

# 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

## 编制说明

# 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 编制说明

## 一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准起草单位及人员；

### 1. 任务背景

晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, 以下简称 AGEs)是还原糖的活性羰基与蛋白质、脂肪和(或)核酸的自由氨基发生非酶促反应形成的一系列化合物。其在机体血液或组织内生成,并随着年龄增长逐渐累积。

AGEs 的产生可分为三个阶段:在初始阶段,还原糖与氨基反应,形成不稳定的希夫碱(Schiff 碱)加合物,再转化为稳定的 Amadori 重排产物(Amadori rearrangement products, ARPs, 也称为早期糖基化产物);在中间阶段,ARPs 可以进行降解,通过烯醇化和消除反应产生 1,2-二羰基化合物;在最后阶段,1,2-二羰基化合物再次与赖氨酸(lysine, Lys)的游离氨基或精氨酸(arginine, Arg)的胍基反应,导致 AGEs 的产生。此外,由脂质氧化和糖化反应产生的 1,2-二羰基化合物也与 Lys 和 Arg 残基反应,导致 AGEs 的形成。生物体内 AGEs 主要来源于食源性 AGEs,经过饮食摄入的 AGEs 能够被机体吸收,且有一定的组织保留。动力学研究表明,不同种类的 AGEs 吸收效率不同,约 10%-30%膳食来源的 AGEs 被小肠吸收进入循环系统,其中约 1/3 经尿液或粪便排出,2/3 留在体内。进入循环系统的 AGEs 以游离态或结合态存在,其中结合态是 AGEs 与蛋白质等大分子物质形成分子量极大的交联结构,其对酶稳定,不易被降解,不断累积对机体产生长期损害。

根据前期文献调研中发现,341 名平均年龄 52.27 岁的深圳市社区健康服务中心接受体检的社区居民中,游离型 CML、CEL、结合型 CML 和 CEL 水平分别为 68.61-148.15、12.67-18.55、1275.00-1871.00、69.20-110.80  $\mu\text{g/L}$ 。并依此设定游离型 CML、CEL、结合型 CML 和 CEL 浓度范围分别为 1-500、1-500 和 50-3000、10-500  $\mu\text{g/L}$ 。

大量的实验证据和流行病学证据表明晚期糖基化终末产物(AGEs)与糖尿病等多种慢性病的发生和病理学进展息息相关。在多项研究中发现 AGEs 会加速人体的衰老和导致多种慢性疾病。AGEs 的蓄积与心血管疾病,糖尿病,慢性肾病,多囊卵巢综合征的代谢异常相关。也有文献表明 AGEs 的蓄积是随着年龄的增长记忆力下降,老年妇女贫血,运动功能下降的风险因素。

前期文献调研中发现,各种植物提取物,包括黄酮类、多酚类、多糖类植物提取物对 AGEs 活性抑制作用。可应用与膳食补充剂领域。

通过市场调查,在电商平台以“抗糖”为关键词进行搜索,部分化妆品、膳食营

养补充剂等产品已在产品页面宣称其降低 AGEs 的作用，说明 AGEs 成为越来越被关注的一项新的健康衡量指标，备受消费者关注。因此如何评价并检测 AGEs 相关指标也具有重要价值。

在流行病学研究中，采用膳食记录或食物频率问卷法难以评估个体 AGEs 暴露水平。通过生物标志物的手段，不仅可以更精确评估 AGEs 暴露情况，而且可以作为膳食调查的替代和补充，从而反映机体 AGEs 暴露和负荷水平，探讨 AGEs 负荷与多种疾病的关系。其次，生物样本的 AGEs 检测也可应用于干预研究，精准评估膳食干预对机体 AGEs 负荷的影响。

综上，AGEs 成为越来越被关注的一项新的健康衡量指标，也需建立稳定、准确标准化的检测方法，以减少测量误差，有益于多中心大样本的检测研究。建立稳定准确的生物样本中 AGEs 检测方法，也可以反映机体中的暴露和负荷情况，从而为更深入研究 AGEs 与疾病的关系，膳食干预对机体 AGEs 的影响。同时，市场已有相关营养膳食补充剂产品进行降低/抑制体内 AGEs 的相关宣传，也需相应的标准化的生物样本的检测方法作为监测健康水平及后期相关干预（包括膳食干预）评价的基础，对精准干预以及 AGEs 抑制相关药物及膳食营养补充剂的功能验证提供证据，有助于相关产品的开发和创新。

由于 AGEs 的极性范围广，结构不同，目前无“金标准”来测定含量，检测指标和方法不统一，尚缺乏统一标准。而在开发延缓或减轻 AGEs 相关膳食补充剂的研究中，也需要建立统一稳定生物样本的 AGEs 检测方法，以验证不同干预的量效关系作为功效验证直接且重要的证据。

现有各 AGEs 研究中的检测方法包括荧光分析法、色谱-质谱法、免疫测定法等。由于 AGEs 种类较多，结构不同，缺乏标准化的方法增加了测量误差的风险，也不利于不同研究之间的数据比较。在“确定标准主要内容”部分也对该标准指标和方法的选择进行了说明。

该团体标准旨在基于现有研究基础上，建立一套预处理简便、高通量且稳定可靠的 LC-MS/MS 方法，对人血浆中有代表性的两种 AGEs 实现定量检测。通过方法学验证该方法的可靠性和稳定性，对人血浆样本中的游离型和结合型 AGEs 进行快速且准确的定量分析。

基于此背景，提出了血浆中晚期糖基化终末产物检测方法的立项。

## 2. 任务来源

2023 年 1 月 4 日，中国营养保健食品协会发布《中国营养保健食品协会团体标准立项公告 2023 年第 1 号（总第 15 号）》公告，将本任务列入团体标准制定工作计划，计划下达项目名称为《血浆中晚期糖基化终末产物含量测定 超高效液相色谱串联质谱法》，由中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会提出，中国营养保健食品协会归口。

## 3 主要工作过程

### （1）起草阶段

2021 年至 2022 年，起草组持续进行国内外文献调研、方法建立等工作。并于

2022年12月向中国营养保健食品协会提出了立项申请，2023年1月通过团体标准立项。

2023年8月起草组进行了起草组内培训，确认证验方案，方法优化及验证，形成工作组讨论稿及编制说明。

2023年9月召开中期验收专家会，对标准背景、标准文本、标准验证方案进行讨论，并根据专家意见形成征求意见稿，并将标准名称修改为《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》。

## (2) 征求意见阶段

整理会议反馈意见及相关数据，起草工作组经研究后形成标准文本征求意见稿，将标准文本及编制说明以电子邮件的形式送发有关单位和专家，同时在网站及公众号上刊登，广泛征求意见，征求意见时间为2023年10月xx日至2023年11月xx日，共收回xx条意见，采纳xx条，不采纳xx条。

## (3) 审查阶段

暂略。

## (4) 报批阶段

暂略。

## 4 主要起草单位和起草人

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：暂略。

本文件主要起草人：暂略。

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容

### 1 标准编制原则

本标准的制定在现有研究基础上，建立处理简便、高通量且稳定可靠的血浆中游离型AGEs检测的标准方法。

本标准的制定本着先进性，科学性，合理性和可操作性的原则，以及标准的目标性，统一性，协调性，适用性，一致性和规范性原则来进行本标准的制定工作。本标准按照GB/T 1.1-2020等给出的规则起草。本标准的制定主要依据国家有关法律、法规、国家标准管理办法以及相关标准等

## 2. 确定标准主要内容

### 2.1 标准名称

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

#### 2.1.1 检测项目确定

进入循环系统的 AGEs 以游离型和结合型存在。现有研究多以尿液 AGEs 水平评估短期暴露情况，血液中 AGEs 水平能较好反映长期暴露以及累计情况。

AGEs 种类繁多，目前结构及性质较明确的 AGEs 已有 20 余种，现有研究一般需要选定具有代表性的一种或几种 AGEs。CML 是最早被发现的 AGEs，在 AGEs 与多种慢性病的关联中，被研究地较为充分，其在人体内含量也较高，在研究中常作为反映机体 AGEs 水平的标志物。而作为 CML 的结构类似物，目前许多研究已将 CEL 在生物样本内的含量作为反映 AGEs 水平与健康或疾病关联的基本指标之一。目前，CML、CEL 二者作为评价 AGEs 暴露水平的典型生物标志物已被广泛研究。

而 AGEs 在人体中主要分为两种状态，一种是游离状态，与氨基酸发生糖化，而另一种是结合状态，与肽段或蛋白质共价连接。不同状态的 AGEs 在生物利用度、消化、吸收和人类健康方面有所不同。

本标准以血浆中的游离型及结合型 CML、CEL 作为目标分析物。

#### 2.1.2 检测原理确定

现有 AGEs 的检测方法包括荧光分析法、色谱-质谱法、免疫测定法等。不同测试方法及其优缺点见表 1。因为不同的测定方案各有优缺点，且量纲不同等原因测定结果无法比较，所以进行方法学检测效能评价有很大意义。

表 1 AGEs 的不同测试方法及其优缺点

方法	标志物	样本类型	优点	缺点
液相色谱-荧光检测器法	荧光型 AGEs (戊糖素)	血液, 尿液, 唾液	(1) 简便 (2) 快速	(1) 不能检测非荧光型 AGEs (2) 非 AGEs 的其他荧光物质干扰 (3) 量纲为任意单位
皮肤 AGEs 测定仪	荧光型 AGEs	皮肤	(1) 无创, 简单, 快速 (2) 适用于临床或流行病学研究	(1) 主要来自于荧光型 AGEs (2) 受肤色等影响
高效液相色谱法	AGEs (如 CML, CEL)	血浆, 组织	(1) 相对精确 (2) 适用于 AGEs 水平监测	(1) 时间和经济成本高 (2) 仅能测定已知结构的 AGEs
气相色谱-质谱法	CML, CEL 等	尿样	(1) 灵敏度高 (2) 结果精确	(1) 仪器昂贵 (2) 需专业人员操作

方法	标志物	样本类型	优点	缺点
液相色谱串联质谱法	AGEs (如 CML, CEL 等)	血浆, 尿液, 组织	(1) 无需衍生化 (2) 灵敏度高 (3) 结果精确	(1) 仪器昂贵 (2) 需专业人员操作
ELISA	总 AGEs, 戊糖素, CML, CEL 等	血浆, 尿液, 组织	(1) 简单, 快速 (2) 不需要精密的实验室设备	抗体特异性不足
蛋白印迹法	CML, CEL 等	组织	(1) 经济 (2) 高特异性	(1) 步骤复杂 (2) 难以精确定量

其中色谱-质谱法虽然开展测试的仪器费用较高, 且需配备专业的人员。但色谱-质谱法相对免疫法和荧光法的敏感性和特异性高, 其中液相色谱-串联质谱法无需衍生化步骤, 结果有效而准确, 应用越来越广泛。

本标准使用液相色谱-质谱法对样品进行检测。

## 2.2 范围

文件规定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。

## 2.3 规范性引用文件

根据引用标准版本整理标准号和名称。

## 2.4 术语和定义

**晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end-products):** 晚期糖基化终末产物 (AGEs) 是还原糖的活性羰基与蛋白质、脂肪和 (或) 核酸的自由氨基发生非酶促反应形成的一系列化合物。

## 2.5 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, 通过酸解释放蛋白中的结合型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。

## 2.6 试剂和材料, 仪器和设备

根据使用到的试剂材料和仪器设备分别对应整理相应试剂和材料, 仪器和设备。

## 2.7 分析步骤

起草组在现有文献基础上建立检测方法, 并进行相应的优化。

### 2.7.1 样品前处理

### 2.7.1.1 游离型AGEs

血浆样本于 4 °C 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，加入 600 μL 甲醇-乙腈混合溶液，涡旋混合 30s，静置 5 min 在 20±5 °C 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 °C 低速氮吹至完全干燥后，加入 250 μL 甲酸-七氟丁酸溶液，涡旋复溶 30 s。将复溶后的溶液在 20±5 °C 下 14000 r/min 离心 5 min，取上清液直接进样测试，或 4 °C 储存待用，48 h 内完成测试。

说明：

前处理用乙腈-甲醇溶液进行蛋白沉淀，经离心后，上清液经氮吹、复溶，离心后测试。

### 2.7.1.2 结合型AGEs

2.7.1.2.1 血浆样本于 4 °C 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，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，涡旋混匀 30 s，静置 5 min，4000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。

2.7.1.2.2 向消解管中加入 50 μL 混合内标工作液，再加入 500 μL 的 6 mol/L 盐酸，放入已预热的 110 °C 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-七氟丁酸溶液超声复溶，过 0.22 μm 水相滤膜，得到试样测定液，待上机，或 4 °C 储存待用，48 h 内完成测试。

说明：

对于结合型 AGEs 的样本前处理，主要由还原、蛋白沉淀、酸解和复溶四个步骤组成。血浆样本在高温条件下会加速 AGEs 的形成，因此本研究首先在样本中加入 100 mmol/L 硼氢化钠的硼酸盐缓冲液，室温静置 2 h，可以避免在后续的酸解过程中，进一步产生新的 AGEs，影响机体 AGEs 水平的精确评价，造成暴露水平的高估。对于蛋白沉淀试剂的选择，有甲醇、乙腈、乙醇、三氯乙酸等，通过对比不同浓度、比例及试剂前处理获得的加标回收率差异，最终选择 20%三氯乙酸溶液进行蛋白沉淀。酸解过程对于蛋白结合型 AGEs 的测定至关重要，根据相关文献，起草组选定采用 6 mol/L 的盐酸溶液在 110 °C 条件下进行酸解，在预实验中，起草组对比了不同酸解时间下（12 h，14 h，16 h，18 h，20 h，22 h 和 24 h）结合型 AGEs 的解离程度，最终确定 18 h 为最佳的酸解时间点。

### 2.7.2 仪器参考条件

具体条件见标准文本。

说明：

通过色谱条件优化得到最优峰型和保留效果，在前期验证过程中确定了最佳的流动相比例和梯度洗脱程序，单个样本中分析时间短 12min。

## **（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预**

期的经济效果；

## 1.实验验证分析

本方法参考 EMA Guideline on bioanalytical method validation、GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对以下指标进行了研究：

验证指标为游离型和结合型 CML、CEL 的特异性、定量限、线性范围、回收率、精密度、再现性、残留和稳定性。

### 1.1 特异性

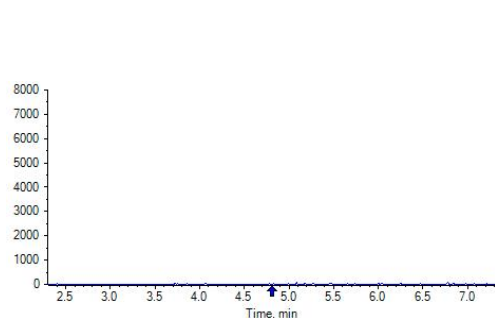
#### 1.1.1 试验方法

比较空白试剂，标准物质及正常人血浆样本经前处理后上机检测得到对应色谱图，观察目标物质对应出峰时间，判断检测过程是否存在内源性干扰。

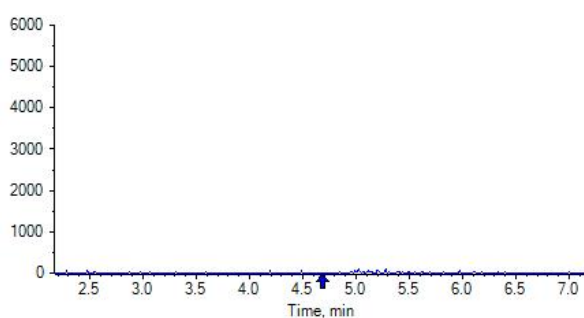
#### 1.1.2 试验结果

游离 AGEs 和结合型 AGEs 样本图谱分别见图 1 及图 2。

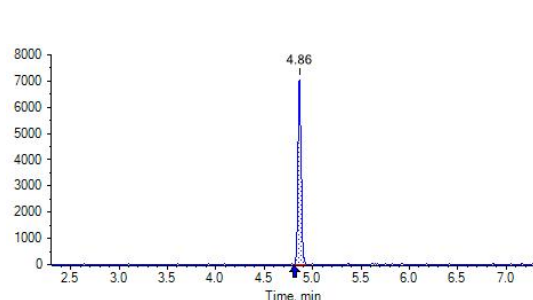
由图可见各色谱峰型良好,空白 CML 和 CEL 的出峰时间处均无峰，表明空白对测定结果基本无干扰。



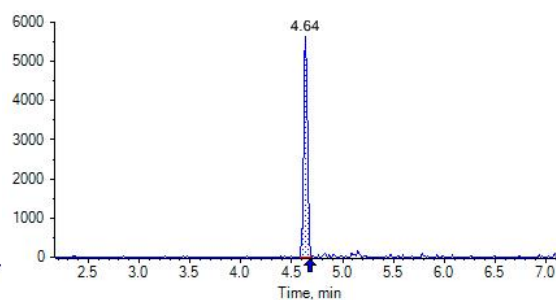
CEL 空白色谱图



CML 空白色谱图



CEL 对照色谱图



CML 对照色谱图



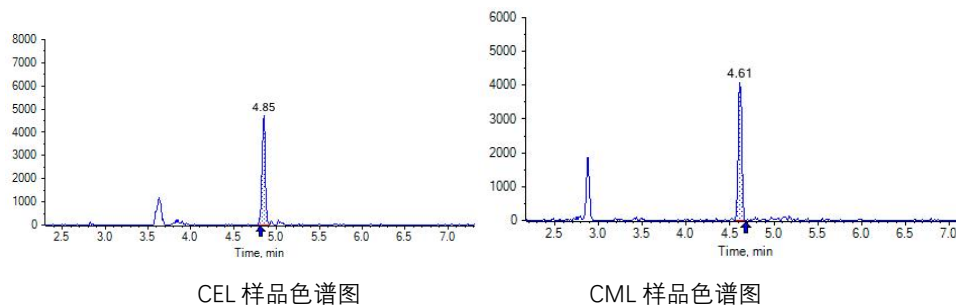


图1. 游离型CEL和CML的空白色谱图、对照色谱图和样品色谱图

## 1.2 定量限、线性范围确认

### 1.2.1 试验方法

分析方法的检出限 DL 和定量限 QL 由信噪比 (S/N) 计算。DL 定义为 S/N=3 时对应的待分析浓度, QL 定义为 S/N=10 时对应的待分析浓度。

游离型 AGEs 混合标准系列工作溶液浓度见表 1。结合型 AGEs 混合标准系列工作溶液浓度见表 2。分析不同浓度的混合标准系列工作溶液, 计算各标准曲线的相关系数。

### 1.2.2 试验结果

得到游离型 CML 的定量限为 1.05ng/mL, 游离型 CEL 定量限为 1.21ng/mL。

得到结合型 CML 的定量限为 10ng/mL, 游离型 CEL 定量限为 12ng/mL。

并得到标准曲线相关系数分别见表 2 和表 3。

计算得到的各标准曲线的相关系数均大于 0.995, 在相应范围内线性良好, 可满足实际样本分析的要求。

表 2 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	标准曲线	相关系数
CML	1	5	10	50	100	500	$y=0.000188774x + 0.000132879$	0.99953
CEL	1	5	10	50	100	500	$y=0.000103708x + 0.00102$	0.99977

表 3 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	标准曲线	相关系数
CML	50	100	300	500	1000	3000	$y=0.000204734x - 0.00234$	0.99844
CEL	10	20	50	100	300	500	$y=0.000111472x - 0.00874$	0.99981

## 1.3 精密度

### 1.3.1 游离型

每日取 18 份样品, 分别精密加入 CEL 和 CML 标准液分为低中高三组 QC 浓度

(LQC、MQC、HQC), 在 LQC、MQC、HQC 三组中分别加入 7.5 ul、15 ul 和 25 ul 的 100 ng/ml CEL+500 ng/ml CML 混合标准液, 按 2.7.1.1 试样制备方法处理样品, 持续三天, 测定样品 CEL、CML 含量, 计算其 RSD (%), 见表 4。

表 4 各游离型 AGEs 测定的精密度

序号	LQC		MQC		HQC	
	CML	CEL	CML	CEL	CML	CEL
day1-1	209.0	30.76	282.6	48.28	370.0	67.84
day1-2	192.9	31.96	276.5	52.08	372.8	68.9
day1-3	208.2	32.96	272.4	49.00	343.4	73.16
day1-4	206.8	31.62	281.5	49.12	360.5	65.45
day1-5	192.6	32.10	277.9	50.03	377.8	72.10
day1-6	210.7	31.95	272.1	50.22	348.0	72.35
day2-1	193.8	33.21	276.7	51.94	368.9	69.21
day2-2	206.3	32.55	264.5	48.66	404.3	71.63
day2-3	204.4	35.1	261.6	46.41	358.4	77.85
day2-4	209.0	30.96	261.0	51.63	350.9	77.66
day2-5	195.2	33.02	283.4	48.97	370.5	72.69
day2-6	212.1	31.94	274.8	49.88	404.2	71.69
day3-1	189.5	33.03	273	48.37	382.6	70.54
day3-2	179.0	33.33	277.4	51.42	341.5	75.84
day3-3	218.4	32.62	262.7	49.6	349.4	75.09
day3-4	193.6	34.50	267.7	52.37	358.4	73.36
day3-5	187.5	35.67	260.9	48.2	370.9	70.02
day3-6	201.3	32.34	290.1	47.97	368.1	71.47
Day1-RSD	4.09%	2.24%	1.59%	2.67%	3.86%	4.36%
Day2-RSD	3.65%	4.25%	3.42%	4.15%	6.08%	4.80%
Day3-RSD	7.00%	3.78%	3.98%	3.72%	4.16%	3.33%
总RSD%	5.19%	3.98%	3.16%	3.35%	4.92%	4.50%

### 1.3.2 结合型

每日取 18 份样品, 按 2.7.1.2.1 制备方法处理样品后, 分为低中高三组 QC 浓度 (LQC、MQC、HQC), 在 LQC、MQC、HQC 三组中分别加入 15 ul、25 ul 和 50 ul 的 250 ng/ml CEL 和 5 ul、10 ul 和 15 ul 的 2500 ng/ml CML 标准液, 按 2.7.1.2.2 试样制备方法处理样品, 持续三天, 测定样品 CEL、CML 含量, 计算其 RSD (%), 见表 5。

表 5 各结合型 AGEs 测定的精密度、精确度及加样回收率

序号	LQC		MQC		HQC	
	CML	CEL	CML	CEL	CML	CEL
day1-1	1316	211.6	1858	306.8	2221	581.3

day1-2	1287	201.5	1806	319.4	2375	542.3
day1-3	1318	228.3	1832	322.2	2392	536.6
day1-4	1300	194.8	1812	297.8	1964	499.7
day1-5	1256	249.6	1858	342.6	2161	557.1
day1-6	1270	260.9	1877	274	2368	532.8
day2-1	1264	198.1	1813	322.3	2198	489.7
day2-2	1266	216.3	1873	292	2206	587.2
day2-3	1316	193.9	1862	313	2389	548.6
day2-4	1236	213.1	1836	287.9	2358	525.6
day2-5	1304	215.0	1840	324.2	2477	536.9
day2-6	1331	194.4	1776	302.3	2368	525.3
day3-1	1405	184.4	1806	324.2	2317	546.8
day3-2	1352	173.1	1922	295.7	2183	522.9
day3-3	1297	192.3	1818	311.3	2481	477.9
day3-4	1067	257.2	1846	314.0	2516	594.8
day3-5	1309	223.9	1946	337.7	2316	479.9
day3-6	1274	205.0	1972	310.4	2363	536.9
Day1-RSD	1.93%	11.87%	1.54%	7.56%	7.45%	5.01%
Day2-RSD	2.83%	5.23%	1.91%	5.00%	4.70%	5.99%
Day3-RSD	9.03%	14.85%	3.74%	4.50%	5.15%	8.38%
总 RSD%	5.23%	11.58%	2.76%	5.60%	5.91%	6.29%

各 AGEs 不同浓度水平的 RSD 均不超过 15%，符合实验室质量控制规范相关要求。

#### 1.4 准确度（回收率）

##### 1.4.1 游离型

精密移取血液样品 9 份，分为 LQC、MQC、HQC 三组，分别加入 5 ul、15 ul 和 25 ul 的 100 ng/ml CEL 和 7.5 ul、15 ul 和 25 ul 的 500 ng/ml CML 标准液，按 2.7.1.1 试样制备方法处理样品。测定样品 CEL、CML 含量，计算其回收率（%）。见表 6。

表 6. 游离型 AGEs 回收率试验结果

本底值	加标值	测得值	回收率	平均回收率
-----	-----	-----	-----	-------

	本底值	加标值	测得值	回收率	平均回收率
游离 CML	127.8	75	209.2	108.57	101.02%
			193.0	86.97	
			208.4	107.51	
		150	300.2	114.95	110.77%
			290.4	108.42	
			291.2	108.95	
		250	370.1	96.93	93.77%
			373.0	98.09	
			343.5	86.29	
游离 CEL	21.14	10	30.76	96.16	104.49%
			31.96	108.16	
			32.06	109.16	
		30	48.28	90.45	95.47%
			52.08	103.12	
			49.00	92.85	
		50	67.84	93.39	97.64%
			68.90	95.51	
			73.16	104.03	

#### 1.4.2 结合型

精密移取血液样品 9 份，按 2.7.1.2.1 试样制备方法处理样品后，分为 LQC、MQC、HQC 三组，分别加入 15 ul、25 ul 和 50 ul 的 250 ng/ml CEL 和 5 ul、10 ul 和 15 ul 的 2500 ng/ml CML 标准液，按 2.7.1.2.2 试样制备方法处理样品，测定样品 CEL、CML 含量，计算其回收率（%）。见表 7。

表 7. 结合型 AGEs 回收率试验结果

	本底值	加标值	测得值	回收率	平均回收率
--	-----	-----	-----	-----	-------

	本底值	加标值	测得值	回收率	平均回收率
结合 CML	859.2	500	1316	91.35	89.55%
			1287	85.55	
			1318	91.75	
		1000	1858	99.87	97.27%
			1806	94.67	
			1832	97.27	
		1500	2221	90.78	98.00%
			2392	102.18	
			2375	101.05	
结合 CEL	64.89	150	211.6	97.80	99.27%
			228.3	108.94	
			201.5	91.07	
		250	306.8	96.76	100.49%
			322.2	102.92	
			319.4	101.80	
		500	581.3	103.28	97.70%
			542.3	95.48	
			536.6	94.34	

各 AGEs 低、中、高三个不同浓度水平的平均提取回收率均在 85%–115%之间，表明该方法有较好的回收率，证明准确度良好。

#### 1.5 残留

残留是通过在注射高浓度样品或校正标样后，注射空白样品进行评价

本方法在注射浓度最高标品后，再注射空白样品进行评价。注射后空白样品在各 AGEs 的出峰时间处无明显流出峰，整体与空白样品所呈现结果无差别。

#### 1.6 稳定性试验

稳定性试验评价是考察在三个浓度水平（低、中、高）QC 样本分别在室温放置

24 小时条件下各类 AGEs 物质的稳定性，要求其 RSD 不应超过 15%。

### 1.6.1 游离型

精密移取血液样品 18 份，分为 LQC、MQC、HQC 三组，分别加入 7.5ul、15ul 和 25ul 的 100ng/mlCEL+500ng/mlCML 混合标准液，按 2.7.1.1 试样制备方法处理样品后在室温下放置 24h，测定样品 CEL、CML 含量，计算其 RSD(%)。稳定性试验结果见表 8。

表 8. 各游离型 AGEs 稳定性试验

化合物 放置时间	CEL(ng/mL)			CML(ng/mL)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
0h	173.7	250.2	360.7	189.5	273.0	382.6
1h	175.1	265.4	387.2	179.0	277.4	341.5
2h	171.6	256.3	383.4	218.4	262.7	349.4
6h	181.0	270.1	374.8	193.6	267.7	358.4
12h	186.8	249.3	358.1	187.5	260.9	370.9
24h	170.2	248.2	365.4	201.3	290.1	368.1
平均值	176.4	256.6	371.6	194.9	272.0	361.8
RSD(%)	3.58	3.59	3.26	7.00	3.98	4.16

### 1.6.2 结合型

将精密移取血液样品 18 份，按 2.7.1.2.1 试样制备方法处理样品后，分为 LQC、MQC、HQC 三组，分别加入 15 ul、25 ul 和 50 ul 的 250 ng/ml CEL 和 5 ul、10 ul 和 15 ul 的 2500 ng/ml CML 标准液，按 2.7.1.2.2 试样制备方法处理样品后在室温下放置 24 h，测定样品 CEL、CML 含量，计算其 RSD (%)。见表 9。

表 9. 各结合型 AGEs 稳定性试验

化合物 放置时间	CEL(ng/mL)			CML(ng/mL)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
0h	211.6	306.8	581.3	1316	1858	2221
1h	230.5	274.0	542.3	1300	1806	1964
2h	249.6	319.4	536.6	1256	1832	2161
6h	201.5	297.8	499.7	1287	1812	2375
12h	228.3	342.6	557.1	1318	1858	2392
24h	260.9	322.2	532.8	1270	1877	2368
平均值	230.4	310.5	541.6	1291	1840	2247
RSD(%)	10.83	7.56	5.01	1.93	1.54	7.45

所有 QC 样品实际测量值的 RSD 均小于 15%，实测值与理论值之间的差异均在  $\pm 15\%$  以内。由此可见血浆中各 AGEs 的稳定性较好。

### 1.6 小结

基于以上方法学验证结果，已建立的人血浆游离型及结合型 AGEs 的 UPLC-MS/MS 定量检测方法具备一定的稳定性和可靠性。

## 2 预期的经济与社会效果

在血浆中 AGEs 检测方法发布后期望在下述环节进行应用：

- a. 通过生物标志物的手段，精确反映机体 AGEs 暴露和负荷水平，探讨 AGEs 负荷与多种疾病的关系；
- b. 可应用于 AGEs 干预研究，精准评估药物或膳食干预对机体 AGEs 负荷的影响；
- c. 可应用于 AGEs 抑制相关药物及膳食营养补充剂的功效评价，有助于相关产品的开发和创新。

### **（四）采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际同类标准水平的对比情况**

未发现其他国家、地区存在血浆中晚期糖基化终末产物测试相关标准。

本标准为首创标准。

### **（五）与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系；**

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

### **（六）重大分歧意见的处理经过和依据；**

本标准未产生重大分歧意见。

### **（七）作为强制性标准或推荐性标准的建议；**

本标准可作为团体标准，团体内成员自愿采用。

### **（八）贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法、实施日期等内容）；**

本标准为首次发布。

### **（九）其他需要说明的事项。**

无其他需要说明的事项。