

团 体 标 准

T/CNHFA 435—2024

血浆中晚期糖基化终末产物（羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸）含量测定 液相色谱串联质谱法

Determination of advanced glycation end-products (CML, CEL) in plasma ——
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2024- 05-23 发布

2024- 06-01 实施

中国营养保健食品协会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：华中科技大学、中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会、汤臣倍健股份有限公司、湖北省疾病预防控制中心、北京联合大学、北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心、广州医药研究总院有限公司、襄阳市公共检验检测中心、意迪那有限公司 (Indena S. p. A)。

本文件主要起草人：刘烈刚、陈梁凯、贺瑞坤、罗诗慧、闫文杰、郭海峰、黄正华、汪玉芳、闻胜、焦丽娟、王迪、周思丽、欧慧瑜、赵溪、苏昭仑、李永刚、郭豫、赵建、殷玮、王侨侨。

血浆中晚期糖基化终末产物（羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸）含量测定 液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件描述了测定血浆中晚期糖基化终末产物（羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸）的测定方法。

本文件适用于血浆中游离型和结合型晚期糖基化终末产物（羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸）含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

晚期糖基化终末产物（advanced glycation end-products, AGEs）

还原糖的活性羰基与蛋白质、肽、氨基酸等的氨基发生非酶促反应形成的一系列化合物，如羧甲基赖氨酸（CML）和羧乙基赖氨酸（CEL）等。

3.2

游离型晚期糖基化终末产物（free AGEs）

由活性羰基与游离氨基酸生成的晚期糖基化终末产物。

3.3

结合型晚期糖基化终末产物（bound AGEs）

由活性羰基与肽段或蛋白质共价连接生成的晚期糖基化终末产物。

4 原理

血浆样本经蛋白沉淀、离心后，上清液经氮吹、复溶，离心后上清液用液相色谱-串联质谱测定，内标法定量测得游离型晚期糖基化终末产物。

经过硼氢化钠缓冲液还原，沉淀蛋白，分离并除去样本游离型晚期糖基化终末期产物后，通过酸水解释放蛋白中的晚期糖基化终末产物，除酸，复溶，内标法测定结合型晚期糖基化终末产物。

5 试剂和材料

除特殊说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.2 乙腈（C₂H₅N）：质谱纯。

5.3 甲酸（HCOOH）：质谱纯。

5.4 七氟丁酸（CF₃CF₂CF₂COOH）：含量≥98%。

5.5 十水合四硼酸钠（Na₂B₄O₇·10H₂O）。

5.6 硼氢化钠（NaBH₄）。

5.7 硼酸（H₃BO₃）。

- 5.8 三氯乙酸 ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)。
- 5.9 盐酸 (HCl)，质量分数 $(36 \pm 2)\%$ 。
- 5.10 甲酸-七氟丁酸溶液：量取 1 mL 甲酸，1.3 mL 七氟丁酸，用水定容至 1000 mL 混匀，得到 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 七氟丁酸的混合溶液。
- 5.11 甲醇-乙腈混合溶液：量取甲醇 100 mL，乙腈 300 mL，混匀。
- 5.12 0.2 mol/L 硼酸溶液：称取 1.24 g 硼酸，用水定容至 100 mL。
- 5.13 100 mmol/L 硼氢化钠缓冲液：称取 3.78 g 硼氢化钠和 19.07 g 的十水合四硼酸钠，用水定容至 1000 mL，并用 0.2 mol/L 硼酸溶液调节 pH 至 9.2，开盖静置过夜后密封保存。
- 5.14 200 g/L 三氯乙酸溶液：称取 200 g 三氯乙酸，用水定容至 1000 mL。
- 5.15 6 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 270 mL，加水稀释并定容至 500 mL，摇匀。
- 5.16 标准品及同位素内标：羧甲基赖氨酸 (CML)、羧甲基赖氨酸同位素内标 (CML- d_4)、羧乙基赖氨酸 (CEL)、羧乙基赖氨酸同位素内标 (CEL- d_4) 标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量见表 1。标准品及同位素内标应采用具有标准物质证书的标准物质，按证书要求保存。

表1 标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子量
羧甲基赖氨酸	carboxymethyl lysine (CML)	5746-04-3	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$	204.22
羧甲基赖氨酸同位素	(2S)-2-amino-6-(carboxymethylamino)-4,4,5,5-tetradeuteriohexanoic acid, (CML- d_4)	936233-18-0	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{D}_4\text{N}_2\text{O}_4$	208.25
羧乙基赖氨酸	carboxyethyl lysine (CEL)	5746-03-2	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$	218.25
羧乙基赖氨酸同位素	ϵ -N-carboxyethyl-L-[4,4,5,5- D_4]Lysine (CEL- d_4)	-	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{D}_4\text{N}_2\text{O}_4$	222.27

- 5.17 标准储备液：准确称取 CML、CEL 标准品各 10.0 mg，分别用水溶解并定容于 10 mL 容量瓶中，得到 1.0 mg/mL 的标准储备液。分别置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存，保存 3 个月。
- 5.18 标准中间液：准确量取 CML、CEL 标准储备液各 1.0 mL，于 100 mL 容量瓶中，分别用水稀释并定容，得到 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液，分别于 $0\text{ }^\circ\text{C}$ - $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存待用，保存 7 天。
- 5.19 同位素内标储备液：准确称取 CML- d_4 、CEL- d_4 标准品各 10.0 mg，分别用水溶解并定容于 10 mL 容量瓶中，得到 1.0 mg/mL 的同位素内标标准储备液。分别置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存，保存 3 个月。
- 5.20 同位素内标中间液：准确量取 CML- d_4 、CEL- d_4 同位素内标标准储备液 1.0 mL，于 100 mL 容量瓶中，分别用水稀释并定容，得到 10 $\mu\text{g/mL}$ 的同位素内标中间液，分别于 $0\text{ }^\circ\text{C}$ - $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存待用，保存 7 天。
- 5.21 混合同位素内标工作液：分别准确量取 1.0 mL CML- d_4 同位素内标中间液 (5.20)、0.5 mL CEL- d_4 同位素内标中间液 (5.20) 于同一 10 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，制成 CML- d_4 、CEL- d_4 浓度分别为 1000 ng/mL、500 ng/mL 的混合同位素内标工作液，于 $0\text{ }^\circ\text{C}$ - $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存待用，保存 7 天。

6 仪器和设备

- 6.1 涡旋振荡器。
- 6.2 离心机，不低于 14000 rpm，或相当的设备。
- 6.3 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。
- 6.4 氮气吹扫仪。
- 6.5 电子天平，感量 0.00001 g。
- 6.6 水浴锅。

7 分析步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 游离型 AGEs

血浆样本于4℃冰箱过夜解冻后使用。解冻的样本恢复至室温涡旋混匀后，取样本50 μL至1.5 mL离心管，加入25 μL混合同位素内标工作液（5.21），加入600 μL甲醇-乙腈混合溶液（5.11），涡旋混合30 s，静置5 min在20℃±5℃下14000 r/min离心5 min，将上清液转移至新1.5 mL离心管。将转移的上清液于60℃低速氮吹至完全干燥后，加入250 μL甲酸-七氟丁酸溶液（5.10），涡旋复溶30 s。将复溶后的溶液在20℃±5℃下14000 r/min离心5 min，取上清液直接进样测试，或4℃储存待用，48 h内完成测试。

7.1.2 结合型 AGEs

7.1.2.1 血浆样本于4℃冰箱过夜解冻后使用。解冻的样本恢复至室温涡旋混匀后，取25 μL血浆样本至5 mL玻璃消解管中，加入500 μL的100 mmol/L硼氢化钠缓冲液（5.13），混匀30 s，室温下静置2 h。向消解管中加入2 mL的200 g/L三氯乙酸溶液（5.14），涡旋混匀30 s，静置5 min，4000 r/min离心10 min，弃去上清液。

7.1.2.2 向消解管中加入50 μL混合内标工作液（5.21），再加入500 μL的6 mol/L盐酸（5.15），放入已预热的110℃烘箱，酸解18 h。取出消解管，降至常温，将酸解液倒入蒸发皿，并用1 mL水洗涤消解管，合并溶液，沸水浴蒸干。加入1 mL甲酸-七氟丁酸溶液（5.10）超声复溶，过0.22 μm水相滤膜，得到试样测定液，待上机，或4℃储存待用，48 h内完成测试。

7.2 仪器测定条件

7.2.1 色谱参考条件

- 超高效液相色谱参考条件列出如下：
- 色谱柱：C18，100×4.6 mm，2.6 μm，或性能相当者；
 - 流动相：A相为甲酸-七氟丁酸溶液（5.10），B相为乙腈（5.2）。梯度洗脱程序见表2；
 - 进样量：10 μL；
 - 柱温：40℃；
 - 流速：0.5 mL/min；
 - 洗脱时间：12 min。

表2 梯度洗脱程序

时间（min）	流动相A（%）	流动相B（%）
0	90	10
1.0	90	10
3.0	60	40
5.0	40	60
7.0	40	60
8.5	20	80
9.0	90	10
12.0	90	10

7.2.2 质谱参考条件

- 质谱参考条件如下：
- 离子源：电喷雾离子源（ESI源）；
 - 检测方式：多反应监测（MRM）；
 - 扫描方式：正离子模式扫描；
 - 气帘气（CUR）：30 psi；
 - 碰撞气（CAD）：Medium；
 - 离子化电压（IS）：5500 V；
 - 离子源温度（TEM）：550℃；
 - 喷雾气（GS1）：50 psi；
 - 辅助加热气（GS2）：50 psi；

——测试 CML、CEL、CML-d₄、CEL-d₄ 离子对、去簇电压（DP）、碰撞能（CE）、驻留时间（Time）见表 3。

表3 CML、CEL 和相应内标的部分质谱参数

项目	离子对	DP(V)	CE (V)	Time (ms)
CML	205.1→130.0	60	15	20
	205.1→84.1*	60	22.8	20
CML-d ₄	209.1→134.0	60	15	20
	209.1→88.1*	60	22.8	20
CEL	219.1→130.0	75	16	20
	219.1→84.1*	75	23	20
CEL-d ₄	223.1→134.0	75	16	20
	223.1→88.1*	75	23	20
*代表定量离子				

7.3 标准工作曲线制作

7.3.1 游离型 AGEs 测定混合标准工作溶液

分别准确吸取适量CML标准中间液和CEL标准中间液（5.18），用水稀释制得混合标准系列工作溶液，浓度见表4。临用现配。分别取50 μL混合系列标准工作溶液，按7.1.1进行前处理后依次进样。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比值为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

表4 游离型 AGEs 混合标准系列工作溶液浓度

单位为 ng/mL

	系列1	系列2	系列3	系列4	系列5	系列6
CML	1	5	10	50	100	500
CEL	1	5	10	50	100	500

7.3.2 结合型 AGEs 测定混合标准工作溶液

分别准确吸取适量CML标准中间液和CEL标准中间液（5.18），用水稀释制得混合标准系列工作溶液，浓度见表5。临用现配。分别取25 μL混合系列标准工作溶液，按 7.1.2.2 进行前处理后依次进样。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比值为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

表5 结合型 AGEs 混合标准系列工作溶液浓度

单位为 ng/mL

	系列1	系列2	系列3	系列4	系列5	系列6
CML	50	100	300	500	1000	3000
CEL	10	20	50	100	300	500

7.4 定性测定

通过试样色谱图的保留时间与相应标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准溶液各色谱峰的特征离子相对照定性。标准工作溶液参考色谱图见附录图A.1-A.9。

试样与标准品保留时间相对偏差不大于1.5%；且试样特征离子相对丰度与浓度相当的混合标准工作溶液相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表6的规定，则可判定为试样中存在该目标物。

表6 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

7.5 定量测定

7.5.1 游离型

在7.2色谱条件下将7.1.1试样测定液，以色谱峰面积定量，按内标法计算，测定液中各物质响应值均应在仪器检测的线性范围内。

7.5.2 结合型

在7.2色谱条件下将7.1.2试样测定液，以色谱峰面积定量，按内标法计算，测定液中各物质响应值均应在仪器检测的线性范围内。

7.6 空白试验

除不加试样外，游离型AGEs按7.1.1操作，结合型AGEs按7.1.2操作。应确认不含有干扰待测组分的物质。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

根据游离型AGEs（结合型AGEs）标准工作曲线（见7.3），将试液中各待测组分的色谱峰面积转化为浓度，按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V_1}{V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
X—试样中游离型 AGEs（结合型 AGEs）各待测组分的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
c—从标准工作曲线中读出的供试品溶液中各待测组分的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
V₁—取混合系列标准工作溶液的体积，单位为微升（μL）；
V₂—供试样本取样体积，单位为微升（μL）。

8.2 结果表示

测定结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

9 定量限和精密度

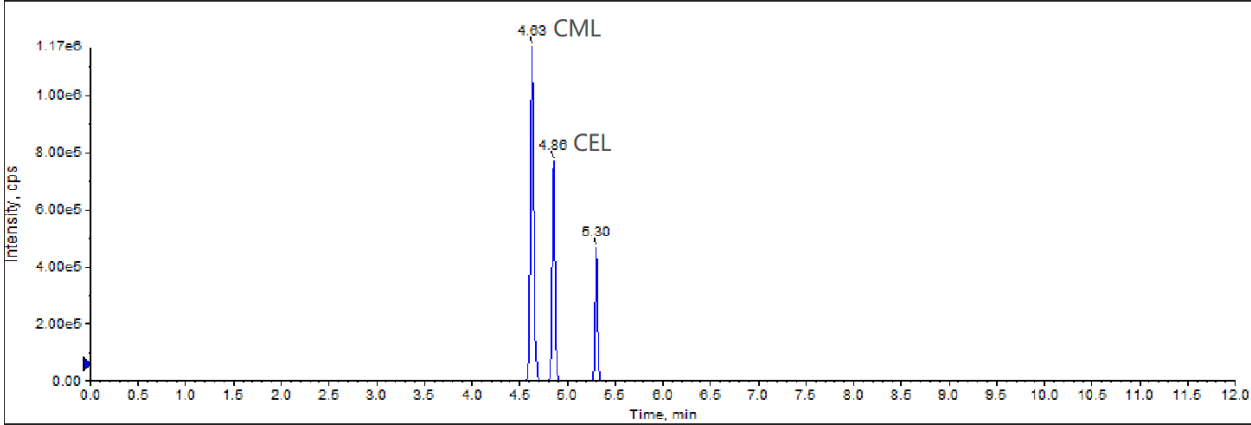
9.1 定量限

游离型CML定量限为1.05 ng/mL，游离型CEL定量限为1.21 ng/mL。
结合型CML定量限为10 ng/mL，结合型CEL定量限为12 ng/mL。

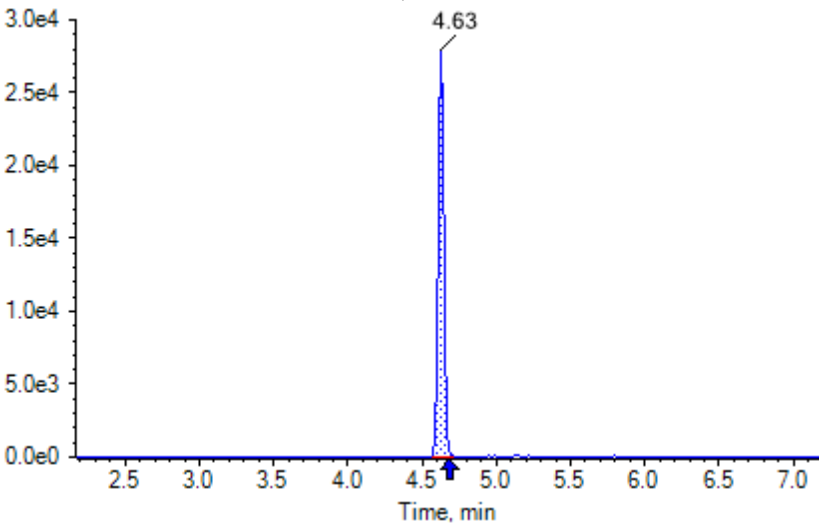
9.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

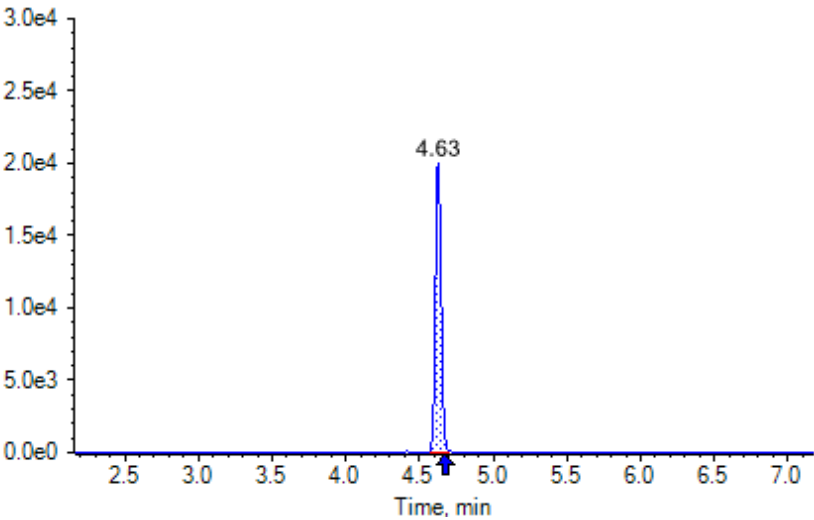
附录 A
(资料性)
晚期糖基化终末产物标准工作溶液参考色谱图



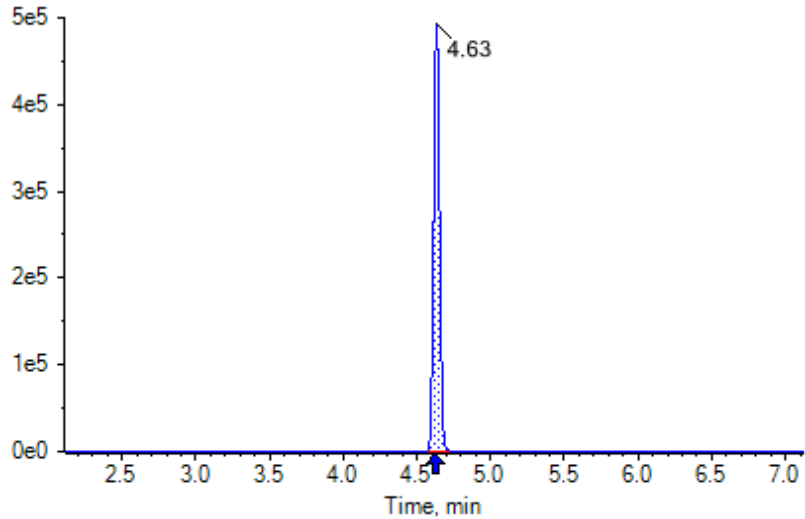
图A. 1 晚期糖基化终末产物标准溶液总离子流图



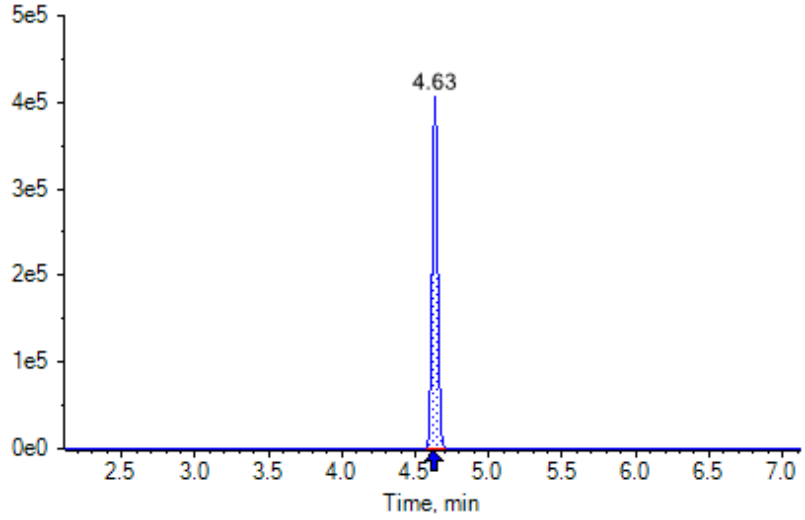
图A. 2 CML 定量离子对色谱图(离子对: 205. 1>84. 1)



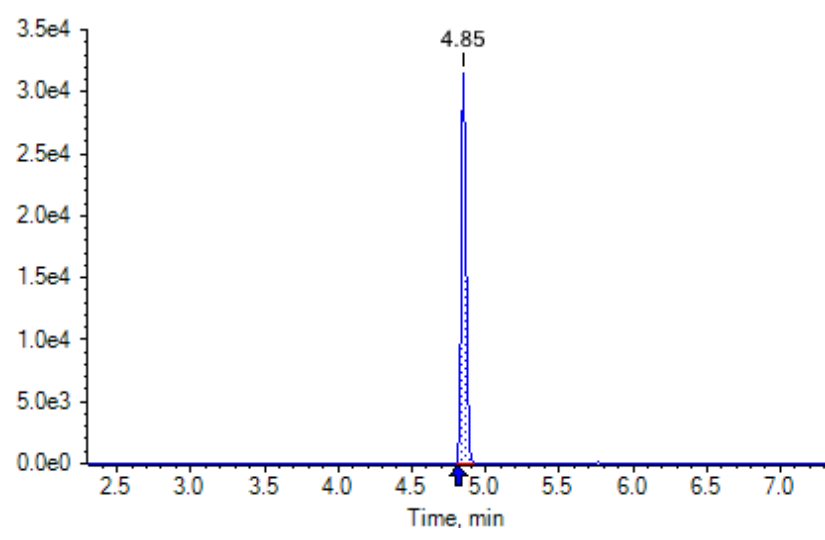
图A. 3 CML 定性离子对色谱图 (离子对: 205. 1>130. 0)



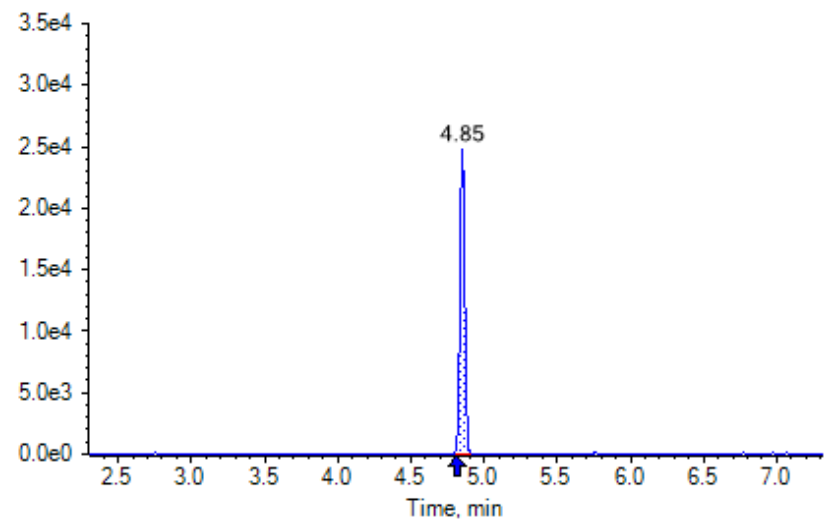
图A. 4 CML-d₄ 定量离子对色谱图 (离子对: 209. 1>88. 1)



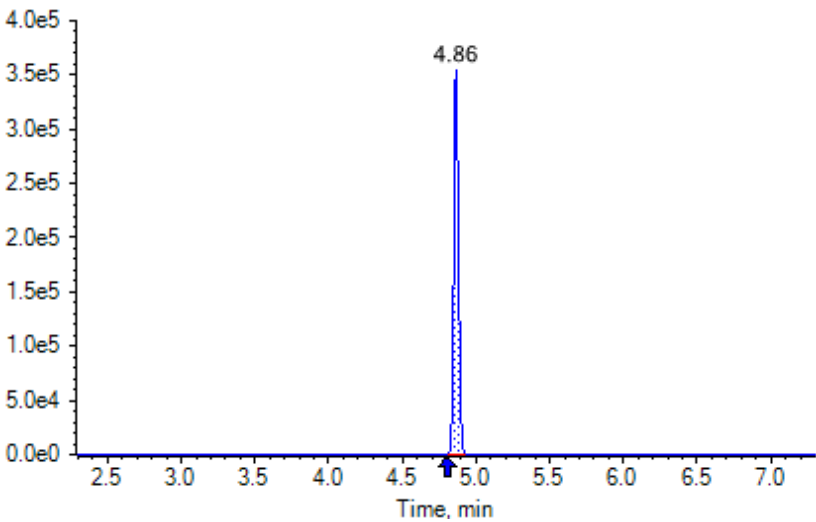
图A. 5 CML-d₄ 定性离子对色谱图 (离子对: 209. 1>134. 0)



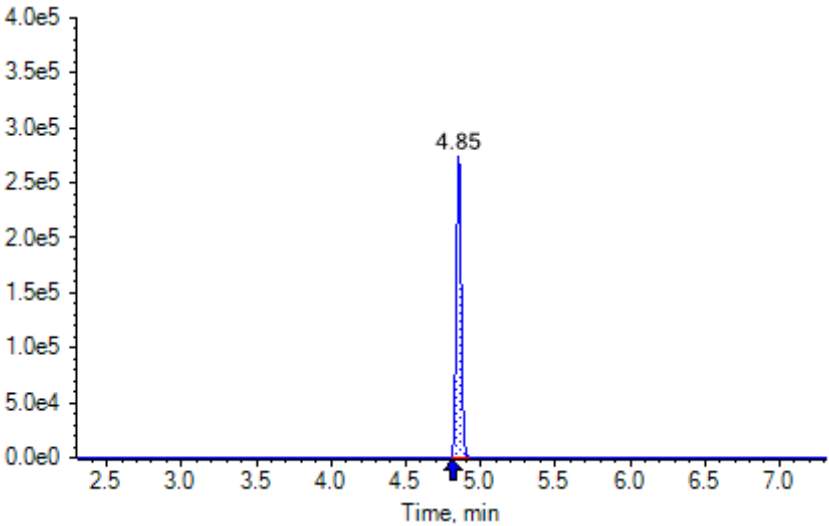
图A. 6 CEL 定量离子对色谱图(离子对: 219. 1>84. 1)



图A. 7 CEL 定性离子对色谱图(离子对: 219. 1>130. 0)



图A. 8 CEL-d₄定量离子对色谱图(离子对：223. 1>88. 1)



图A. 9 CEL-d₄定性离子对色谱图(离子对：223. 1>134. 0)
