

羧甲基赖氨酸在方便面中含量及其对雄性生殖和胚胎发育毒性的研究

孙建霞¹, 文罗娜², 张振华², 朱翠娟², 欧仕益², 白卫滨^{*2}

(1. 广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510090; 2. 暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘要: 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对市售 20 个品牌方便面中游离态和结合态羧甲基赖氨酸(CML)含量进行了定量分析,并以体外细胞培养评价了 CML 的雄性生殖毒性和胚胎发育毒性。市售方便面中,游离态 CML 质量分数为 0.39~0.80 mg/kg,结合态 CML 质量分数为 19.42~34.99 mg/kg。CML 作用于睾丸间质细胞 R2C 细胞 24 h,浓度在 1 mmol/L 以下对细胞存活率没有显著抑制作用,浓度在 2 mmol/L 以下对孕酮分泌量没有显著的抑制作用;CML 作用于胚胎干(ES)细胞 D3 和成纤维细胞 3T3 10 d,浓度在 4 mmol/L 以下对 3T3 细胞存活率没有显著影响,浓度在 0.5 mmol/L 以下对 D3 细胞存活率没有显著影响。根据市售方便面中的 CML 浓度评估 CML 的摄入量,常规食用方便面摄入的 CML 不会对这几种细胞的存活率和 R2C 细胞的孕酮分泌量产生显著抑制作用,可认为不会产生雄性生殖和胚胎发育毒性。

关键词: 羧甲基赖氨酸;酶联免疫吸附法;雄性生殖毒性;胚胎发育毒性

中图分类号: TS 217.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)07—0695—06

Analysis of the Content, Developmental Toxicity and Male Reproductive Toxicity of Nε-(Carboxymethyl) lysine in Instant Noodles

SUN Jianxia¹, WEN Luona², ZHANG Zhenhua², ZHU Cuijuan², OU Shiyi², BAI Weibin^{*2}

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China; 2. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) concentrations in instant noodles of 20 brands were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), then developmental and reproductive toxicity of CML were evaluated in vitro. Concentrations of CML in free form and bind form were 0.39~0.80 mg/kg and 19.42~34.99 mg/kg, respectively. No significant effect of CML was found on cell viability (CML ≤ 1 mmol/L) and progesterone secretion (CML ≤ 2 mmol/L) of R2C cells treated with CML for 24 h. Moreover, CML of concentration lower than 4 mmol/L has no significant effect on 3T3 cells treated with CML for 10 days, and CML of concentration lower than

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK01B03); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(Yq2013024); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目。

作者简介: 孙建霞(1978—), 女, 山东招远人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品营养研究。E-mail: jxsun1220@163.com

* 通信作者: 白卫滨(1978—), 男, 山东烟台人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品营养与安全性评价研究。E-mail: baiweibin@163.com

引用本文: 孙建霞, 文罗娜, 张振华, 等. 羧甲基赖氨酸在方便面中含量及其对雄性生殖和胚胎发育毒性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 695-700.

0.5 mmol/L has no significant effect on D3 cells treated with CML for 10 days. According to the concentrations of CML detected in the present study, CML would not inhibit the progesterone secretion of R2C cells or cell viability of R2C, 3T3, and D3 cells with regular intake of instant noodles. Thus, regular intake of instant noodles would not cause developmental or male reproductive toxicity induced by CML.

Keywords: Nε-(carboxymethyl) lysine, enzyme-linked immuno sorbent assay, male reproductive toxicity, developmental toxicity

晚期糖基化终末产物 (Advanced glycation end products, AGEs) 是指在非酶促条件下, 蛋白质、氨基酸、脂类或核酸等大分子物质的游离氨基与还原糖 (葡萄糖、果糖、戊糖等) 的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生的一组稳定的终末产物^[1]。AGEs 分为内源性和外源性两类, 内源性 AGEs 由生物体内的蛋白质和糖类发生糖化反应产生, 在高血糖或肾功能衰竭时易形成^[2]; 外源性 AGEs 则由人体从外部摄入^[1], 其中大部分经膳食摄入, 即食源性 AGEs^[3]。

过度摄入高 AGEs 的饮食会增强氧化应激、炎症反应, 并引发糖尿病及其并发症, 如伤口的愈合, AGEs 的积累还与阿尔兹海默并和动脉粥样硬化有关^[3-5]。羧甲基赖氨酸 (Nε-(carboxymethyl) lysine, CML) 是第一个从食品 (牛奶和奶制品) 中鉴定出的 AGEs 单体, 并被证实为各类日常食品中最为主要的一种 AGEs, 在食品加工和加热过程中均有生成, 且在生物体内分布广泛。因此, CML 常作为研究生物体内和食品中 AGEs 类物质的代表性研究对象^[6]。研究表明, CML 是 AGEs 的主要抗原表位, 并在糖尿病及其并发症, 以及衰老的发生和发展过程中起重要作用^[7]。CML 潜在的危害性已越来越受到食品科技界、医学界的广泛关注。膳食的 AGE 和内生的 AGE 会产生协同作用, 导致系统糖氧化负担、氧化压力和细胞活化, 增加靶组织对的易损性, 危害机体健康^[8], 但是尚无文献报道 CML 对于雄性生殖和胚胎发育的影响。

方便面基质中, CML 是以两种形式存在, 即游离态和结合态, 相比结合态 CML, 游离态 CML 的生物相容性更高, 更容易进入血清, 所以游离态 CML 对机体危害更大^[9]。目前根据仪器、样品基质、及预处理方法的不同, 较为有效地测定 CML 的方法有酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked immuno

sorbent assay, ELISA)^[10]、气相色谱串联质谱法^[11]、液相色谱串联质谱法^[12]等。Uribarri 等采用酶联免疫法对日常食用的 549 种食品中 CML 进行了检测^[13]。相比 HPLC-MS/MS、GC-MS 等分析法, 酶联免疫法不需衍生、固相萃取等繁复的前处理, 操作简单、快速, 故作者采用酶联免疫法对方便面中的 CML 进行了分析。

以不同的前处理方式, 结合酶联免疫分析法分别检测方便面中两种形态的 CML 的含量, 并通过体外细胞培养评价 CML 的雄性生殖毒性和胚胎发育毒性。目前尚无关于 CML 或其他 AGEs 的雄性生殖或胚胎发育毒性报道。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

甲醇, 硼氢化钠, 三氯乙酸, 正己烷, 二甲基亚砜 (分析纯): 购于天津大茂化学试剂公司; CML 标准品 (纯度 ≥ 98%): 购于百灵威公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、马血清: 购于 Gibco 公司; F12 培养基、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养基、β-巯基乙醇、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF), 血清替代物 KSR: 购于 Life 公司; R2C 细胞: 购于中国典型培养物保藏; 3T3 细胞、D3 细胞: 购于中山大学细胞库; C57 小鼠: 购于中山大学实验动物中心; CML 试剂盒: 购于南京森贝伽生物科技有限公司; 放射免疫测定孕酮试剂盒: 购于北京化学研究所; 噻唑蓝 (MTT), 购于 Amresco 公司; 方便面: 广州市售产品。

小型粉碎机: 广州兴荣机械有限公司产品; 低速离心机: 科大创新股份有限公司中佳分公司产品; 自动酶标仪: 北京普天新桥技术有限公司产品。

1.2 标准曲线的制备

根据 CML 试剂盒说明书制备标准曲线。酶标包被板上设标准品孔 10 孔,两孔为一平行组,以 60 $\mu\text{g/L}$ 的标准品溶液为母液分别在孔板依次稀释,最终得浓度分别为 60、40、20、10、5 $\mu\text{g/L}$,并加设空白对照组。然后将酶标板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行 30 min 温浴,在经历洗涤,加酶,显色等一系列操作后,将其置于酶标仪在 450 nm 处进行 A 值测定,并以空白对照进行调零。最终以标准品浓度为横坐标,以 OD 值为横坐标得标准曲线

$$y=0.0005x^2+0.0011x+0.0141, R^2=0.9991。$$

1.3 样品检测

游离态 CML 的检测:称取 4.00 g 研磨后的方便面样品置于 50 mL 离心管中,配制体积分数 70% 甲醇溶液,按料液质量体积比为 1 g:9 mL 比例加入甲醇溶液萃取样品,用强力震荡器震荡样品 3 min,然后以 3 000 r/min 速度对样品进行离心,取上清液,依照说明书进行酶联免疫分析。

结合态 CML 的检测:称取 1.00 g 研磨粉碎后的样品置于 50 mL 离心管中。加入 10 mL 正己烷,充分涡旋,于 10 000 r/min 离心 3 min,弃正己烷层,重复上述正己烷脱脂过程 2 次,氮吹(40 $^{\circ}\text{C}$)挥去正己烷。向脱脂后的样品中加入 5 mL、0.2 mol/L 的硼酸盐缓冲液,涡旋混匀,加入 2 mol/L 硼氢化钠溶液涡旋混匀,使硼氢化钠溶液的终浓度为 0.1 mol/L,4 $^{\circ}\text{C}$,过夜。还原后的样品中加入 60% 的三氯乙酸溶液使其终浓度为 20%,混匀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,待水解。将沉淀的蛋白质物质转移至 100 mL 的具塞比色管中,加入 20 mL、6 mol/L 的 HCL 溶液,混匀,110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 24 h;水解液冷却至室温,用水定容至 50 mL,滤纸过滤,收集滤液。取 1 mL 滤液,用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液调节体系 pH 至中性。最终溶液用水定容至 2 mL,按照说明书进行酶联免疫分析。

1.4 细胞培养

睾丸间质细胞 R2C 细胞培养在含 15% 马血清、3% FBS 的 F12 培养液中,3T3 细胞以含 10% 体积分数 FBS 的 DMEM 为培养基,培养环境均为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内,2~3 d 换液或传代一次。

D3 细胞采用 ES 细胞基础培养基,与饲养层细胞进行共培养,培养环境为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱内。ES 细胞基础培养基的组成成分为

DMEM 培养基中加入质量分数 0.1% β -巯基乙醇,1% 非必需氨基酸,1% L-谷氨酰胺,1% 丙酮酸钠,103 U/mL LIF,15% KSR。饲养层获得方法为以怀孕 13.5 d 的 C57 小鼠提取表皮成纤维细胞,在 1 至 5 代内可作为饲养层支持 ES 细胞生长并维持未分化状态。以含 10 $\mu\text{g/mL}$ 丝裂霉素 C 的培养基(含质量分数 10% FBS 的 DMEM)培养 MEF 细胞 2.5 h 后,以 5×10^5 个/mL 的细胞密度将 MEF 铺在明胶包被过 2.5 h 的 6 孔板中,每孔 1 mL,第二天即可作为饲养层接种 ES 细胞。ES 细胞培养至对数期后,消化,离心,重悬于培养皿中,2.5 h 后 C57 小鼠表皮成纤维细胞贴壁,而 ES 悬浮在培养基中,可被分离出来。

1.5 MTT 法测定细胞存活率

细胞培养至对数期,调整细胞浓度,96 孔板内每孔接种 200 μL 细胞悬液。培养 24 h 后,以含不同浓度 CML 的含血清培养基继续培养 R2C 细胞 24 h,3T3 细胞 10 天,或 D3 细胞 10 d(第 1,3,5 天跟换新鲜培养基)后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 养箱内 4 h。弃去上清,每孔加 200 μL 二甲基亚砷溶解沉淀,置于水平摇床缓慢振荡 10 min 后以酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光值。每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.6 放射性免疫法测定孕酮分泌量

对数期 R2C 细胞悬液以 1×10^6 个/mL 的密度接种到 6 孔板,每孔 1 mL 细胞悬液。培养 24 h 后,换上分别不同浓度的 CML 培养液,继续培养 24 h 后提取上清液,400 g 离心 5 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以放射免疫试剂盒处理细胞上清,通过 γ 计数器对放射性计数,数据联机处理后得出各样品的孕酮含量。

1.7 统计学分析

以上所有检测所得结果都是用均数 \pm 标准差进行表示,并用 Graphpad Prism5 软件对数据进行统计分析,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 及 *** $p < 0.001$ 表示结果有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 方便面中 CML 的质量分数

酶联免疫方法是基于抗原抗体的特异性结合来检测待测物,CML 作为抗原被加入 CML 抗体包被的试剂盒,再加入酶标抗体,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经充分洗涤后加入显色剂,最终通过颜色吸光度表征底物浓度。采用酶联免疫法分

析 20 个品牌中方便面中游离态和结合态 CML 质量分数,并据此 结合态 CML 质量分数,结果如表 1 所示。游离态 CML 质量分数为 0.39~0.80 mg/kg,结合态 CML 质量分数为 19.42~34.99 mg/kg。虽然不同品牌方便面之间 CML 质量分数有所不同,但差距不大。

表 1 不同品牌的方便面中 CML 的质量分数

Table 1 Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) concentrations in instant noodles of 18 brands

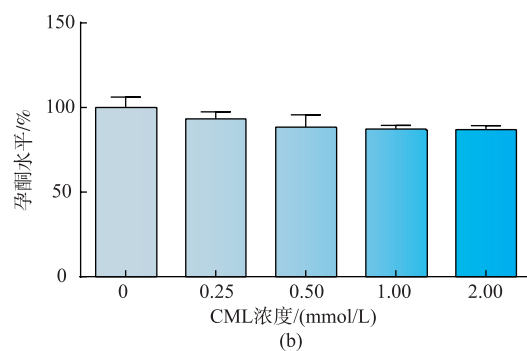
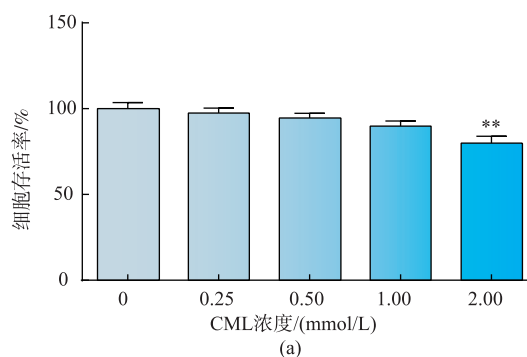
品牌	游离态/(mg/kg)	结合态/(mg/kg)
1	0.45±0.043	19.42±0.37
2	0.57±0.021	26.52±0.61
3	0.63±0.022	19.55±0.43
4	0.51±0.039	28.00±0.45
5	0.48±0.044	20.66±0.36
6	0.42±0.031	27.06±0.59
7	0.43±0.017	25.71±0.33
8	0.40±0.028	26.79±0.59
9	0.80±0.013	29.46±0.69
10	0.41±0.005	30.00±0.50
11	0.46±0.035	29.86±0.39
12	0.47±0.013	34.99±0.49
13	0.43±0.019	33.95±0.85
14	0.43±0.037	25.84±0.61
15	0.44±0.023	25.84±0.29
16	0.39±0.015	21.62±0.69
17	0.48±0.021	25.57±0.55
18	0.55±0.033	28.13±0.48
19	0.39±0.025	30.53±0.66
20	0.41±0.028	24.08±0.29

2.2 CML 对 R2C 细胞活性和孕酮水平的影响

CML 作用于 R2C 细胞 24 h 后,以放射性免疫测定孕酮试剂盒分析培养液中孕酮水平,以 MTT 法分析细胞活性,结果如图 1 所示。CML 在 1 mmol/L 浓度以下对 R2C 细胞的存活率没有显著的抑制作用($p>0.05$),在 2 mmol/L 浓度时才会导致细胞活性显著降低($p<0.01$)(图 1(a)),CML 浓度从 0.25 到 2 mmol/L,对 R2C 细胞孕酮水平均没有显著性影响(图 1(b))。

2.3 CML 对 3T3 和 ES 细胞活性的影响

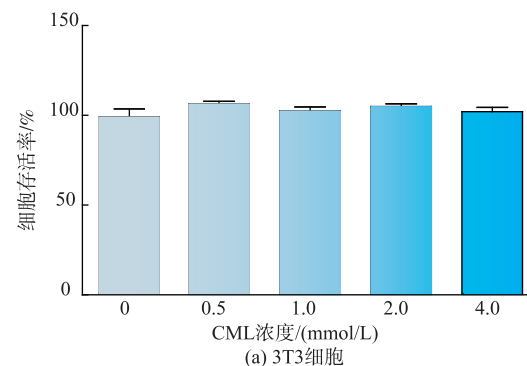
CML 作用于 3T3 细胞和 D3 细胞 10 d 后的细胞活性如图 2 所示,CML 作用浓度达到 4 mmol/L 时 3T3 细胞存活率仍没有显著降低,说明该浓度下的 CML 对 3T3 细胞没有细胞毒性作用。CML 作用浓度达到 1 mmol/L 时 ES 细胞存活率显著降低,说明 1 mmol/L 浓度下的 CML 对 ES 细胞有细胞毒性,而 1 mmol/L 得 CML 对 3T3 细胞活性没有显著影响,说明 D3 细胞比 3T3 细胞更加敏感。

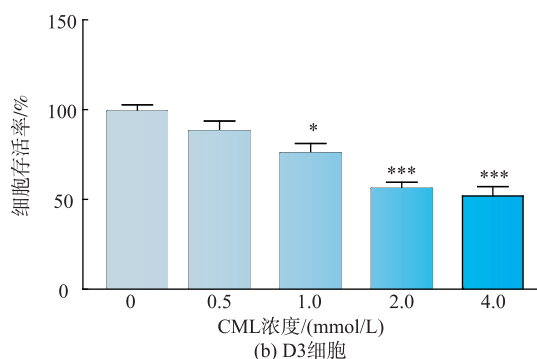


***: $p<0.001$ vs. Control, **: $p<0.01$ vs. Control, *: $p<0.05$ vs. Control

图 1 CML 对 R2C 细胞活性和孕酮分泌量的影响

Fig. 1 Effect of CML on cell viability and progesterone secretion of R2C cells





***: $p < 0.001$ vs. Control, **: $p < 0.01$ vs. Control, *: $p < 0.05$ vs. Control

图2 CML对3T3和D3细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of CML on viability of 3T3(A) and D3 cells

3 讨论

CML是AGEs类物质的代表性研究对象,在糖尿病及其并发症,以及衰老的发生和发展过程中起重要作用,其潜在的危害性也越来越受到人们的关注。CML可在体内生成,也可通过外部摄入,其中外部摄入大部分是通过膳食摄入。在食品的加工和加热过程中易产生CML,故作者选取日常食用的方便面为研究对象,通过酶联免疫法分析其中CML含量,并通过R2C和ES细胞的体外培养试验初步研究CML的雄性生殖和胚胎发育毒性。

作者通过对市场中20中不同品牌的方便面的分析,结果表明,游离态CML质量分数为0.39~0.80 mg/kg,结合态CML质量分数为19.42~34.99 mg/kg。周燕琼^[14]以UPLC-MS技术测定了方便面中结合态和游离态CML的总质量分数,结果为20.26 mg/kg。作者使用体积分数70%甲醇溶液萃取样品后以ELISA分析CML含量,和卞华伟等以Cleanert C18固相萃取柱萃取样品后以HPLC-MS分析,可能由于前处理和检测的方法不同,导致结果有较大的差异。一包油炸方便面饼的质量在70~100 g之间。人体体重设为标准体重60 kg,若每人每天摄食一包方便面,依据结合态CML在19.42~34.99 mg/kg之间,则每天通过食用方便面摄入的结合态CML约为22.66~58.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即0.11~0.28 $\mu\text{mol}/\text{L}$,游离态CML约为0.46~1.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即0.002 2~0.006 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

饮食摄入的CML一部分会进入体内循环,一部分会在肝,肌肉或肾等器官中蓄积,也有部分

CML或其代谢物从尿液中排出。食源性CML被吸收后主要在肾蓄积,也由肾清除。一项对11~14岁健康人群的试食试验表明,CML的吸收排泄和饮食摄入的CML的浓度有关^[15],具体表现为美拉德反应产物含量低的膳食与美拉德反应产物含量高的膳食相比,后者会导致更高的CML吸收量,而两者的尿液CML排出率没有显著性差异。食源性CML被消化吸收后会被机体分解一部分,但在机体内的具体代谢过程目前尚不清楚,由于CML对健康具有长期的影响,且食源性CML会和机体内源性CML协同作用危害健康,所以过多的摄入CML是一个值得关注的问题。然而目前尚无文献报道食源性CML在生殖细胞和胚胎细胞中的浓度,需要进一步的研究探索。

睾酮浓度的降低会导致附睾尾部的精子浓度降低和精子活力降低,引起雄性生殖毒性^[16]。雄性生殖系统的正常分化、发育和生理功能的维持依赖于一定水平的睾酮分泌。外源物质对雄性生殖系统的毒性最容易表现为影响睾丸的睾酮生成能力^[17]。孕酮是睾酮合成通路中最重要的中间产物之一,其含量可作为评价细胞生殖功能的指标。R2C细胞是大鼠睾丸间质瘤细胞系,能够在没有激素刺激的情况下持续大量的分泌孕酮,其他各项生理功能和指标都和睾丸间质细胞一致,故可以代替原代睾丸间质细胞成为体外毒性实验的细胞模型^[18]。CML在1 mmol/L浓度以下对R2C细胞的存活率和孕酮合成均没有显著的抑制作用。细胞实验所用CML为标准品,属于游离态CML,而作者和其他文献中方便面CML的含量都很低,故常规食用方便面所摄入的CML不会引起R2C细胞的活性和孕酮分泌量的变化。

作者采用具有多能型的胚胎干细胞D3,以及已分化的成纤维细胞Balb/c 3T3细胞,测试受试物对D3和3T3细胞活性的抑制作用,评价受试物的发育毒性。胚胎干细胞D3是一种多能性的未分化的细胞,而成纤维细胞3T3是一种已分化的不具备多能性的细胞,常被用来和胚胎干细胞做对比,分析受试物的毒性强弱对于全能性细胞和单能性细胞是否有区别。CML浓度4 mmol/L时3T3细胞存活率仍没有显著降低,说明该浓度下的CML对3T3细胞没有细胞毒性作用。CML给药浓度达到1 mmol/L时ES细胞存活率显著降低,CML浓度

0.5~4 mmol/L 时 3T3 细胞存活率仍没有显著降低,说明未分化的 ES 细胞比已分化的细胞对 CML 更加敏感。CML 在 0.5 mmol/L 浓度以下对 ES 细胞的存活率没有显著的抑制作用,故常规食用方便面所摄入的 CML 不会引起 ES 细胞的活性的变化。

4 结 语

采用酶联免疫法测定市售 20 种品牌方便面中

CML 的含量,游离态 CML 含量为 0.39~0.80 mg/kg,结合态 CML 含量为 19.42~34.99 mg/kg。根据该数据评估常规食用方便面时 CML 的摄入量,不会对 R2C 细胞存活率或孕酮分泌量造成显著抑制作用,也不会对 D3 和 3T3 细胞的存活率造成显著抑制作用,可认为常规食用方便面所摄入的 CML 不会引起雄性生殖和胚胎发育毒性。

参考文献:

- [1] SINGH R, BARDEN A, MORI T, et al. Advanced glycation end-products; a review[J]. **Diabetologia**, 2001, 44(2): 129-146.
- [2] XANTHIS A, HATZITOLIOS A, KOLIAKOS G, et al. Advanced glycosylation end products and nutrition-a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it[J]. **Journal of Food Science**, 2007, 72(8): R125-129.
- [3] HENLE T. Dietary advanced glycation end products--a risk to human health? A call for an interdisciplinary debate [J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2007, 51(9): 1075-1078.
- [4] SEBEKOVA K, SOMOZA V. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects-PRO [J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2007, 51(9): 1079-1084.
- [5] LIU Yixiang, JING Hao. Advances in pathological effects of maillard reaction products in vivo[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(2): 161-166. (in Chinese)
- [6] THORPE R, BAYNES W. CML a brief history[J]. **International Congress Series**, 2002, 1245: 91-99.
- [7] ZHANG Z, SUN J, BAI W, et al. Advances in toxicology of Nε-(carboxymethyl)-lysine (CML)[J]. **Agricultural Science & Technology**, 2013, 14(10): 1403-1408.
- [8] CAI W, HE J C, ZHU L, et al. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients[J]. **Circulation**, 2004, 110(3): 285-291.
- [9] GONG Z, GUANGWEI H, LU X, et al. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds(*Prunus dulcis*)[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2011, 59(22): 12037-12046.
- [10] TAREKE E, FORSLUND A, LINDH C H, et al. Isotope dilution ESI-LC-MS/MS for quantification of free and total Nεpsilon-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and free Nεpsilon-(1-Carboxyethyl)-L-Lysine; comparison of total Nεpsilon-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples[J]. **Food Chemistry**, 2013, 141(4): 4253-4259.
- [11] CHARISSOU A, AIT-AMEUR L, BIRLOUEZ A I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples[J]. **Journal of Chromatography A**, 2007, 1140(1-2): 189-94.
- [12] LOAEC G, JACOLOT P, HELOU C, et al. Acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and N(epsilon)-carboxymethyl-lysine in coffee substitutes and instant coffees [J]. **Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, 2014, 31(4): 593-604.
- [13] URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, et al. 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): 911-16.e12.
- [14] 周燕琼. 植物多酚抑制食品中晚期糖基化终末产物的形成的作用机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [15] DELGADO A C, TESSIER F J, NIQUET L C, et al. Study of the urinary and faecal excretion of Nεpsilon-carboxymethyllysine in young human volunteers[J]. **Amino Acids**, 2012, 43(2): 595-602.
- [16] BEATTIE M C, ADEKOLA L, PAPADOPOULOS V, et al. Leydig cell aging and hypogonadism[J]. **Experimental Gerontology**, 2015, 68: 87-91.
- [17] ZHANG Q, ZOU P, ZHAN H, et al. Dihydroipoamide dehydrogenase and cAMP are associated with cadmium-mediated Leydig cell damage[J]. **Toxicology Letters**, 2011, 205(2): 183-189.
- [18] SUN J, BAI S, BAI W, et al. Toxic mechanisms of 3-monochloropropane-1,2-diol on progesterone production in R2C rat leydig cells[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(41): 9955-9960.