

麦麸提取物对晚期糖基化终产物的抑制研究

刘慧琳, 陈晓默, 倪天鸿, 王静

(北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京工商大学, 北京 100048)

摘要: 谷物膳食对人体健康以及癌症、心脏病和糖尿病等的预防具有重大意义, 而晚期糖基化终产物 (AGEs) 会诱导糖尿病等并发症的产生, 因此本试验选择从麦麸中提取得到的麦麸酶解物和阿魏酰低聚糖作为抑制剂对牛血清蛋白-葡萄糖模拟体系中 AGEs 进行抑制研究。选用阿魏酸、低聚木糖以及不溶性膳食纤维作为对照组, 以 AGEs 的荧光产物和非荧光产物 (羧甲基赖氨酸) 的生成量来评价抑制效果。结果显示, 从麦麸中提取得到的阿魏酰低聚糖中的总多酚和总黄酮的量是麦麸酶解物中含量的 5.36 和 2.67 倍, 且阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物对 AGEs 中荧光产物的抑制率分别为 14.49% 和 5.75%, 对羧甲基赖氨酸的抑制率分别为 18.16% 和 16.59%, 抑制率的不同可能与其总多酚和黄酮的含量不同有关。阿魏酸、低聚木糖以及不溶性膳食纤维组对 AGEs 中荧光产物和 CML 基本没有抑制效果。通过检测模拟体系反应前后还原糖和赖氨酸的含量可知, 阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物可能是通过减少蛋白中可用赖氨酸的反应量从而抑制糖基化反应进程。

关键词: 晚期糖基化终产物; 阿魏酰低聚糖; 麦麸酶解物; 抑制

文章编号: 1673-9078(2017)7-50-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.008

Stunhibitory Effect of Wheat Bran Extract on the Advanced Glycation End Products

LIU Hui-lin, CHEN Xiao-mo, NI Tian-hong, WANG Jing

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology & Business University (BTBU), Beijing 100048, China)

Abstract: Cereal foods are important for human health and for the control and prevention of cancer, heart disease, and diabetes, while advanced glycation end products (AGEs) can induce the occurrence of diabetes and other complications. Therefore, feruloyl oligosaccharides and wheat bran hydrolysate were selected as the inhibitors in this experiment to study their inhibitory effects on the formation of AGEs in bovine serum albumin-glucose system. Ferulic acid, xylooligosaccharides, and insoluble dietary fiber were used as controls, and the fluorescent and non-fluorescent products (N_{ϵ} -carboxymethyllysine and CML) of AGEs were used to evaluate the effects of the inhibitors. The results indicated that the contents of total polyphenol and total flavonoids in feruloyl oligosaccharides were 5.36 and 2.67 times as much as those in wheat bran hydrolysate, respectively. The inhibition rates of feruloyl oligosaccharides and wheat bran hydrolysates on the fluorescent products were 14.49% and 5.75%, respectively, and their inhibition rates on the non-fluorescent product CML were 18.16% and 16.59%, respectively. The different inhibition rates might be related to the varying levels of total polyphenols and flavonoids. Ferulic acid, xylooligosaccharides, and insoluble dietary fiber groups showed no inhibitory effect on the production of fluorescent and non-fluorescent products. As evident from the amounts of reducing sugar and lysine in the simulation system before and after the reaction, feruloyl oligosaccharides and wheat bran hydrolysate may inhibit the glycosylation reaction by reducing the content of available lysine in the reactive proteins.

Key words: advanced glycation end products; feruloyl oligosaccharides; wheat bran hydrolysate; inhibition

美拉德反应, 又称“非酶棕色化反应”, 主要是指还原糖和氨基酸、多肽、蛋白质之间的复杂反应, 广泛存在于食品加工和贮藏中, 对食品品质有很大的影响

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571940)

作者简介: 刘慧琳 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全检测
通讯作者: 王静 (1976-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与安全

响。晚期糖基化终产物 (Advanced glycation end products, AGEs) 是最初被证实形成于美拉德反应中晚期的产物, AGEs 有“糖毒素”之称^[1], 与心血管疾病^[2,3]和其他慢性疾病, 例如肾功能衰竭^[4]、糖尿病和视网膜病等疾病的发生密切相关。此外, 有研究显示, AGEs 还与 DNA 损伤有关系, AGEs 与人体衰老之间可能存在一些关联^[5,6]。近年来饮食中摄入的美拉德产物的营养和毒性作用逐渐受到关注, 而 AGEs 与人类慢性

疾病之间的关系也一直在不断研究,食品中产生的AGEs也逐渐进入到专家学者们研究的行列。AGEs不是单一产物,包括20多种化合物,主要包括荧光产物和非荧光产物,其中非荧光产物的代表为羧甲基赖氨酸(Nε-carboxymethyllysine, CML), CML常被看作是检测食品中AGEs含量的主要目标产物^[7]。文中分别研究抑制剂对荧光产物和非荧光产物CML含量的影响来综合评定抑制剂对AGEs的抑制作用。

我国是小麦生产大国,小麦的年产量已超过1亿多t。小麦麸皮是面粉厂主要的加工副产物,每年可达2000万t以上,利用耐高温 α -淀粉酶、水解淀粉酶和精制糖化酶处理小麦麸皮样品得到不溶性膳食纤维^[8],再用木聚糖酶水解麦麸不溶性膳食纤维能够得到麦麸酶解物。麦麸酶解物主要由多种酚酸和阿魏酰低聚糖组成,因此麦麸酶解物有较好的抗氧化性,主要包括清除各种自由基和对DNA的保护作用^[9],其中阿魏酰低聚糖具有卓越的生理活性:(1)具有较好的抗氧化活性,是一种天然的抗氧化剂^[10];(2)有降血压、降血脂、抗癌、治疗糖尿病等功效^[11]。因此本实验选取了由麦麸制备的麦麸酶解物和阿魏酰低聚糖作为抑制剂研究是否对模拟体系中的AGEs生成有抑制效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氨基胍、低聚木糖(均为分析纯),北京半夏生物科技有限公司;阿魏酸(分析纯),上海源叶生物科技有限公司;阿魏酰低聚糖、麦麸酶解物,实验室自提取;福林酚试剂、甲醇、 β -巯基乙醇、浓硫酸、苯酚、盐酸、氨水(均为分析纯),北京化工厂;碳酸钠、丙酮、氢氧化钠、四硼酸钠、 $N\alpha$ -乙酰基-L-赖氨酸、硼酸钠、硼酸、硼氢化钠、三氯乙酸,国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈、乙酸、三氟乙酸(均为色谱纯),北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器和设备

3K15高速冷冻离心机,德国SIGMA Laborzentrifugen GmbH; BioTek Synergy H1MDG多功能酶标仪,美国BioTek Instruments, Inc.; UGC-24M氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司;精密强制对流干燥箱,中豪莱伯科技有限公司;HH-2恒温水浴锅,金坛市杰瑞尔电器有限公司;酒精喷灯,济南鲁盈化工有限公司;KQ-700GVDV多用途恒温超声清洗仪,昆山市超声波清洗器;AL 203电子分析天平,瑞士METTLER

TOLEDO; SHB-III循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司; Starter2000 pH计,美国奥豪斯(上海)有限公司;紫外-可见分光光度计,美国Agilent; 岛津液相LC-20(紫外检测器),日本; Agilent LC-MS, 美国。

1.3 方法

1.3.1 麦麸中麦麸酶解物和阿魏酰低聚糖对AGEs的抑制

1.3.1.1 麦麸中麦麸酶解物的和阿魏酰低聚糖的制备

参照袁等的方法,利用耐高温 α -淀粉酶、水解蛋白酶和精制糖化酶处理小麦麸皮样品得到不溶性膳食纤维,经过B.subtilis木聚糖酶水解后,释放出阿魏酰低聚糖,得到麦麸酶解物^[9]。将上述麦麸酶解物经浓缩过Amberlite XAD-2柱(80×2.50 cm),用50%甲醇溶液洗脱得到的洗脱液冷冻干燥后得阿魏酰低聚糖^[10]。

1.3.1.2 阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物中总黄酮和总多酚含量的测定

总多酚的测定^[12,13]:将阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物配置成2.50 mg/mL的溶液,取0.10 mL稀释溶液,加入0.50 mL福林酚试剂和0.40 mL、7.50%的碳酸钠溶液,室温避光反应1 h,然后在765 nm下测吸光值。标准曲线通过不同浓度的没食子酸(0~250 mg/L)的检测得到。

总黄酮的测定^[12,14]:取1 mL的稀释溶液放入玻璃管中,同0.06 mL、5% NaNO₂混合,5 min后加入0.06 mL、10% AlCl₃,震荡2 min,室温静置6 min后0.40 mL、1 mol/L NaOH、0.48 mL去离子水加入到管中,然后510 nm下检测吸光值。用儿茶素(0~50 mg/L)标准溶液制作标曲。全部的黄酮物质的含量用儿茶素当量(CEs)的毫克数表示。

1.3.1.3 抑制模型的建立

在AGEs抑制实验中,分为空白组、氨基胍阳性对照组,阿魏酸、低聚木糖及不溶性膳食纤维对照组,阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物实验组;用磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)(0.10 mol/L, pH 7.00)溶解牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)和葡萄糖(Glucose, Glu),并定容至100 mL,使BSA质量浓度为10 mg/mL和Glu浓度为500 mmol/L,分装于5 mL密封耐高压高温玻璃管中,5 mL/管,以化合物1 mM、混合物2.50 mg/mL的浓度将对照组及实验组对象加入到玻璃管中,拧紧管盖,100 °C水浴加热40 min,冰水浴冷却待测,4 °C下保存待测。

1.3.2 抑制模型中AGEs的检测

1.3.2.1 抑制模型中荧光产物的检测

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \frac{\text{糖化组(含抑制剂)} - \text{非糖化组(含抑制剂)}}{\text{糖化组(不含抑制剂)} - \text{非糖化组(不含抑制剂)}} \quad (1)$$

将空白组反应混合物在波长为 340 nm 下扫描发射波长, 在最大发射波长下, 扫描激发波长, 在最大激发波长及最大发射波长下检测模拟体系反应混合物的荧光强度, 所有检测均做三次平行。其中荧光产物的抑制率的计算公式如 (1) 所示。

1.3.2.2 抑制模型中非荧光产物 CML 的检测

参考 Assar^[15] 等人的方法并做适当的修改, 取一定量的反应后的样品, 加入硼酸钠缓冲溶液 (0.50 M, pH 9.20) 混合至最后的缓冲液浓度为 0.20 mol/L。加入硼氢化钠溶液 (2 mol/L, 0.10 mol/L NaOH 配制) 至最后硼氢化钠溶液的浓度为 0.10 M。样品在 4 °C 下还原 10 h。加入 60% 的三氯乙酸使得最后样品中三氯乙酸的最终浓度为 20%, 10000 r/min 下离心分离 10 min 以沉淀蛋白质, 获得的蛋白质用丙酮洗涤 2 次, 离心除去丙酮后将剩余的蛋白烘干。向烘干的蛋白中加入 1 mL 的 6 mol/L 盐酸 110 °C 下水解 24 h, 然后氮气吹扫进行干燥。将干燥的蛋白质水解物重新溶于 2 mL 水中, PCX 固相萃取柱预活化 (依次通过 3 mL 甲醇和 3 mL 水)^[16], 取复溶的样品溶液通过预活化的 PCX 固相萃取柱, 然后分别用 3 mL 水和 3 mL 甲醇冲洗, 最后目标化合物通过 5 mL 的甲醇 (5% 的氨水) 洗脱, 通过氮气吹扫干燥, 重新溶于 2 mL 水中, 然后通过 0.45 μm 滤膜过滤后用 HPLC-MS/MS 测定反应体系中 CML 的含量, 所有样品均做三次平行实验。

1.3.2.3 HPLC-MS/MS 检测 CML 的色谱条件

色谱条件: Inertsil ODS-SP (4.60×150 mm, 5 μm, Shimadzu) 色谱柱; 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸水溶液^[17], B: 乙腈; 流速: 0.20 mL/min; 进样量: 10 μL。梯度洗脱条件为: 0~0.50 min 为 90%A, 0.50~4.00 min 为 90%A~60%A^[18]; 柱温: 30 °C; 运行时间: 25 min。

质谱条件: ESI 正离子源; MRM 模式; 离子源温度: 300 °C; 锥孔电压: 15 psi; 毛细管电压: 4 kV; MRM 模式的设置: m/z 205→ m/z 84, m/z 205→ m/z 130^[19]。

1.3.3 抑制模型反应前后可用赖氨酸的检测

苯二醛试剂 (现配现用)^[20,21]: 将 0.1 M 的硼酸缓冲液 (pH 9.50, 50 mL), β-巯基乙醇 (0.20 mL) 和 OPA (80 mg 溶于 2 mL 甲醇) 混合, 去离子水定容至 100 mL。将 1 mL 样品溶液和 3 mL OPA 试剂混合, 立即放置于暗处室温静置 5 min, 然后检测荧光 (以 OPA 作为空白溶液)。最大激发和最大吸收波长分别为 340 nm 和 455 nm。标准曲线通过不同浓度 (10~1000 μM) 的 α-乙酰基-L-赖氨酸测得。结果可通过氨基组

分的百分比表示 (未经加热处理的对照组溶液中的氨基酸作为 100%)。

1.3.4 抑制模型反应前后还原糖含量的检测

将 100 μL 稀释样品置于玻璃瓶中, 加入 300 μL 浓硫酸和 60 μL、5% 石碳酸 (苯酚), 90 °C 保温 5 min, 迅速冷却到室温静置 5 min。将 200 μL 混合液加入到 96 孔板中在 490 nm 下检测吸光度。标准曲线通过不同浓度葡萄糖 (5~40 μg/孔) 的检测制得^[22]。

1.3.5 统计分析方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析和显著性分析; Excel 2007 软件进行统计分析数据。

2 结果与讨论

2.1 阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物中总黄酮和

总多酚的含量

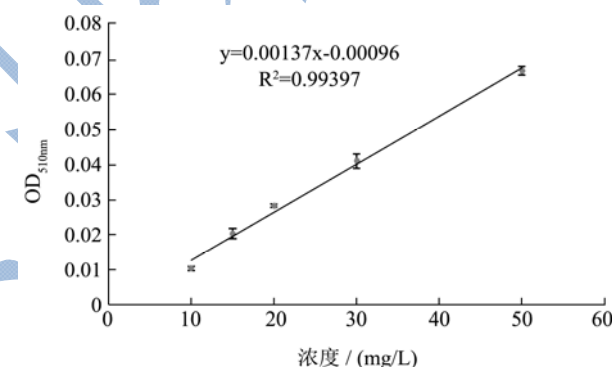


图1 黄酮含量测定的工作曲线

Fig.1 Standard curve for the determination of flavonoid content

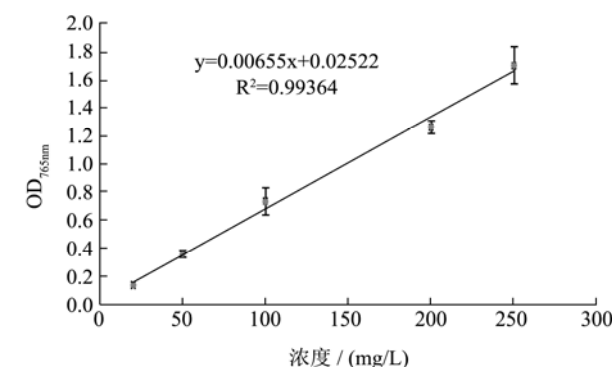


图2 多酚含量测定的工作曲线

Fig.2 Standard curve for the determination of polyphenol content

分别取 2.50 mg/mL 阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物用磷酸缓冲液 (0.10 mol/L) 配制成溶液, 取 1 mL 稀释液按照文中 1.3.1.2 的方法, 测定两种抑制剂中总多

酚和总黄酮的含量。从图 3 可以看出,阿魏酰低聚糖中多酚含量约为麦麸酶解物中多酚含量的 5.36 倍,而黄酮含量为麦麸酶解物中黄酮含量的 2.67 倍。

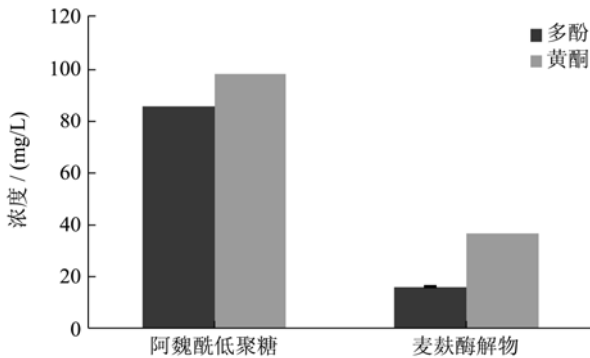


图 3 阿魏酰低聚糖及麦麸酶解物中多酚及黄酮含量

Fig.3 Flavonoid content in feruloyl oligosaccharides and wheat bran hydrolysate

2.2 抑制模型中荧光产物的生成量

2.2.1 酶标仪法检测 AGEs 中荧光产物

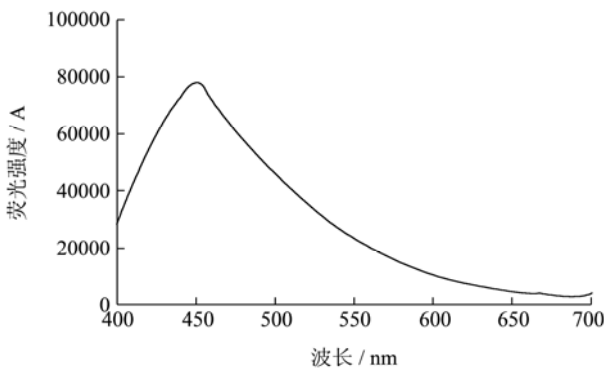


图 4 固定激发波长下发射波长波谱

Fig.4 Emission wavelength spectrum under fixed excitation wavelength

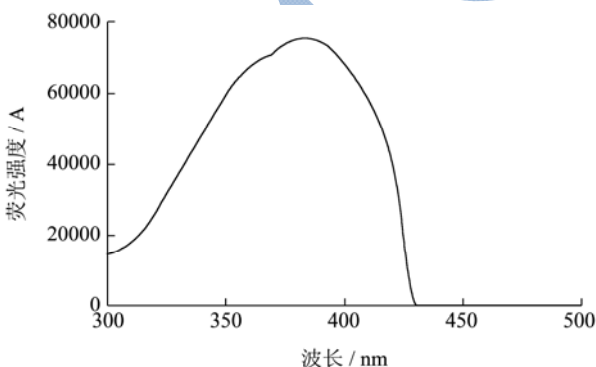


图 5 固定发射波长下激发波长波谱

Fig.5 Excitation emission wavelength spectrum under fixed emission wavelength

从图中可看出,340 nm 下反应生成物在 400 nm 到 500 nm 之间有最大发射波长,为 450 nm。设定最大发射波长为 450 nm 后,扫描结果如图 5 所示。从

图中可以看出,380 nm 为最大激发波长。由此确定,荧光强度最大激发波长在 380 nm 和最大发射波长为 450 nm 测定。

2.2.2 抑制模型中荧光产物的生成量

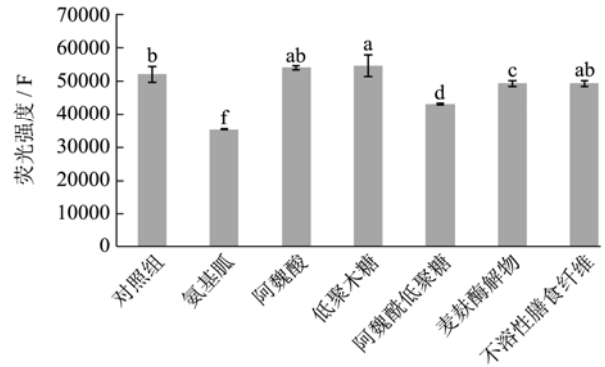


图 6 抑制模型组荧光产物的生成量

Fig.6 Levels of fluorescent products generated in the inhibition model group

从图 6 中检测结果可以看出,阿魏酸、低聚木糖和不溶性膳食纤维组的荧光产物生成量没有显著差异,而阿魏酸、不溶性膳食纤维组与空白对照组没有显著性差异,证明这三组物质对 AGEs 中荧光产物没有抑制作用。阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物对荧光产物均有不同程度的抑制效果,其中阿魏酰低聚糖对 AGEs 中荧光产物的抑制率达到了 17.33%,麦麸酶解物抑制率为 5.38%,而阳性对照组氨基胍组对荧光产物的抑制率为 31.97%。

2.3 抑制模型中非荧光产物 CML 的生成量

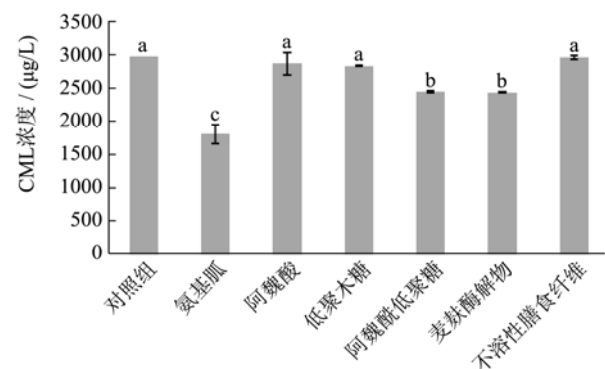


图 7 抑制模型组 CML 的生成量

Fig.7 Amount of generated CML in the inhibition model group

从图 7 中结果可以看出,阿魏酰、低聚木糖和不溶性膳食纤维组对 CML 的生成没有抑制效果,与对照组没有显著性差异,阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物组对 CML 都具有抑制效果,其中阿魏酰低聚糖组的抑制率达到了 17.64%,麦麸酶解物组达到了 18.12% ($p>0.05$)。

2.4 抑制模拟体系反应前后可用赖氨酸的含

量的测定

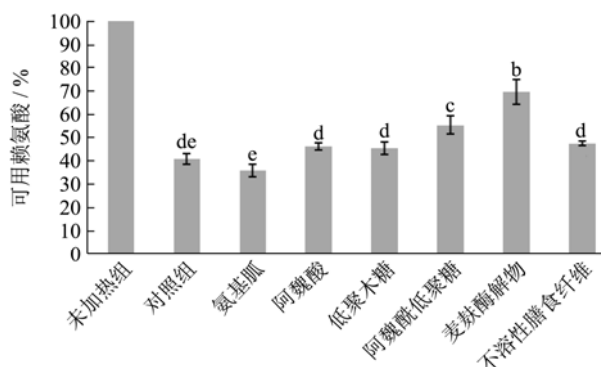


图8 抑制模型组的可用赖氨酸

Fig.8 Concentrations of available lysine in the inhibition model group

从图8中可以看出,与未加热组相比,各组中的可用赖氨酸都明显的减少了($p < 0.05$),表明了蛋白糖化反应的进行。各组之间比较可知,阿魏酸、低聚木糖和不溶性膳食纤维组与对照组蛋白糖化程度相当且较阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物组高;而阿魏酸、低聚木糖和不溶性膳食纤维组和对照组之间生成的荧光产物和CML量也没有显著性差异^[19,20]。由AGEs的生成情况可以看出,阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物组的蛋白糖化反应程度较阿魏酸、低聚木糖和不溶性膳食纤维组低,相应的可用赖氨酸较多,而且荧光产物和非荧光产物CML量相对其他三组少。由此可以推测出,麦麸酶解物和阿魏酰低聚糖组可能是通过减少参与糖化反应的赖氨酸的量来达到抑制AGEs的效果。

2.5 抑制模拟体系反应前后糖的含量测定

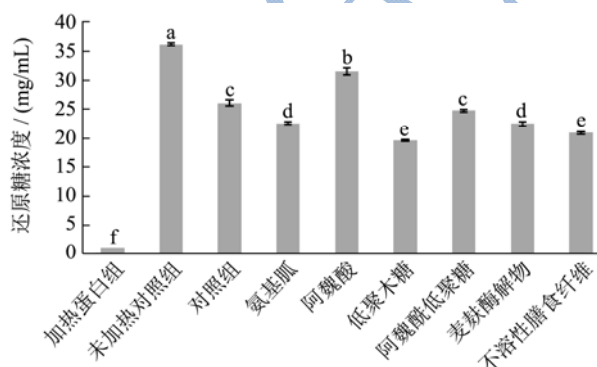


图9 抑制模型组的还原糖含量

Fig.9 Reducing sugar content in the inhibition model group

如图9所示,从加热蛋白组可以看出反应羰基主要来自与碳水化合物(即可用还原糖)而非蛋白质;与最初还原糖含量(未加热对照组)相比,所有经过加热后的反应组都明显的消耗了还原糖,其中阿魏酰低聚糖组和对照组的还原糖剩余量之间没有显著差异

($p > 0.05$);除了阿魏酸组剩余的还原糖的含量高于对照组外,其它抑制组剩余还原糖的含量都和对照组无显著差异或者低于对照组。而阿魏酸组的剩余还原糖较其他组别多,可能是因为阿魏酸抑制了还原糖的自氧化生成活性羰基化合物这一过程,而这一过程产生的活性羰基化合物的量较少,因而阿魏酸基本不能抑制AGEs。

3 结论

本文选取了从麦麸中提取得到的阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物对牛血清蛋白-葡萄糖模拟体系中AGEs的生成进行抑制。结果显示,阿魏酰低聚糖和麦麸酶解物对AGEs具有一定的抑制效果,其对AGEs中荧光产物的抑制率分别为14.49%和5.75%,对羧甲基赖氨酸的抑制率分别为18.16%和16.59%。抑制途径主要是通过介导蛋白的糖基化过程中赖氨酸的含量来达到抑制效果的,可能途径包括:抑制赖氨酸和还原糖反应成Amadori产物及活性羰基和赖氨酸生成CML两方面。

参考文献

- [1] Fatima S, Jairajpuri D S, Saleemuddin M. A procedure for the rapid screening of Maillard reaction inhibitors [J]. J. Biochem. Biophys. Methods, 2008, 70(6): 958-965
- [2] Nenna A, Nappi F, Chello M, et al. Targeting advanced glycation end products in cardiac surgery: the unexplored alternative [J]. Research in Cardiovascular Medicine, 2016, 5(2): 31707-31718
- [3] Li Y, Sy L, Li F, et al. Acute and sub-chronic toxicity of glucose-cysteine Maillard reaction products in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2015, 80: 271-276
- [4] Chao P C, Hsu C C, Yin M C. Analysis of glycative products in sauces and sauce-treated foods [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 262-266
- [5] Baynes J W. The Maillard hypothesis on aging: Time to focus on DNA [M]. Harman D. Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process, 2002
- [6] Durling L J K, Busk L, Hellman B E. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(4): 880-894

- [7] 李巨秀,房红娟,胡徽祥,等.食品中晚期糖基化末端产物的研究进展[J].食品科学,2011,32(21):293-297
LI Ju-xiu, FANG Hong-juan, HU Hui-xiang, et al. Research progress of advanced glycation end products in food [J]. Food Science, 2011, 32(21): 293-297
- [8] 袁小平.酶解麦麸制备阿魏酰低聚糖及其生物活性的研究[D].无锡:江南大学,2006
YUAN Xiao-ping. Ues enzymatic hydrolysis of wheat bran to prepare feruloyl oligosaccharides and study on its biological activity [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006
- [9] 欧仕益,张宁.麦麸酶解产品清除自由基的体外实验研究[J].营养学报,2005,27(1):25-29
OU Shi-yi, ZHANG Ning. Study on free radical scavenging by wheat bran enzymolysis products *in vitro* [J]. Journal of Nutrition, 2005, 27(1): 25-29
- [10] 赵冰,张可,王静,等.阿魏酸糖酯体外抗氧化性质的研究[J].食品科学,2010,32(21):94-97
ZHAO Bing, ZHANG Ke, WANG Jing, et al. Study on antioxidant properties of ferulic acid esters *in vitro* [J]. Food Science, 2010, 32(21): 94-97
- [11] 葛丽花.阿魏酰低聚糖的制备及其抗氧化性质的研究[J].哈尔滨:东北林业大学,2007
GE Li-hua. Prepare of feruloyl oligosaccharide and study on its antioxidant properties [J]. Harbin: Northeast Forestry University, 2007
- [12] Ho S C, Chang P W, Tong H T, et al. Inhibition of fluorescent advanced glycation end-products and n-carboxymethyllysine formation by several floral herbal infusions [J]. International Journal of Food Properties, 2013, 17(3): 617-628
- [13] Farsi D A, Harris C S, Reid L, et al. Inhibition of non-enzymatic glycation by silk extracts from a Mexican land race and modern inbred lines of maize (*Zea mays*) [J]. Phytotherapy Research: PTR, 2008, 22(1): 108-112
- [14] Tsuji-naito K, Saeki H, Hamano M. Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extracts on formation of advanced glycation end products [J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 854-859
- [15] Assar S H, Moloney C, Lima M, et al. Determination of N ϵ -(carboxymethyl) lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Amino Acids, 2009, 36(2): 317-326
- [16] Sun X, Tang J, Wang J, et al. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions [J]. Food Chem., 2015, 172: 802-807
- [17] Yoon S R, Shim S M. Inhibitory effect of polyphenols in *Houttuynia cordata* on advanced glycation end-products (AGEs) by trapping methylglyoxal [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 61(1): 158-163
- [18] 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
- [19] 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]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59(22): 12037-12046
- [20] Manuel Silvan J, Srey C, Ames J M, et al. Glycation is regulated by isoflavones [J]. Food & Function, 2014, 5(9): 2036-2042
- [21] Goodno C C, Swaisgood H E, Catignani G L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 115(1): 203-211
- [22] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. Analytical Biochemistry, 2005, 339(1): 69-72