

水相体系中 Amadori 化合物的合成及检测方法研究

李 硕¹, 张 建², 张连富^{*1,2,3}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003; 3. 北京工商大学 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100048)

摘要: Amadori 化合物 (Amadori Compounds, ACs) 是美拉德反应早期形成的稳定产物, 普遍存在于热加工处理的蔬菜和水果等制品中, 对产品品质有重要影响。在已经完成的 8 种 ACs 合成研究基础上, 建立水相体系中合成 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖 (Fru-Pro)、1-脱氧-1-L-丝氨酸-D-果糖 (Fru-Ser)、1-脱氧-1-L-苏氨酸-D-果糖 (Fru-Thr) 和 1-脱氧-1-L-甘氨酸-D-果糖 (Fru-Gly) 4 种 ACs 组分, 经超高效液相色谱-串联四级杆质谱 (UPLC-MS/MS)、核磁共振 (NMR) 等手段表征后, 确定其分别为 Fru-Pro ($C_{11}H_{19}NO_7$, MW: 277), Fru-Ser ($C_9H_{17}NO_8$, MW: 267), Fru-Thr ($C_{10}H_{19}NO_8$, MW: 281), Fru-Gly ($C_8H_{15}NO_7$, MW: 237)。采用液质联用仪建立了同步测定全部 12 种 ACs 的方法, 并对该方法进行了方法学验证, 结果表明 12 种 ACs 在检测范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 对目标物的分离效果好, 灵敏度高。最后对市场上 13 种果蔬干进行 ACs 含量的检测, 结果显示该方法检测效果好, 可以检测出产品中所含的 ACs。

关键词: 美拉德反应; Amadori 化合物; 超高效液相色谱-串联四级杆质谱 (UPLC-MS/MS); 核磁共振 (NMR)

中图分类号: TS205.1 文章编号: 1673-1689(2020)07-0059-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.07.009

Synthesis and Detection Methods of Amadori Compounds in Aqueous System

LI Shuo¹, ZHANG Jian², ZHANG Lianfu^{*1,2,3}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 3. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Amadori compounds (AC) are stable products formed in the early stage of Maillard reaction. They are commonly found in heat processed vegetables, fruits and other food products and have an important impact on food quality. In the previous study, we synthesized 8 AC and this paper aimed to establish the synthesis of 1-deoxy-1-L-proline-D-fructose (Fru-Pro), 1-deoxy-1-L-serine (Fru-Ser), 1-deoxy-1-L-threonine-D-fructose (Fru-Thr), and 1-deoxy-1-L-glycine-D-fructose (Fru-Gly) in the aqueous systems. Four purified AC were determined to be Fru-Pro ($C_{11}H_{19}NO_7$, MW: 277), Fru-Ser ($C_9H_{17}NO_8$, MW: 267), Fru-Thr ($C_{10}H_{19}NO_8$, MW: 281) and Fru-Gly ($C_8H_{15}NO_7$, MW: 237),

收稿日期: 2018-12-14

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFD0400902); 江苏省重点研发计划项目(BE2017374)。

* 通信作者: 张连富(1967—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能性食品研究。E-mail: lianfu@jiangnan.edu.cn

respectively, by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and nuclear magnetic resonance(NMR). In addition, an UPLC-MS/MS method was developed for the simultaneous determination of 12 AC. The results showed that the recovery, precision, and linearity data were satisfactory. Finally, the AC contents of 13 dried fruits and vegetables on the market were tested. The results showed that the method had good detection capacity and could detect AC contained in the products.

Keywords: Maillard reaction, Amadori compound, ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS), nuclear magnetic resonance(NMR)

美拉德反应是含氨基的化合物与含有羰基的化合物之间发生的一系列复杂的化学反应,最终生成棕色或黑色的物质类黑精^[1]。一般认为美拉德反应可以分为初级、中级、高级 3 个阶段,而阿玛多利化合物(Amadori Compounds, ACs)为其初级反应所形成的稳定产物^[2]。ACs 纯品一般为白色或黄色的固体,易溶于水和甲醇,本身没有气味,但却是重要的非挥发性香味前体物质^[3]。美拉德反应普遍存在于食品的加工、储藏与烹饪过程中,对产品的风味、色泽、口感等有着重要影响^[4]。余佳浩等^[5]研究表明,ACs 可以有效抑制血管紧张素转化酶的活性,从而有效抑制心脑血管疾病产生。此外,ACs 还可以有效清除化学体系中活性氧自由基^[6]。而美拉德反应中后期产物虽然对食品的风味、色泽等有重要作用,但同时也会产生一些有害物质,例如糖基化最终产物 AGEs,过量的 AGEs 积累会导致一些慢性病的发生^[7-8],因此调控美拉德反应的进程尤为重要。

作者前期已经成功在有机相中合成了 8 种 ACs,并利用液质联用的方法建立了 8 种 ACs 定性定量检测的方法,但由于食品中氨基酸种类较多,每种氨基酸在适当的条件下都有可能形成 ACs,因此这个检测方法并不能真实地反应食品中 ACs 的含量,而且有机相中的优化条件并不适用于食品体系,不能指导工业化生产。所以探究如何在水相中合成更多种的 ACs,并建立多种 ACs 定性定量检测的方法尤为重要。

作者在水相体系中合成 4 种 ACs 的方法,建立 12 种 ACs 的 UPLC-MS/MS 同步检测的方法,并对该方法进行方法学验证,使其能更加真实地代表食品体系中美拉德反应产生 ACs 的总量,检测了市售产品中 ACs 的含量,验证了该方法的适用性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、甘氨酸、D-葡萄糖、氢氧化钠、浓盐酸、氨水、甲酸、甲酸铵、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;C₁₈ 固相萃取小柱:美国 Sepax 科技有限公司产品;Dowex 50WX4 氢型(200~400 目)离子交换树脂:百灵威科技有限公司产品;色谱级甲醇和乙腈:美国 Tedia 公司产品;超纯水,实验室自制。

表 1 不同产地与品种的果蔬干样品

Table 1 Dried fruits and vegetables samples from different origins and varieties

编号	产品	产地
1	椰枣	阿联酋
2	黑蒜	中国
3	波罗蜜干	中国
4	马奶子葡萄干	中国
5	桂圆	中国
6	干枣	中国
7	奇异果干	中国
8	圣女果干	中国
9	芒果干	中国
10	枸杞干	中国
11	干枣	中国
12	葡萄干	中国
13	西梅干	美国

1.2 仪器与设备

1525 高效液相色谱仪(蒸发光检测器)、MALDI SYNAPT MS 超高效液相串联四极杆飞行时间质谱

联用仪、UPLC-TQD 超高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪:美国 Waters 公司产品;Aduance III 400 MHz 全数字化核磁共振波谱仪:德国布鲁克 AXS 有限公司产品;RV06-ML 型旋转蒸发器:德国 IKA 公司产品;超纯水仪:美国密理博公司产品;HJ-6 多头磁力搅拌器:金坛市医疗仪器厂产品;电子天平:上海梅特勒-托利多仪器商贸公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 ACs 的合成 作者前期合成的 8 种 ACs 参照以下方法进行^[9]。Fru-Val (Fru-Leu、Fru-His、Fru-Ala、Fru-Met、Fru-Phe) 化合物按照以下方法进行合成。300 mmol/L 的 D-葡萄糖溶解在 400 mL 的甲醇-N,N-二甲基甲酰胺溶液中(体积比 1:1),加入 400 mmol/L 的氨基酸,然后制备好的溶液在 80 °C 下回流 3 h。加入 90 mmol/L 丙二酸,在 80 °C 下继续回流 2 h 直至浅棕色,用旋转蒸发器将有机相浓缩至 50 mL 左右。

Fru-Arg 化合物按照以下方法进行合成。L-精氨酸溶于由 30 mL 吡啶和 30 mL 冰醋酸组成的混合溶剂中,室温下搅拌 1.0~1.5 h,将氯化锌加入混合物中,随后 D-葡萄糖缓慢加入溶液中,在 30 °C 下搅拌 5 d。

Fru-Glu 化合物按照以下方法进行合成。准确称取氢氧化钾完全溶解在 240 mL 无水甲醇中,将研磨后的谷氨酸钠添加到溶解有氢氧化钾的无水甲醇中,将液体转移到盛有 D-葡萄糖的 250 mL 烧瓶中,75 °C 回流 35 min,用冰水冷却至室温,将有机相旋蒸浓缩至 50 mL,然后在-20 °C 冷冻 3~4 h,过滤取上清液加入预冷的-18 °C 丙酮沉淀,真空抽滤并用丙酮两次洗涤滤饼。将所得的固体溶于 30 mL 无水甲醇中,加入 1 mL 乙酸,在 75 °C 条件下回流 20 min。

将上述反应混合物冰水浴冷却至室温,过滤取上清液加入预冷的-18 °C 丙酮沉淀,在 10 000 r/min, 4 °C 条件下离心 10 min,收集沉淀物,用无水甲醇复溶,再用丙酮沉淀,反复重结晶几次,用一定量的超纯水溶解晶体并冷冻干燥,得到白色固体。

Fru-Pro (Fru-Ser、Fru-Thr、Fru-Gly) 化合物按照以下方法进行合成。分别称取 L-脯氨酸 5.756 5 g(0.05 mol)与 D-葡萄糖和 9.008 g(0.05 mol)溶于 50 mL 去离子水中,置于磁力搅拌器中搅拌,使其完全溶解。将溶液 pH 调至 7.4。然后将溶液转移至

120 mL 耐压瓶中,于 100 °C 油浴锅中反应 60 min。反应结束后,立即放入冰水中冷却。在 50 °C 旋转蒸发器中蒸发掉反应溶液中的水。其余 3 种氨基酸根据溶解度差异,分别配置成不同质量浓度的溶液,L-丝氨酸反应溶液、L-苏氨酸反应溶液、甘氨酸反应溶液分别配置成 0.285 3、0.149 6、0.255 2 mg/mL。

1.3.2 ACs 的纯化 加入少量水溶解旋蒸后固体,用适量活性炭除去反应溶液中的色素等杂质后,将其转移至填充有 Dowex 50WX4 树脂的柱中,用去离子水冲洗掉葡萄糖等杂质,直至 TTC 测试显示阴性为止。然后用 0.2 mol/L 的氨水溶液洗脱树脂,收集 TTC 测试呈阳性的洗脱液,每 10 mL 洗脱液收集在一个离心管中。随后用 HPLC-ELSD 检测,收集只含有 ACs 的洗脱液。所有洗脱液合并后进行冷冻干燥得到 ACs 固体粉末。

其中,HPLC-ELSD 所使用的色谱柱为 XBridge BEH Amide(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm)。柱温:35 °C,气体流量:1.5 L/min;流量:1 mL/min,进样量:20 μ L。该方法流动相分别为乙腈(A相)和 10 mmol/L 甲酸铵水溶液(B相),采用梯度洗脱的方法进行测定,流动相 A 梯度变化如下:0 min 到 5 min,A 相由体积分数 80% 变为 70% A;5 min 到 10 min,A 相由体积分数 70% 变为 65%;10 min 到 11 min,A 相由体积分数 65% 变为 80%;11 min 到 15 min,A 相由体积分数 65% 变为 80%,总时间为 15 min。

1.3.3 ACs 的 UPLC-MS/MS 分析 采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪(UPLC-MS/MS)进行分析鉴定。

其中色谱条件如下,色谱柱:CORTECS C18(1.6 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm);柱温:35 °C,流量:0.3 mL/min;进样量:1 μ L;流动相 A 相为乙腈,B 相为体积分数 0.1% 甲酸。采用梯度洗脱的方法,流动相 A 梯度变化如下:0 min 到 2 min,A 相为体积分数 0%,2 min 到 5 min,A 相由体积分数 0% 变为 10%,5 min 到 7 min,A 相由体积分数 10% 变为 40%,7 min 到 8 min,A 相由体积分数 40% 变为 80%,8 min 到 8.10 min,A 相由体积分数 80% 变为 0%,8.10 min 以后,A 相维持体积分数 0%,总共运行 10 min。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子电离模式(ESI+),离子源温度:120 °C;脱溶剂气温度:400 °C;毛细管电压:2.5 kV;脱溶剂气流量:600 L/h;锥孔电压:20 V;锥孔气流量:50 L/h;碰撞能量:

6.0 eV; m/z : 100~1 000; 检测电压: 1 600 V; 高纯氮气(99.999%)。使用 Mass Lynx 软件对数据进行处理。

1.3.4 ACs 的 NMR 分析 称取 10 mg 产物溶于氖水中。25 °C(298K)条件下,在配备有 5 mm PABBO 探针的 Bruker DRX 400 MHz 波谱仪上进行操作,得到 ^1H -NMR 谱和 ^{13}C -NMR 谱后,利用 MestReNova 软件处理数据。

1.3.5 单标准储备溶液的配制 分别准确称量适量 Fru-Arg, Fru-Phe, Fru-His, Fru-Met, Fru-Glu, Fru-Leu, Fru-Val, Fru-Ala, Fru-Pro, Fru-Ser, Fru-Thr, Fru-Gly 12 种 ACs 的标准品于烧杯中,加入少量超纯水溶解,待完全溶解后,分别定容至 10 mL 容量瓶,所有储备液于 4 °C 冰箱中保存。

1.3.6 建立 UPLC-MS/MS 定性定量测定 ACs 的方法 利用超高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪对 ACs 进行定性定量分析。

液相条件:色谱柱:CORTECS C18(1.6 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm);流动相:A 相:乙腈,B 相:体积分数 0.1% 甲酸;柱温:35 °C,流量:0.3 mL/min;进样量:1 μL ,梯度洗脱程序:0 min B 相体积分数 100%,1 min 到 5 min,B 相由体积分数 100%变为 90%,5 min 到 6 min,B 相由体积分数 90%变为 50%,6 min 到 7 min,B 相由体积分数 50%变为 20%,7 min 到 9 min,B 相保持体积分数 20%,9.0 min 到 9.5 min,B 相由体积分数 20%变为 100%,9.5 min 到 13.0 min,B 相保持体积分数 100%,总运行时间为 13 min。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子电离模式(ESI $^{+}$),离子源温度:120 °C;脱溶剂气温度:400 °C;毛细管电压:2.5 kV;脱溶剂气流量:600 L/h;锥孔气流量:50 L/h; m/z :100~1 000;检测电压:1 600 V;高纯氮气(99.999%)。

1.3.7 方法学验证 方法学验证主要从线性范围、检测限(LOD)、定量限(LOQ)、回收率、精密度等方面出发。取各 ACs 标准品储备液用超纯水稀释成一系列浓度梯度。按上述液质方法测定。测定结果以标品质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标进行绘制标准曲线,并做线性回归分析。LOD 和 LOQ 方面主要稀释 ACs 标品,用液质检测其相应信号,以目标峰的信噪比为 10 时所对应的 ACs 质量浓度为 LOQ,以目标峰的信噪比为 3 时所对应的 ACs 质量浓度为 LOD。选取已知的 ACs 含量的模拟体系溶

液,分别添加/不添加 ACs 标品,比较加标组和不加标组 ACs 的差异,并计算相应的回收率。精密度的试验主要是同一个模拟体系样品溶液在 24 h 内间隔测定 5 次,比较所测样品质量浓度的相对标准偏差(RSD)。

1.3.8 市售果蔬干产品中 ACs 的检测 首先采用 GB 5009.3-2016 对市售 13 种果蔬干产品进行水分含量的测定,计算产品的水分质量分数。

分别称取 13 种果蔬干产品各 5 g,加入 50 mL 超纯水打浆,倒入离心管中,超声波提取 20 min,10 000 r/min 条件下冷冻离心 10 min,取上清液定容至 100 mL,待净化使用。选取固相萃取小柱,先用 3 mL 甲醇活化小柱,再用 3 mL 超水平衡小柱,取 2 mL 上清液至 C18 小柱中,用 3 mL 超纯水洗脱,收集洗脱液并定容至 10 mL,随即用 1.3.6 方法 UPLC-MS/MS 测定产品中的 ACs 含量。

1.3.9 数据统计分析 所有数据使用 SPSS 19.0 软件处理,以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式表示。所有实验重复 3 次, $p<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 ACs 的合成与纯化

在水相中合成 4 种 ACs,无污染,并且适用于大规模生产。美拉德反应产物的纯化分离主要采用 Dowex 50WX4 氢型离子交换树脂,葡萄糖不与树脂结合,直接被去离子水冲洗掉,氨基酸和 ACs 与树脂结合后,被氨水先后洗脱下来;随后用 TTC 进行检测,当洗脱液中含有 ACs 时,使无色的氧化型的 TTC 还原成红色的还原型的 TTC,使样品染成红色;由于 ACs 对紫外没有吸收,因此选用对绝大部分物质都有响应的蒸发光检测器对洗脱液进行检测,进一步分离氨基酸与 ACs,选择只含 ACs 的洗脱液并将其合并冻干,得到白色或者淡黄色粉末,由于 ACs 极易容易吸潮,所以应隔绝空气保存。

2.2 UPLC-MS/MS 分析 ACs

制备后得到的 ACs 纯品配成约 1 mg/mL 的标品溶液,使用 UPLC-MS/MS 进行分析。结果表明,4 种 ACs 的纯度均高于 98%。以 Fru-Pro 为例,根据其分子结构及质谱结果分析,其在液质中可能的碎裂规律如图 1 所示。该标品的总离子流色谱图(图 2(a))中仅存在一个单峰,其保留时间为 1.14 min,另外图 2(b)为 Fru-Pro 的质谱图。标品在质谱中的碎

裂规律基本与苑衡等人^[10]的研究一致。从质谱图中可以看出,4种ACs的质荷比(m/z)分别为Fru-Pro: 278; Fru-Ser: 268; Fru-Thr: 282; Fru-Gly: 238。其中4种化合物的碎片离子 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H-2H_2O]^+$ 、 $[M+H-3H_2O]^+$ 也分别在各自的质谱图中观察到,以 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子信号最强,这与Cui等人^[11]的研究一致。从Fru-Pro质谱图中可以看出, $[M+H-H_2O]^+$ 和 $[M+H-2H_2O]^+$ 碎片离子的信号峰最强,这也表明了ACs在质谱中极容易脱掉水。液质结果表明4种ACs的分子式和相对分子质量分别为Fru-Pro ($C_{11}H_{19}NO_7$, 277), Fru-Ser ($C_9H_{17}NO_8$, 267), Fru-Thr ($C_{10}H_{19}NO_8$, 281), Fru-Gly ($C_8H_{15}NO_7$, 237)。

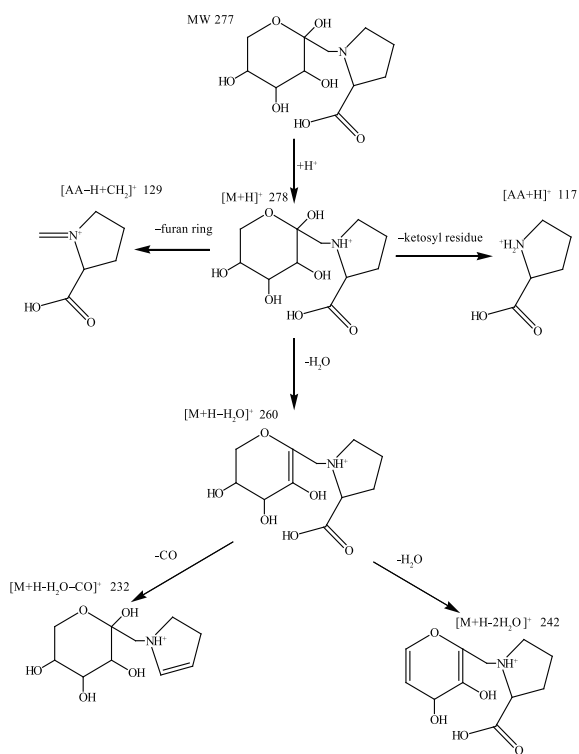


图1 UPLC-MS/MS谱中Fru-Pro片段

Fig. 1 Fru-Pro fragment in UPLC-MS/MS spectrum

2.3 NMR 分析 ACs

Fru-Pro的 1H -NMR和 ^{13}C -NMR见图3。由于ACs在水中可进行互变异构,糖骨架可形成 α -呋喃结构、 β -呋喃结构、 α -吡喃结构和 β -吡喃结构,共有5种同分异构体,根据环张力和取代基位阻的分析,4种异构体的稳定性顺序为: β -吡喃环> α -呋喃环> β -呋喃环> α -吡喃环。5种同分异构体如图4所示。

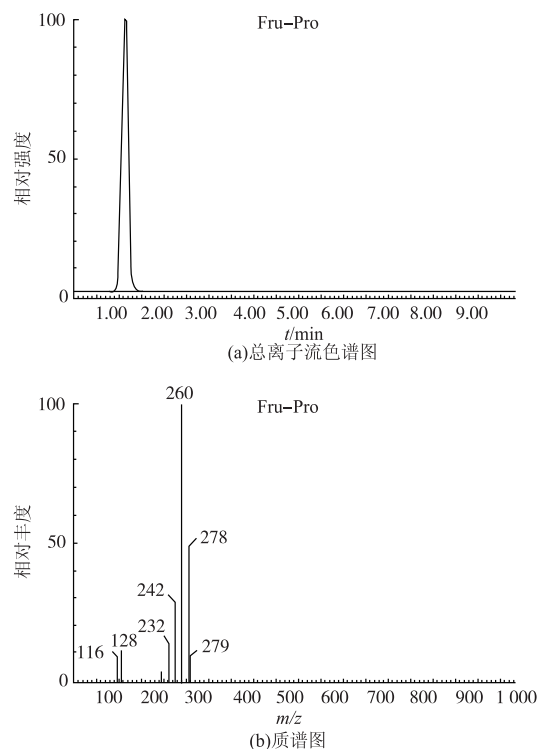


图2 Fru-Pro的总离子流色谱图和质谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram and mass spectrometry of Fru-Pro

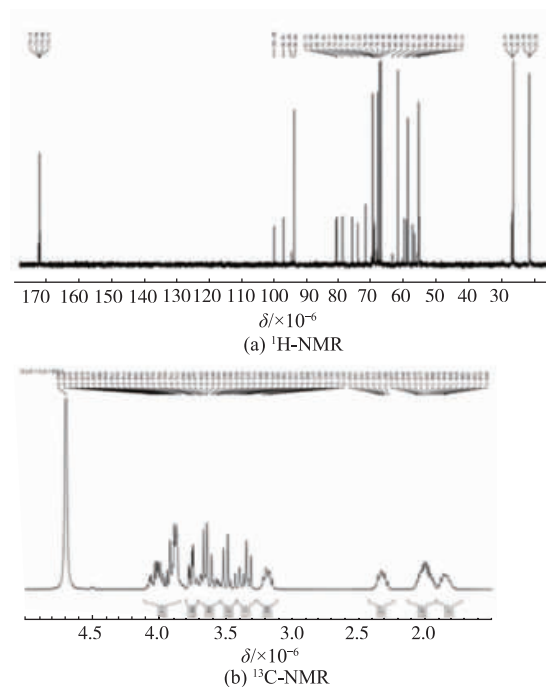


图3 Fru-Pro的 1H -NMR与 ^{13}C -NMR

Fig. 3 1H -NMR and ^{13}C -NMR of Fru-Pro

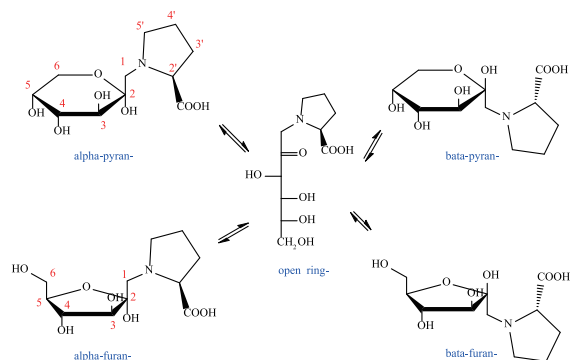


图4 Fru-Pro 的 5 种同分异构体

Fig. 4 Five isomers of Fru-Pro

^{13}C -NMR 上可把峰分为 11 组, 每组峰基本由不同强度的 4 个峰组成, 强度比约为 10:3:2:1, 按每组 4 个峰分别对应 4 种异构体, 则相同碳位的信号峰比较相近。糖环上的碳因五元环和六元环的环张力有较大差异, 所以 3-5 位的碳的信号峰位移差别明显, 根据以上分析, 将每组峰根据化学位移归属至各个碳位, 再根据各组内峰的强弱归属至不同的异构体, 分析得出化学位移归属, 结果见表 2。

表 2 Fru-Pro 的化学位移分析

Table 2 Chemical shift analysis of Fru-Pro

碳位	β -吡喃结构	α -呋喃结构	β -呋喃结构	α -吡喃结构
2'	71.48	70.93	71.03	71.95
3'	28.28	28.65	28.77	28.69
4'	23.35	23.25	23.29	23.25
5'	57.38	57.23	57.26	—
-COOH	173.86	173.72	174.14	173.96
1	60.7	59.32	58.66	57.97
2	95.64	98.91	101.80	96.45
3	69.98	80.78	77.81	71.21
4	69.4	73.68	76.11	70.35
5	68.9	82.54	82.71	70.3
6	63.75	61.78	61.03	65.46

2.4 UPLC-MS/MS 测定方法的建立

超高效液相色谱串联质谱-质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 以其高分辨率和高灵敏度被广泛用于多种有机化合物的同步快速分析。作者建立了一种 UPLC-MS/MS 的方法用于同步分析 12 种 ACs 化合物。12 种 ACs 的色谱分离使用 CORTECS C18 柱, 流动相分别为乙腈(A)和甲酸(B)。比较了不同的流动相梯度对 12 种 ACs 的分离效果和保留时间的影响, 并确立了最终的液相条件。质谱方面, 根据 12 种 ACs 在质谱中的碎裂规律确立了其相应的母

离子和子离子, 采用 MRM 进行同步分析。根据先前的研究, 正离子模式下的质谱扫描的结果要优于负离子模式, 因为氨基和羧基等在正离子模式下更容易稳定。作者也发现 12 种 ACs 在正离子模式下有着更好地响应。选择信号最强的碎片离子作为子离子, 根据 12 种化合物的质谱结果, 确立了其最佳的母离子和子离子为 Fru-Arg: 337 $\rightarrow$ 114, Fru-Glu: 310 $\rightarrow$ 148, Fru-His: 318 $\rightarrow$ 190, Fru-Met: 312 $\rightarrow$ 294, Fru-Leu: 294 $\rightarrow$ 230, Fru-Val: 280 $\rightarrow$ 216, Fru-Ala: 252 $\rightarrow$ 234, Fru-Phe: 328 $\rightarrow$ 292, Fru-Pro: 278 $\rightarrow$ 260; Fru-Ser: 268 $\rightarrow$ 250; Fru-Thr: 282 $\rightarrow$ 264; Fru-Gly: 238 $\rightarrow$ 220。随后, 对 12 种 ACs 的锥孔电压和碰撞能量进行优化, 结果如表 3 所示。在 12 种 ACs 的质谱图中, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 和氨基酸的氢离子加合物都是其特征子离子, 这和文献报道一致^[12]。另外, $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ 的碎片离子也表现较强的信号。随后, 对该 UPLC-MS/MS 方法进一步进行了方法学验证。

表 3 用于多反应监测的 ACs 的 MS 参数

Table 3 MS parameters of ACs for multiple reaction monitoring

成分	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	锥孔电压/V	停留时间/ms	碰撞能量/eV
Fru-Arg	337	114	30	0.022	20
Fru-Glu	310	148	15	0.022	20
Fru-His	318	190	20	0.022	16
Fru-Met	312	294	15	0.022	10
Fru-Leu	294	230	15	0.022	20
Fru-Val	280	216	18	0.022	22
Fru-Ala	252	234	15	0.022	15
Fru-Phe	328	292	18	0.022	16
Fru-Pro	278	260	25	0.022	10
Fru-Ser	268	250	17	0.022	13
Fru-Thr	282	264	17	0.022	13
Fru-Gly	238	220	15	0.022	13

如表 4 所示, 4 种化合物的标准曲线的相关性系数 (R^2) 均大于 0.99。仪器检测灵敏度主要通过其对标品的检测限 (LOQ) 和定量限 (LOQ) 来评估, 结果见表 4。本方法有着较好的回收率, 这可能是因为模拟体系中样品基质比实际食品体系简单, 因此目标物更容易保留。精密度实验通过样品的 5 次不同时间段测定值的相对标准偏差来评估。这些数据均

表 4 ACs 的 UPLC-MS / MS 方法的分析特征

Table 4 Analytical characteristics of ACs by UPLC-MS / MS method

成分	线性范围/(ng/mL)	相关系数(R^2)	LOD/(ng/g)	LOQ/(ng/g)	回收率/%	RSD/%
Fru-Arg	520.8~8 333.3	0.995	8.3	12.4	88.9	4.91
Fru-Glu	130.2~8 333.3	0.999	6.5	13.0	87.4	6.26
Fru-His	130.2~8 333.3	0.998	7.8	10.4	86.3	7.23
Fru-Met	130.2~8 333.3	0.993	7.2	11.7	89.5	8.78
Fru-Leu	130.2~4 166.7	0.998	6.2	13.2	87.7	3.56
Fru-Val	130.2~8 333.3	0.993	8.3	9.8	89.8	4.39
Fru-Ala	130.3~8 333.3	0.993	6.7	11.5	86.3	8.64
Fru-Phe	130.2~4 166.7	0.994	6.3	10.3	89.1	10.02
Fru-Pro	140.1~8 966.7	0.993	6.5	10.8	86.3	5.44
Fru-Ser	201.8~1 2916.7	0.991	6.2	10.3	85.2	10.23
Fru-Thr	187.5~12 000.0	0.995	6.5	15.5	87.9	7.89
Fru-Gly	216.1~13 833.3	0.998	6.3	12.6	86.9	9.90

表明作者所建立的方法具有良好的重现性,并适合实际体系的 ACs 的分析。

2.5 市售果蔬干产品中 ACs 质量分数的检测

由表 5 可以看出,13 种果蔬干产品中含有大量的 ACs 化合物,这可能是因为果蔬产品在加工过程中经过热处理而产生的,其中,枸杞、马奶子和桂圆中 ACs 质量分数最多,分别达到了 10.73,6.80,5.36 mg/g,而 ACs 质量分数较低的有奇异果,圣女果,芒果干和西梅干等。而每种果蔬干产品中所含 ACs 的

种类和含量各不相同,这可能是由于每种果蔬中本身所含有的氨基酸与还原糖种类不同,并且每种果蔬干产品的加工方式不同所导致。桂圆中含量较高的氨基酸有谷氨酸和丙氨酸,马奶子中含量最高的氨基酸为谷氨酸,葡萄干中氨基酸含量最高的为精氨酸,在产品中这些氨基酸相对应的 ACs 产物也是最多的。从表 5 可以看出,ACs 质量分数较高的果蔬干产品中,他们的水分质量分数也较低,这有可能说明低水分活度更容易使产生大量的 ACs。

表 5 果蔬干产品中 ACs 的质量分数

Table 5 ACs content in commercially available dried fruits and vegetables

编号	水分质量分数/%	Fru-Arg	Fru-Phe	Fru-His	Fru-Met	Fru-Glu	Fru-Leu	Fru-Thr	Fru-Val	Fru-Pro	Fru-Ser	Fru-Ala	Fru-Gly
1	2.56±0.01	103.55±0.14	27.72±3.56	5.16±0.75	2.93±0.01	52.14±2.33	8.97±1.08	33.58±2.02	36.01±1.21	41.73±2.28	80.51±1.09	667.51±4.34	101.6±3.24
2	10.6±0.01	2 070.58±0.23	56.9±1.69	3.9±2.12	3.19±0.18	19.41±1.15	9.78±0.01	81.35±1.72	24.3±0.30	—	26.32±1.39	157.66±3.07	167.82±4.18
3	0.883±0.01	1 187.39±1.34	57.57±1.11	82.95±2.43	4.35±1.08	29.97±1.91	282.35±3.35	83.5±4.15	98.93±4.28	110.83±5.99	174.98±2.93	436.78±5.55	64.19±2.83
4	2.59±0.01	4 404.62±0.45	110.39±2.41	139.1±0.38	8.67±0.32	125.17±5.93	514.14±6.13	137.69±1.00	46.39±0.88	469.98±8.24	73.84±1.65	712.2±3.66	53.07±1.15
5	5.61±0.01	240.89±4.13	93.9±5.74	12.17±3.24	3.02±0.09	1 564.32±7.43	943.89±7.61	121.12±6.49	80.99±1.16	55.75±1.32	225.24±4.32	1 797.97±8.61	222.22±0.92
6	7.33±0.01	100.28±2.65	21.82±1.93	5.53±0.51	3.08±0.42	4.15±0.39	9.43±0.31	8.31±0.09	—	—	—	—	—
7	4.41±0.01	7.74±0.05	19.29±3.25	1.46±0.02	2.99±0.02	4.03±0.20	9.14±0.28	—	—	—	—	—	—
8	5.52±0.01	63.07±1.82	71.84±5.16	88.75±1.92	3.02±0.21	472.55±3.95	9.25±0.71	65.56±1.11	8.74±0.21	—	—	28.18±0.5	—

续表 5

mg/g

编号	水分 质量分 数/%	Fru-Arg	Fru-Phe	Fru-His	Fru-Met	Fru-Glu	Fru-Leu	Fru-Thr	Fru-Val	Fru-Pro	Fru-Ser	Fru-Ala	Fru-Gly
9	4.43± 0.01	370.65± 3.41	19.29± 0.15	3.36±3.57	2.99± 0.02	4.03±0.02	9.14±0.83	13.02± 0.38	—	—	—	—	—
10	3.26± 0.01	2 443.84± 2.58	23.86± 1.25	427.37± 0.04	10.43± 0.35	281.49± 2.20	541.66± 5.40	679.64± 6.34	598.17± 6.77	1 781.95± 5.65	2 059.46± 7.85	1 840.03± 6.97	44.22± 1.19
11	5.59± 0.01	473.86± 3.17	44.94± 3.71	105.96± 0.34	3.36± 0.66	38.31± 1.17	102.8± 2.09	82.95± 2.15	87.63± 1.83	382.46± 3.71	87.9±1.22	22.51± 1.15	4.92± 0.43
12	4.49± 0.01	1 709.54± 2.29	23.25± 1.21	126.82± 2.41	2.99± 0.18	15.58± 2.12	35.51± 1.42	64.14± 1.19	—	14.93±1.01	—	—	—
13	5.32± 0.01	4.37±0.05	21.84± 0.21	3.78±1.59	3.42± 0.22	4.07±0.01	9.23±0.77	45.97± 1.25	50.81± 1.26	111.89± 2.33	24.42± 0.76	225.78± 2.23	41.34± 0.22

3 结 语

通过在水相中加热葡萄糖与氨基酸的美拉德反应,制备了 Fru-Pro, Fru-Ser, Fru-Thr, Fru-Gly。通过大孔树脂、HPLC-ELSD、UPLC-MS/MS 和 NMR 鉴定并表征了 4 种 ACs,纯度均在 98% 以上,其分子

式及相对分子质量分别为 Fru-Pro ($C_{11}H_{19}NO_7$, MW: 277), Fru-Ser ($C_9H_{17}NO_8$, MW: 267), Fru-Thr ($C_{10}H_{19}NO_8$, MW: 281), Fru-Gly ($C_8H_{15}NO_7$, MW: 237)。建立了液质同步检测 12 种 ACs 的方法,该方法目标物分离度高,分离时间短,经方法学验证,该方法线性关系好,灵敏度高,更能真实地反应食品体系中 ACs 的含量。

参考文献:

- [1] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 美拉德反应及其在食品风味中的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 27-30.
- [2] LIU Y, WANG X Y, WANG S, et al. Simultaneous quantification of ten Amadori compounds in tobacco using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(4): 849-857.
- [3] 崔韬, 毛多斌, 许志杰, 等. Amadori 化合物研究进展[J]. 轻工科技, 2010, 26(12): 29-30.
- [4] 章银良, 蔡亚玲, 李鑫, 等. 美拉德反应产物功能特性应用研究进展[J]. 中国调味品, 2018(1): 195-200.
- [5] YU J H, ZHANG S Q, ZHANG L F, et al. Amadori compounds as potent inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) and their effects on anti-ACE activity of bell peppers[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 622-630.
- [6] DU Q Q, LIU S Y, XU R F, et al. Studies on structures and activities of initial Maillard reaction products by electrospray ionisation mass spectrometry combined with liquid chromatography in processing of red ginseng [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 832-838.
- [7] 李梅. 食品中晚期糖基化终末产物的生物毒性评价[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [8] 贾本盼, 袁晓金, 范智义, 等. 面包皮中水溶性晚期糖基化终产物对人曳小管上皮细胞的氧化损伤[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 136-141.
- [9] YU J H, ZHANG S Q, ZHANG L F. Evaluation of the extent of initial Maillard reaction during cooking some vegetables by direct measurement of the Amadori compounds[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98: 190-197.
- [10] 苑蓓. Heyns 化合物的质谱碎裂规律及其在 Maillard 反应中含量与变化研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [11] CUI H P, JIA C S, Khizar H, et al. Controlled formation of flavor compounds by preparation and application of Maillard reaction intermediate (MRI) derived from xylose and phenylalanine[J]. *RSC Advances*, 2017, 7: 45442-45451.
- [12] 彤霖. Maillard 反应中间体降低卷烟自由基作用的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.