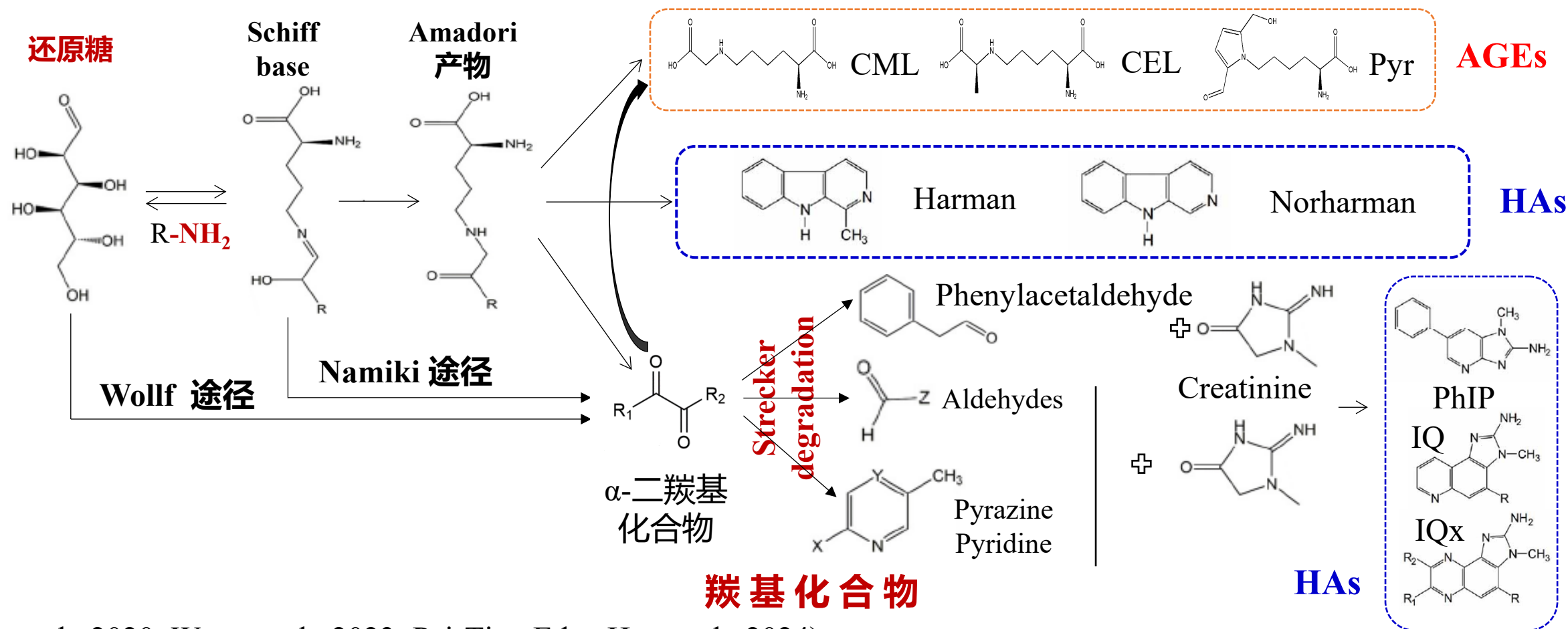
结果与分析

- 肉类是大多数人**饮食结构**中的**重要组成**部分，也是**全球消费量最大**的食品之一
- **烤肉**色香味俱全，制作简单，**深受广大消费者的喜爱**
- **烤肉**在**高温**烤制过程中，可能会产生一些美拉德反应伴生危害物，如**AGEs**和**HAs**



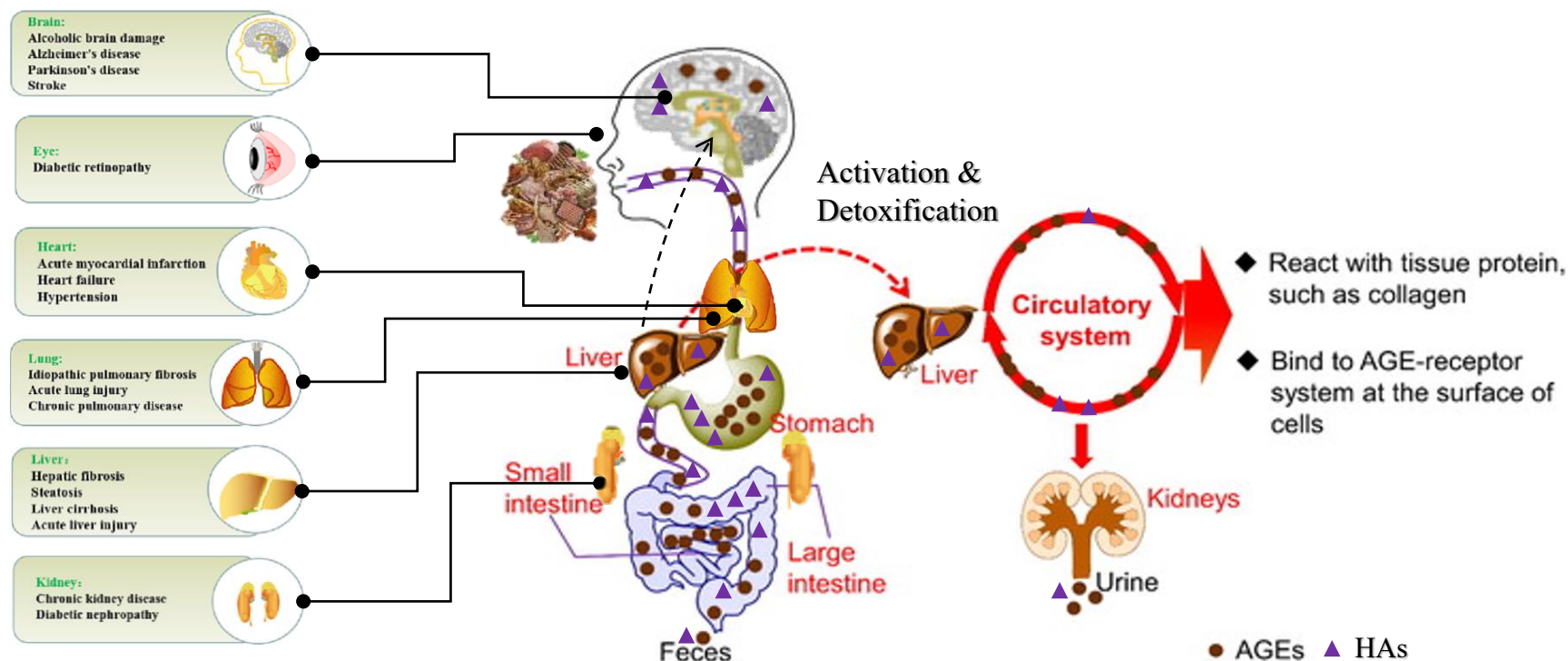
AGEs和HAs的形成

AGEs: 还原糖的**活性羰基**与核酸、脂肪和蛋白质的**氨基**发生复杂化学相互作用, 日常饮食中摄入的食源性AGEs大约有**80%**来源于**肉类产品**; **HAs**: 通常在富含蛋白质的食品中(尤其**肉类**和**鱼类**), **氨基酸**、**糖**与**肌酸酐**为前体, 通过热诱导的化学反应生成



AGEs和HAs的吸收、代谢、毒性

- 食源性**AGEs**有10%会被消化道吸收并通过血液循环进入体内，约2/3**积累在体内**；食源性**HAs**参与全身的血液循环进入肝脏，在体内主要通过活化和肝脏解毒进行代谢，而残余的代谢物也有可能**在人体多个部位积累**
- AGEs**可能增加神经退行性疾病、糖尿病等多种慢性疾病风险；**HAs**可能增加癌症、糖尿病、抑郁症和帕金森等神经系统疾病风险



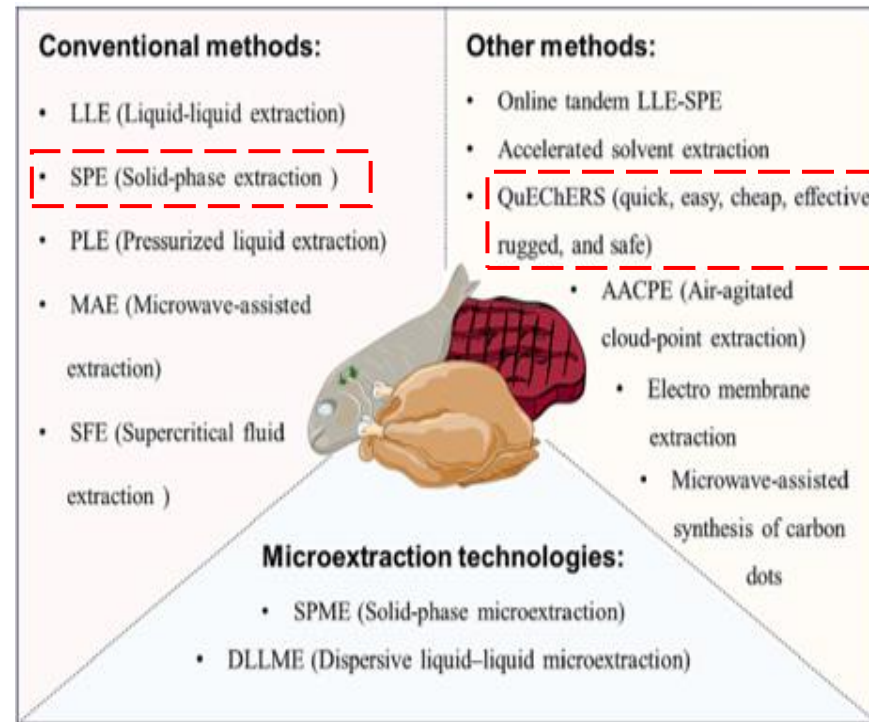
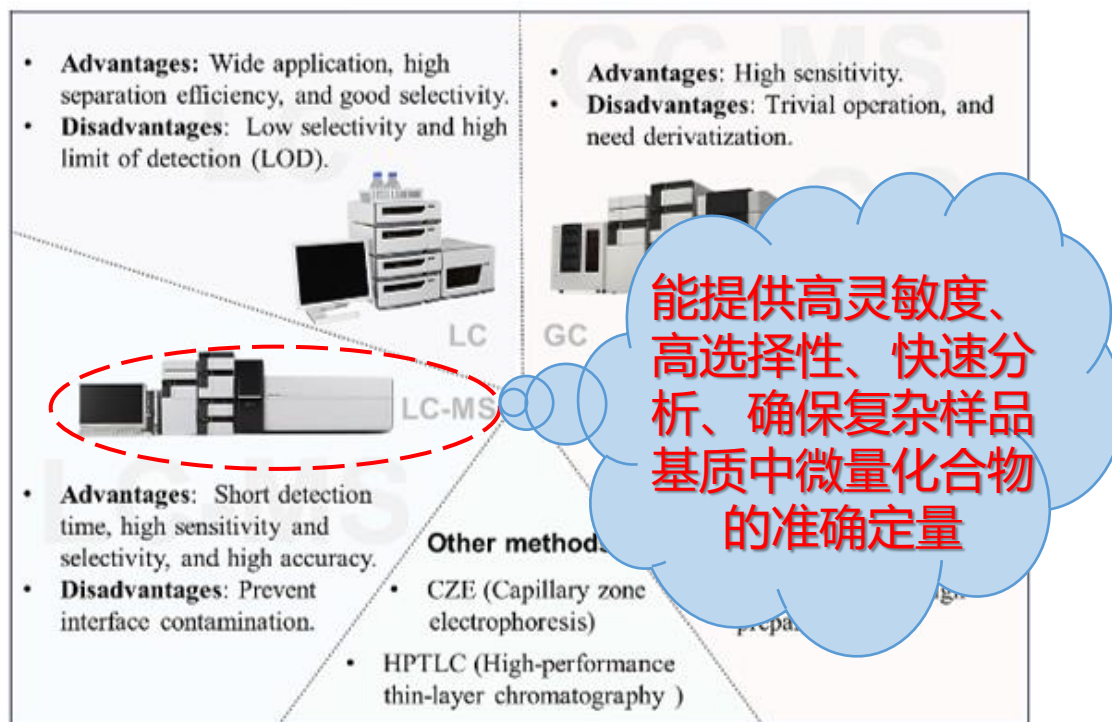
AGEs和HAs**具体含量**



食品安全性和营养价值

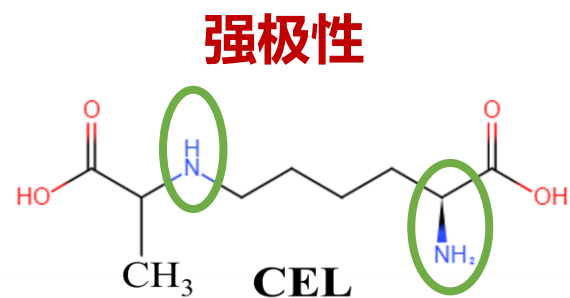
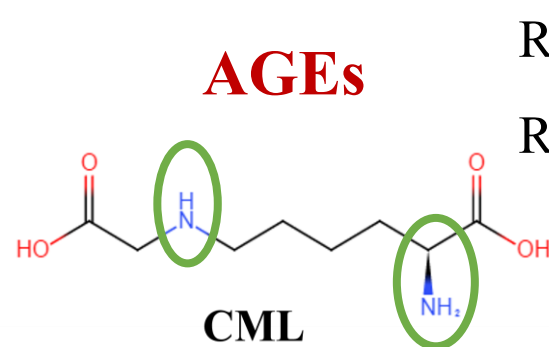
AGEs和HAs的检测技术

- **AGEs**的检测技术主要包括酶联免疫吸附测定(ELISA) , 液相色谱(LC) 和**液相色谱-质谱(LC-MS)**; **HAs**的检测技术除了上述3个外还有气相色谱(GC)
- **AGEs**通常要先经过酶解或酸水解, **以酸水解为主**, 再进行**固相萃取**; **HAs**的方法比较多, 现以**QuEChERS**、**盐酸提取再固相萃取**为主 (前处理方法存在差异)

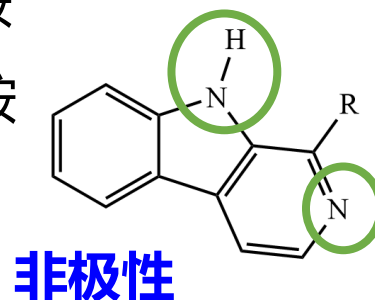


AGEs和HAs同时检测面临的挑战

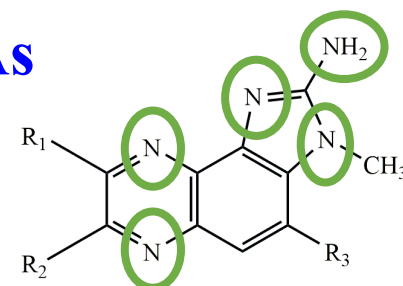
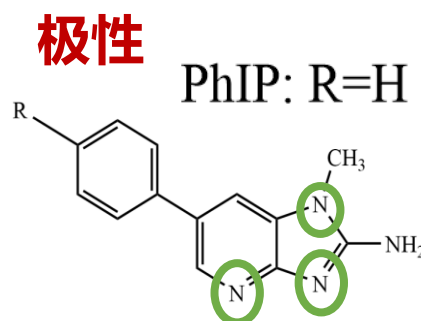
AGEs和HAs化学**结构**的**多样性**、**极性差异**；食品基质的**复杂性**、食品中含量的**微量性**；**同时检测**两类物质有利于**减少检测样本间的差异**、**降低检测时间和成本**



高温酸水解可将Amadori产物转化为新的AGEs



Harman: $\text{R}=\text{CH}_3$
Norharman: $\text{R}=\text{H}$

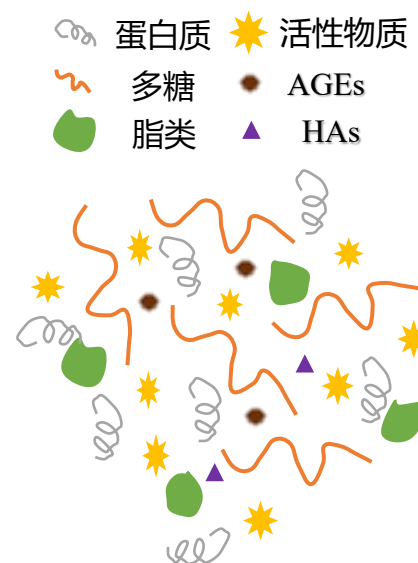


极性

IQx: $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{CH}_3, \text{R}_3=\text{H}$
8-MeIQx: $\text{R}_1=\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{H}, \text{R}_3=\text{H}$
4,8-DiMeIQx: $\text{R}_1=\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{H}, \text{R}_3=\text{CH}_3$
7,8-DiMeIQx: $\text{R}_1=\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{CH}_3, \text{R}_3=\text{H}$



IQ: $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{CH}_3, \text{R}_3=\text{H}$
MeIQ: $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{CH}_3, \text{R}_3=\text{CH}_3$



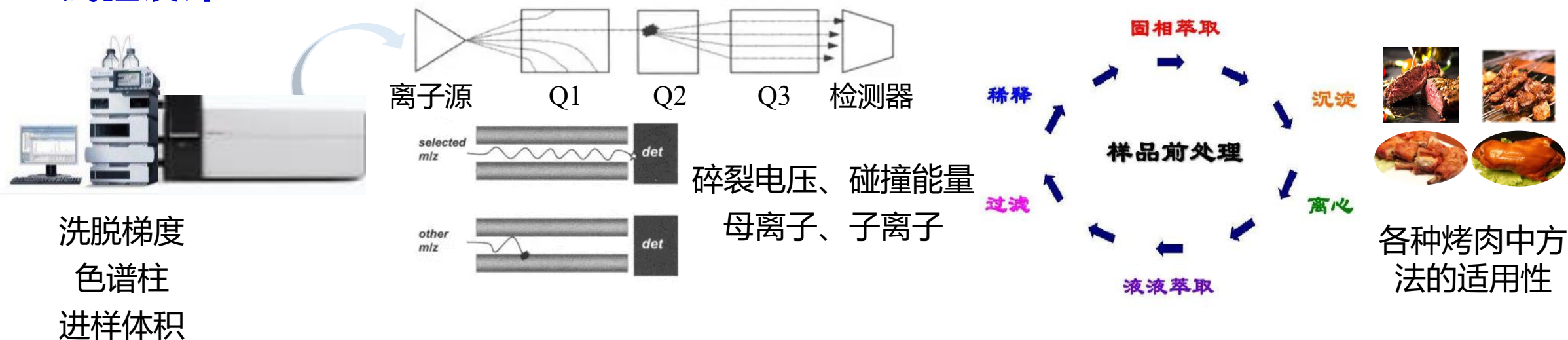
肉中其他成分可能与目标分析物发生相互作用

烤肉中AGEs和HAs同时测定方法的建立与优化

研究内容

优化**质谱**参数、**色谱**参数、**前处理**方法，经**方法学**验证后，再推广至各种烤肉，验证其**适用性**

试验设计



AGEs: CML, CEL; d_4 -CML, d_4 -CEL

测定指标

HAs: PhIP; IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx; Harman, Norharman; 4,7,8-TriMeIQx

研究背景

研究内容

结果与分析

➤ 质谱参数优化 —— 定性、定量

目标化合物及其内标物质都含有**伯胺**和**仲胺**基团，容易吸引质子形成 $[M + H]^+$ 分子离子峰
→ ESI 正模式 (**ESI+**)

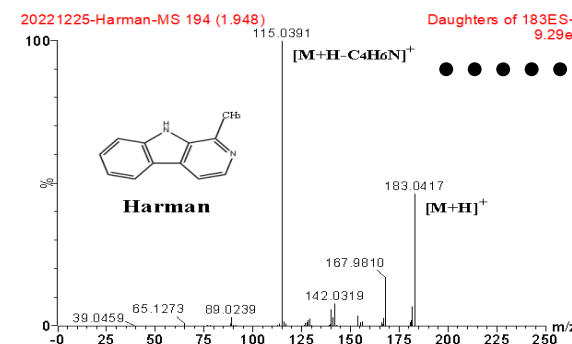
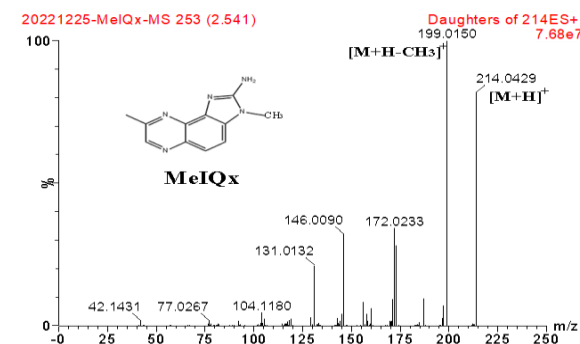
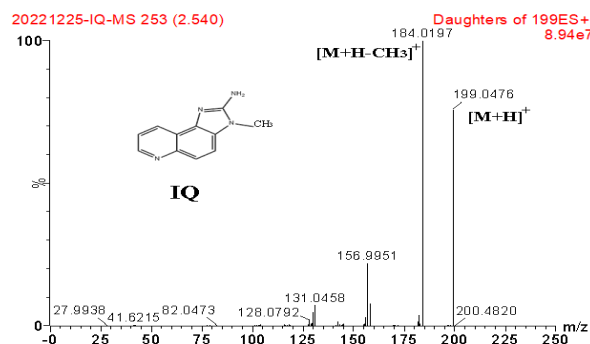
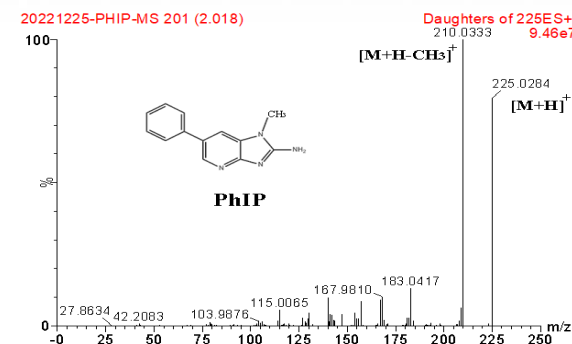
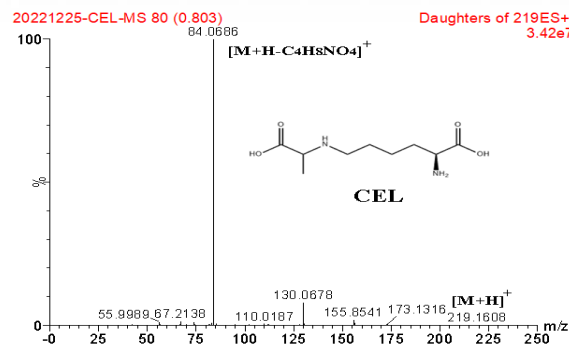
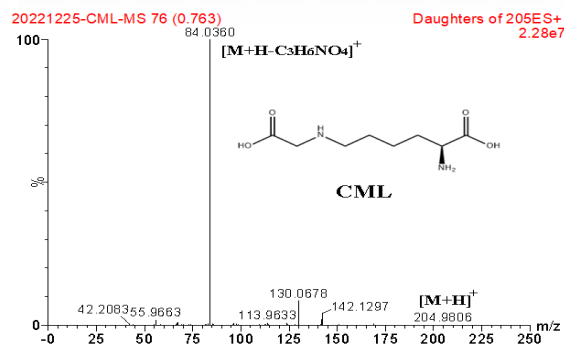
二级质谱扫描子离子：选择反应最灵敏的碎片离子进行**定量**，选择反应次灵敏的碎片离子进行**定性**

11种目标分

析物和3种

内标物质的

MS/MS参数

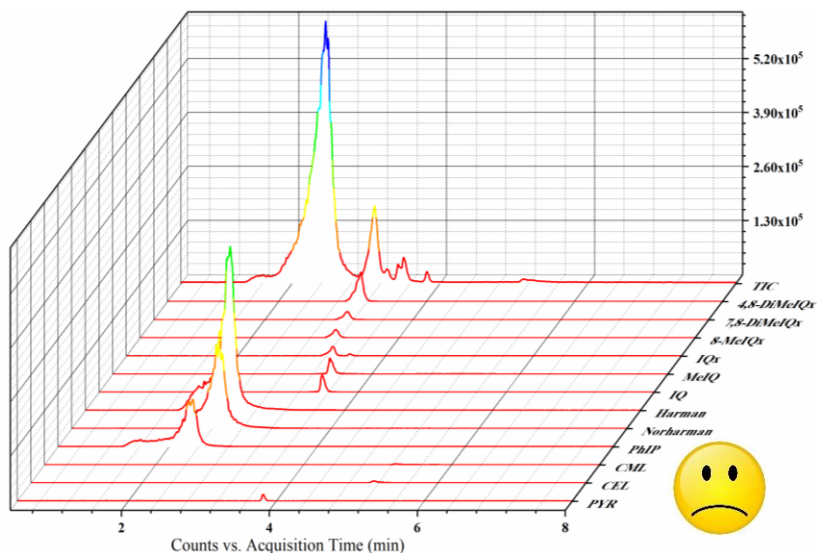


➤ UPLC 条件的优化 —— 基线分离、准确定量

CEL、CML、Harman、Norharman、PhIP的峰形在BEH Amide色谱柱上较差，IQ、MeIQ、IQx、MeIQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、Harman、Norharman的峰形在Eclipse Plus C18色谱柱上较差，而在 HSS T3 色谱柱上的峰形清晰对称

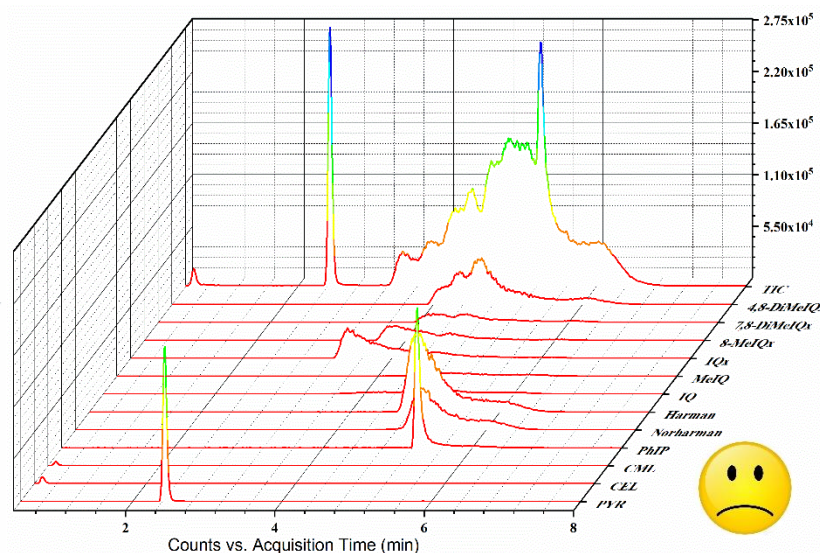
ACQUITY UPLC BEH Amide

主要针对极性分析物，特别是碳水化合物和糖类



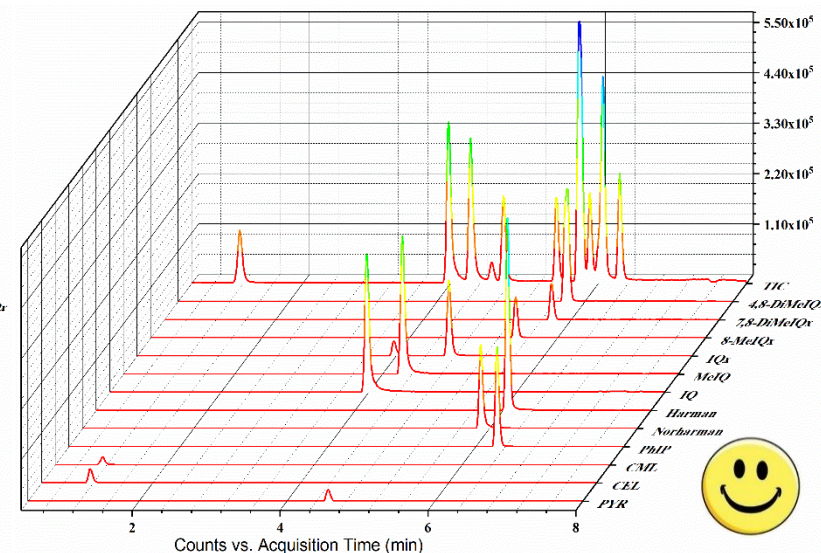
ZORBAX Eclipse Plus C18

适用于碱性、酸性和中性化合物的分析



ACQUITY UPLC HSS T3

开发极性和非极性化合物分离方法的理想选择，超低MS流失

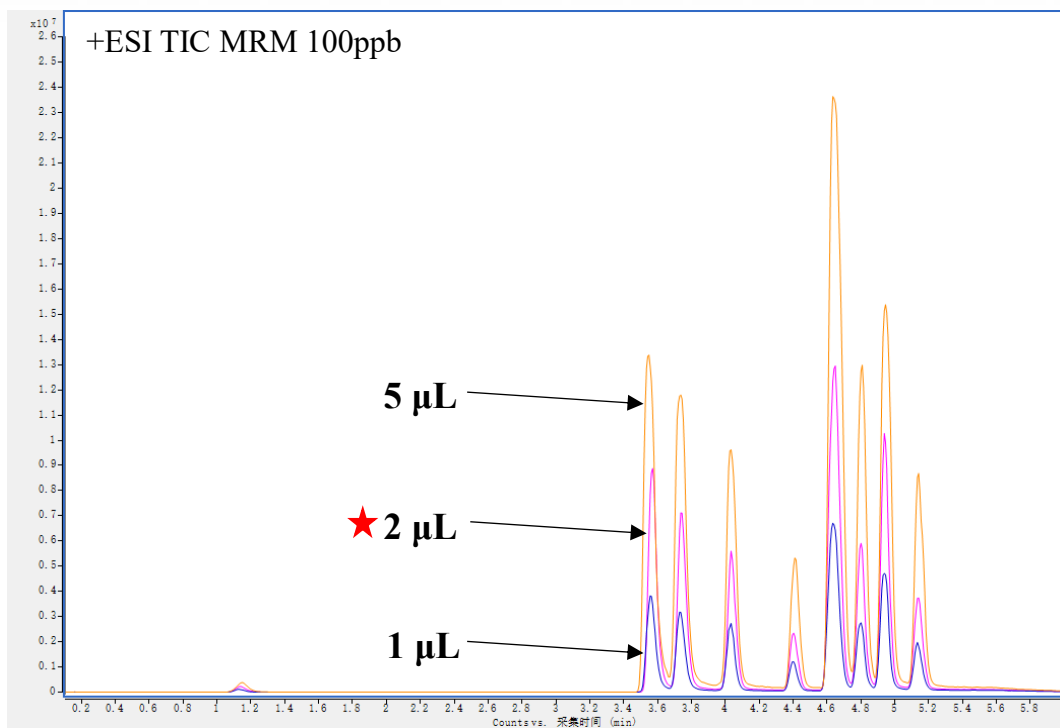


不同色谱柱上目标分析物的UPLC-MS/MS色谱图

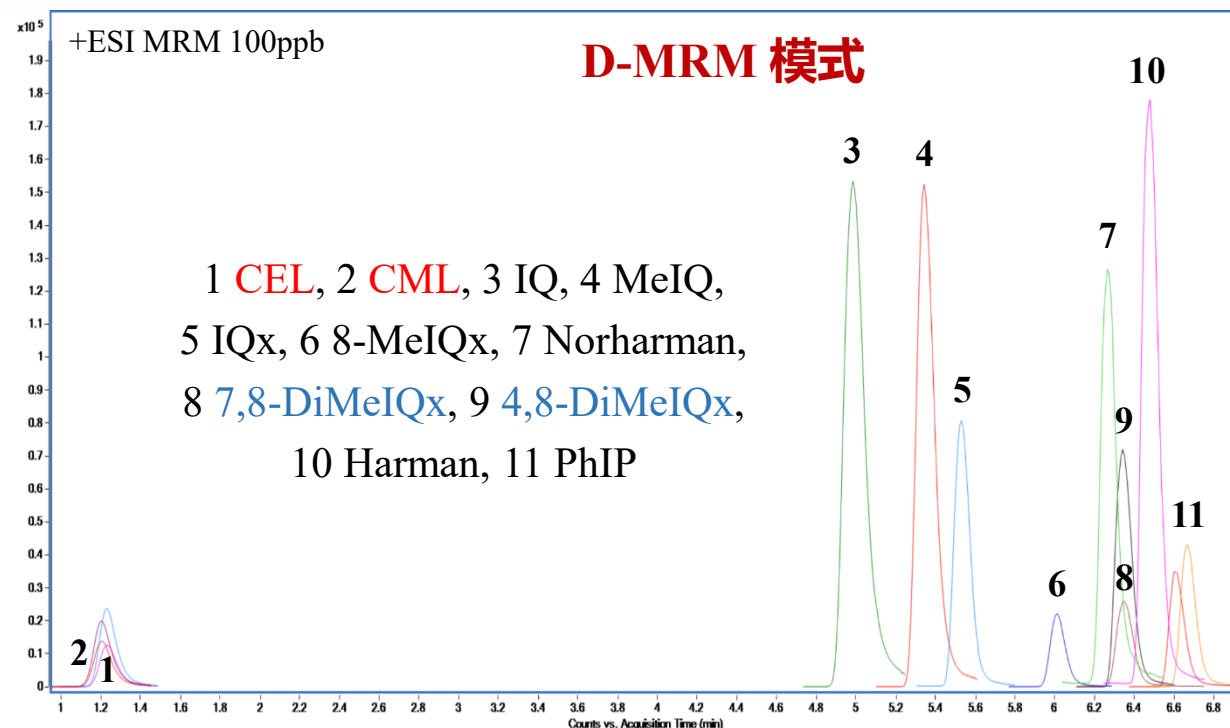
➤ UPLC 条件的优化 —— 灵敏度、重复性、分离度、色谱峰形

随着**进样量**的**增加**，**响应值**也随之**增加**，为了**避免**检测器**过载**，减少对色谱条件的依赖及获得较高灵敏度，最终选择**2 μL** 的进样量

梯度洗脱程序经优化，可**更好地分离**，**HSS T3**色谱柱上所有峰形均**尖锐对称**，**分离度好**，且各目标化合物的**响应较协调**



不同进样体积色谱图

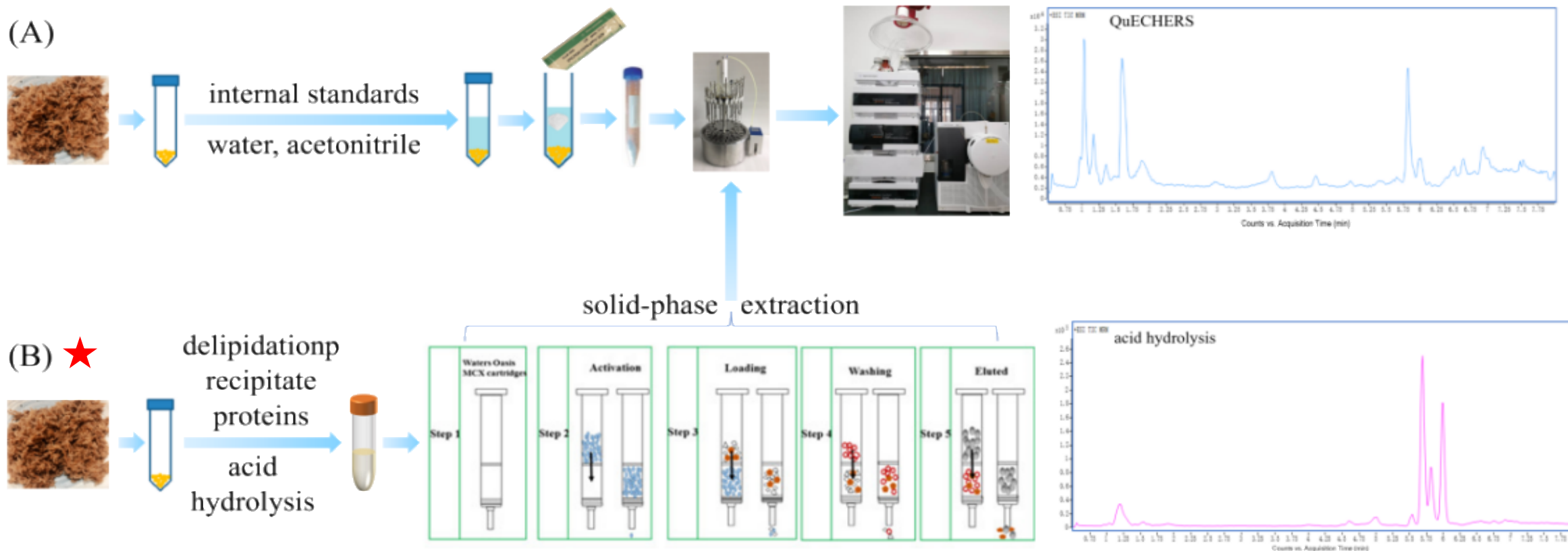


分析物和内标物质的UPLC-MS/MS色谱图

➤ 样品前处理优化 —— 检测样本的一致性

A: **提取效率较差**, 响应值偏低, 基于**信噪比附近**, AGEs的定量很**容易被干扰**

B: **响应明显得到了提升**, 提取效率良好。因此, 选择**酸水解**和**固相萃取**进行前处理

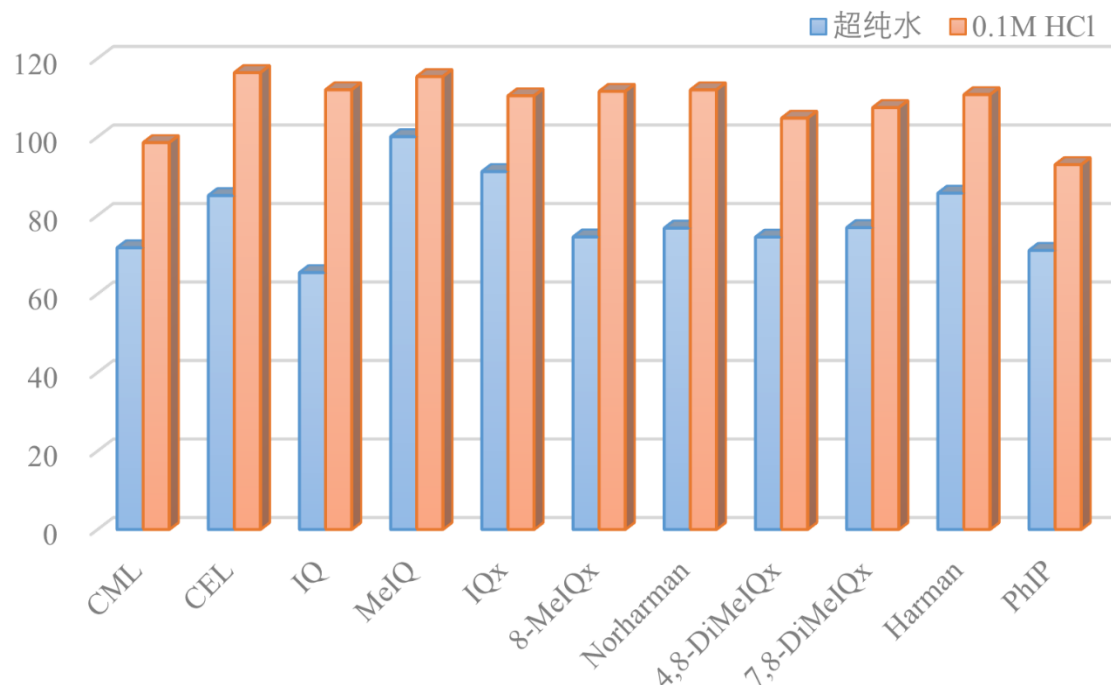


不同前处理方法流程图和UPLC-MS/MS色谱图

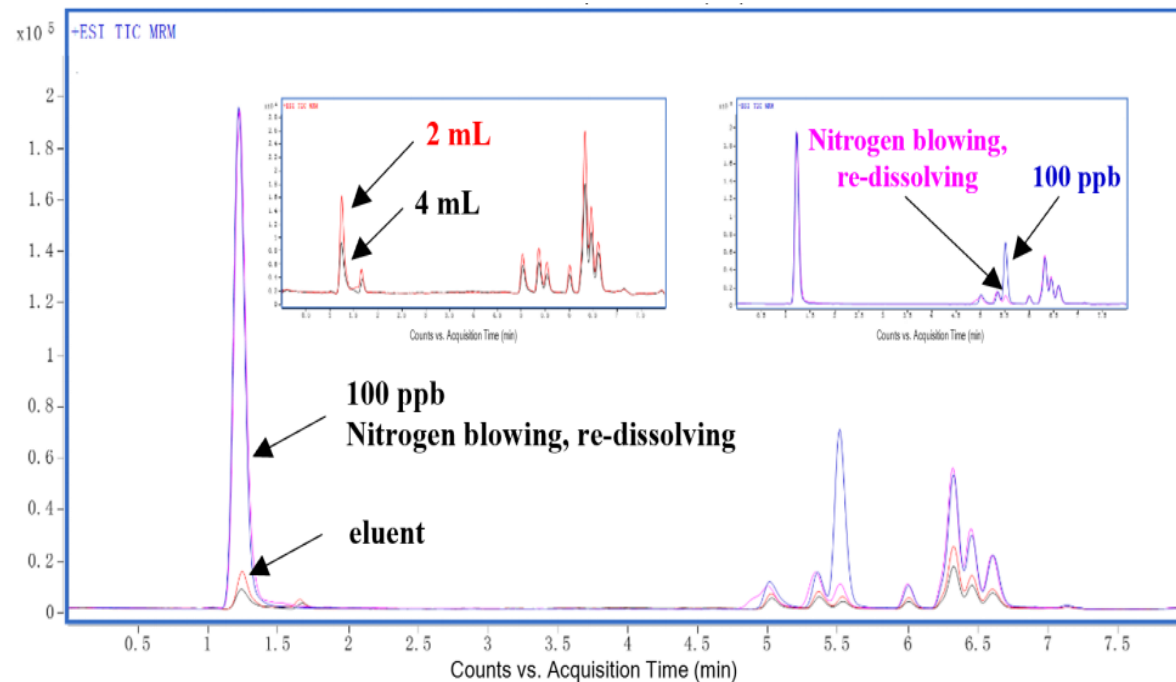
➤ 样品前处理优化 —— 提取效果

分别用**超纯水**和**0.1 M HCl**对固相萃取小柱进行活化和淋洗，**0.1 M HCl**作为活化和淋洗液的**回收率显著高于超纯水**

2 mL洗脱液洗脱目标化合物的响应**显著高于4 mL**洗脱液的，且**氮吹浓缩后响应显著提高**



不同活化液和淋洗液的萃取效果



固相萃取优化后的UPLC-MS/MS色谱图

➤ 方法验证 —— 稳定性、适用性

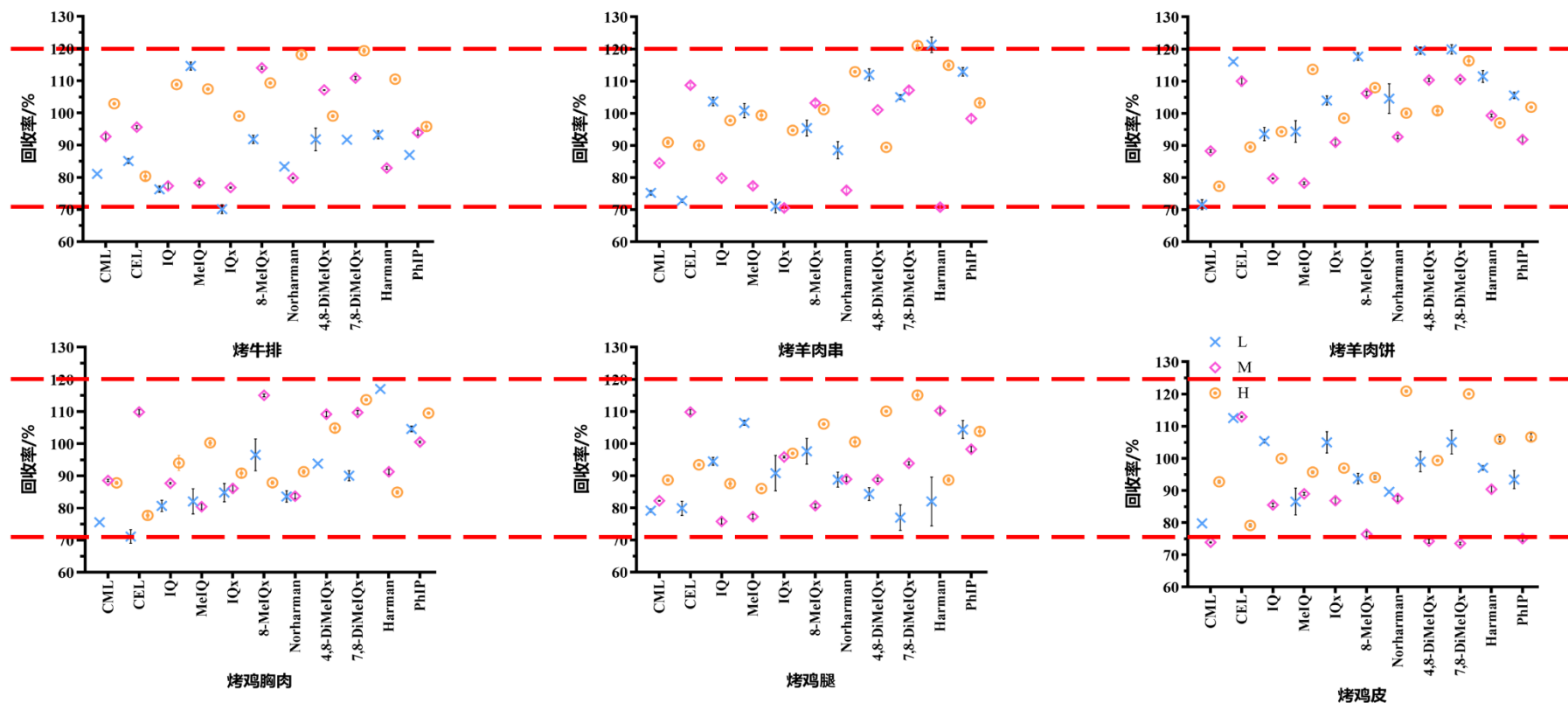
回收率: 70.10% - 121.31%; 精密度 (RSDs): 0.05% - 7.58%; $R^2 > 0.99$

检出限 (LOD): 0.01 - 0.27 ng/mL; 定量限 (LOQ): 0.04 - 0.91 ng/mL

基质效应: 0.6 - 1.4, 中等基质效应占19.7%, 弱基质效应占80.3%

所开发的方法**准确可靠**, 适用于烤肉中AGEs和HAs的**微量同时检测**

6类烤肉中
AGEs和HAs的
回收率和RSDs



结论

■ 方法学

- 通过对仪器参数和前处理方法的优化, 在 8 min 内实现了11种目标分析物的良好分离和高响应
- 在10 - 200 ng/mL 内, LOD和LOQ分别为 0.3 - 5.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.9 - 6.3 $\mu\text{g/kg}$, $R^2 > 0.99$; 其回收率、RSD和基质效应均可接受

■ 实际样品分析

- 成功应用于6种不同类型烤肉样品的分析, 不仅提高了检测效率, 也为烤肉安全评估和公众健康指导提供了重要工具

■ 展望

- 进一步探索更多降低检测成本和提高样品高通量前处理的方法, 以促进该检测技术在食品工业和健康领域的应用

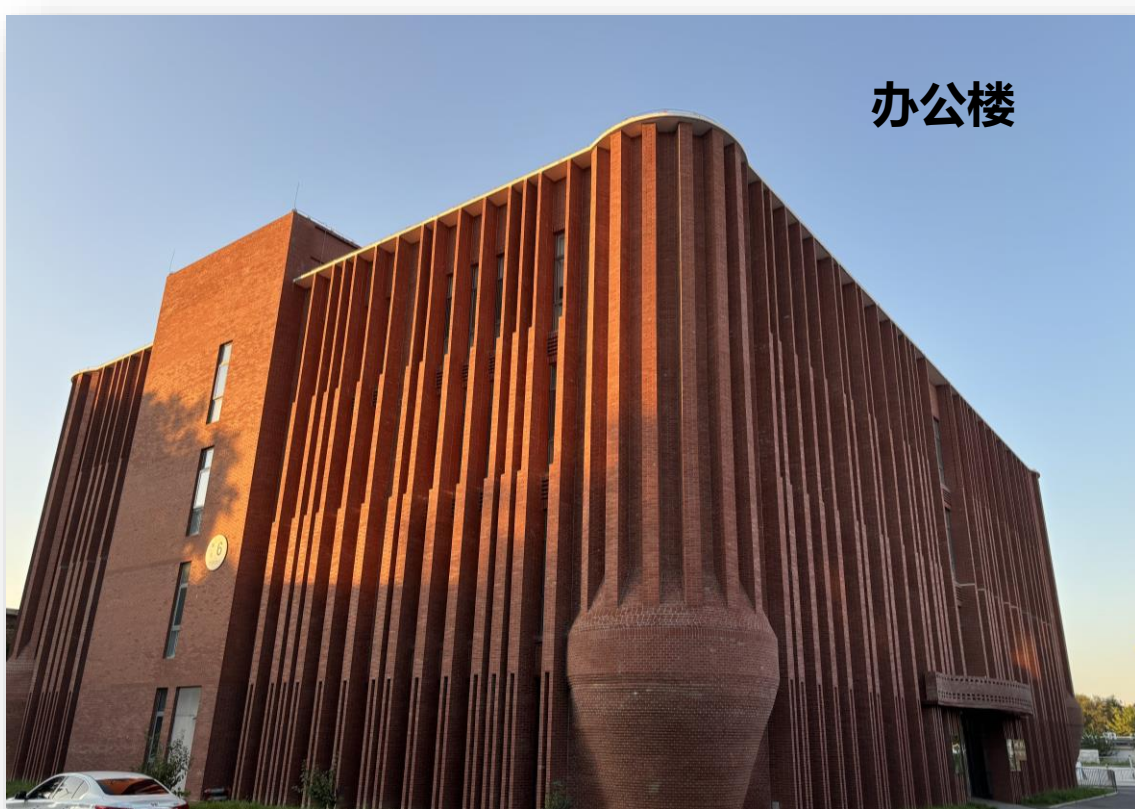
致谢



**感谢中国农业科学院农产品加工研究所
肉品科学与营养工程创新团队！**



办公楼



中试实验室

