

周慧吉, 李廷钊, 李波. 多模型评价槐花水提物的抗糖化作用及其活性成分研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 371-379. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050062

ZHOU Huiji, LI Tingzhao, LI Bo. Multi-model Evaluation of Anti-glycation Effects of *Sophora japonica* Flowers Aqueous Extract and Its Active Components Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(5): 371-379. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050062

· 营养与保健 ·

多模型评价槐花水提物的抗糖化作用 及其活性成分研究

周慧吉¹, 李廷钊^{1,2}, 李波^{1,2,*}

(1. 安利(上海)科技发展有限公司, 上海 201203;

2. 安利(中国)植物研发中心, 江苏无锡 214145)

摘要:目的: 采用多种模型研究槐花水提物的抗糖化作用, 并初步鉴定其有效成分。方法: 通过构建牛血清白蛋白(BSA)/还原糖反应、甲基乙二醛(MGO)诱导成纤维细胞糖化以及葡萄糖溶液诱导斑马鱼体内糖基化终末产物(AGEs)增加体系, 从生化、细胞及斑马鱼三种不同模型全面评估槐花水提取物抗糖化效果。利用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Triple TOF/MS)联用技术对槐花水提取物中的化学成分进行分析鉴定, 并进一步测定槐花主要化学成分对生化体系中非酶糖基化的抑制作用。结果: BSA/还原糖体系中, 槐花水提取物抑制 AGEs 的 IC₅₀ 值为 53.93 μg/mL。细胞模型中, 10 及 40 μg/mL 的槐花水提取物对人皮肤成纤维细胞羧甲基赖氨酸(CML)表达量分别降低了 72.28% 和 83.85%。斑马鱼模型也同样验证了槐花水提取物的抗糖化效果, 与模型组相比, 2 mg/mL 的槐花水提取物能使斑马鱼的 AGEs 生成量降低 76.85%。采用液质联用分析, 从槐花水提取物中共鉴定了 14 个化合物, 主要为黄酮类成分。对其中 7 种黄酮类成分进一步进行 BSA/还原糖体系分析, 发现其均能有效抑制 AGEs 生成, 其中芦丁、槲皮素和山奈酚的 IC₅₀ 值分别为 165.5、133.0 和 42.9 μmol/L, 均优于阳性对照药物。结论: 槐花水提取物具有显著的抗糖化作用, 芦丁、槲皮素和山奈酚等黄酮类化合物是其潜在的主要活性成分。

关键词: 槐花, 抗糖化, 非酶糖基化反应, 成纤维细胞, 斑马鱼, 超高效液相色谱-飞行时间质谱

(UPLC-Triple TOF/MS), 活性成分

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)05-0371-09

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050062



Multi-model Evaluation of Anti-glycation Effects of *Sophora japonica* Flowers Aqueous Extract and Its Active Components Analysis

ZHOU Huiji¹, LI Tingzhao^{1,2}, LI Bo^{1,2,*}

(1. Amway (Shanghai) Technology Development Co., Ltd., Shanghai 201203, China;

2. Amway (China) Botanical R & D Center, Wuxi 214145, China)

Abstract: Objective: To investigate and analyze anti-glycation effects of the aqueous extract of *Sophora japonica* flower (SJF) by using different models, as well as its active constituents identification. Methods: BSA/reducing sugar reaction system, glycosylated fibroblast induced by methylglyoxal and AGEs-increased zebrafish model triggered by glucose solution were simultaneously established to comprehensively evaluate the anti-glycation effects of SJF aqueous extract from biochemical, cellular and zebrafish aspects, respectively. Identification of major components was performed by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry technique (UPLC-Triple TOF/MS). Biochemical system was subsequently adopted to further analyze anti-glycation effects of these primary components. Results: In the BSA/reducing sugar system, IC₅₀ of AGEs inhibition of SJF aqueous extract was 53.93 μg/mL. 10 and 40 μg/mL of SJF aqueous extracts dramatically inhibited CML expressions in fibroblast model ($P < 0.0001$), which decreased by 72.28% and

收稿日期: 2022-05-11

作者简介: 周慧吉 (1990-), 女, 硕士, 中级技术员, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: cassie.zhou@amway.com。

* 通信作者: 李波 (1981-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: robert.li@amway.com。

83.85%, respectively. Then, zebrafish model was also used to verify anti-glycation effects of SJF aqueous extract. When the concentration of SJF aqueous extract reached 2 mg/mL, the glycation inhibitory rate could be as high as 76.85%. Through analysis of UPLC-Triple-TOF/MS, a total of 14 chemical compounds, mainly flavonoids, were preliminarily identified. Seven compounds among them were selected for further anti-glycation evaluation by BSA/reducing sugar system. All of the seven compounds showed variable activities toward anti-AGEs production, notably, rutin, quercetin and kaempferol revealed a remarkable activity with a IC_{50} of 165.5, 133.0 and 42.9 $\mu\text{mol/L}$, respectively, which were better than that of positive control drugs. Conclusion: SJF aqueous extract shows remarkable anti-glycation activity. Flavonoids such as rutin, quercetin and kaempferol are its potential active compounds.

Key words: *Sophora japonica*; anti-glycation; non-enzymatic glycosylation; fibroblast; zebrafish; UPLC-Triple TOF/MS; active components

糖基化是指蛋白质的氨基和还原糖(如葡萄糖、果糖)的羰基之间发生的缓慢非酶促反应^[1]。该反应首先形成不稳定且可逆的 schiff 碱,再经分子重排,最终形成结构多样、不可逆的复杂稳定共价聚合物,称为晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, 简称 AGEs)^[2-3]。目前已经发现的 AGEs 物质有 20 多种,其中最具有代表性的为羧甲基赖氨酸(N ϵ -carboxymethyllysine, 简称 CML)^[4],也是人体内糖基化反应的主要生物标志物之一^[5]。AGEs 分子间可以通过交联形成大分子物质,积聚在包括脑、皮肤在内的各种组织器官中^[6-8],研究表明其与多种衰老相关疾病(皮肤褶皱、糖尿病、动脉粥样硬化等)有着密切的关系^[9]。

阿司匹林、氨基胍等已被充分证实具有显著的抑制糖基化效果^[10-11],但长期服用,对药物安全性的担忧等因素使其依从性不高。研究学者们更多寄希望于从更为安全的植物性食物以及药食同源的中草药中筛选有效的 AGEs 抑制剂。郑子锋等^[12]发现龙眼核多酚能显著抑制蛋白非酶糖基化并对成纤维细胞有明显保护作用。Hyun 等^[13]发现沙棘提取物能明显抑制非酶糖基化,并且抑制能力与抗氧化性密切相关。Ali 等^[14]研究人参中 22 种皂苷类化合物的体外抑制非酶糖基化过程,结果表明人参皂苷 Rh1 具有较强的抑制作用。

槐花是豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的花朵,广泛分布在华东华北地区。槐花盛开于四月,很多地方把其当作蔬菜食用。槐花富含黄酮类化合物,其主要成分为芦丁^[15]。抗糖化活性筛选和验证实验中,最为广泛应用的是 BSA/还原糖体系模型,细胞 CML 检测模型以及斑马鱼 AGEs 形成模型鲜有报道。尽管有研究表明,槐花提取物及其主要成分芦丁能抑制生化体系下 AGEs 的形成^[16],但槐花水提物在细胞及斑马鱼模型中的抗糖化效果从未有报道,并且槐花水提物中的其他成分在抗糖化方面的作用也鲜有报道。因此本文采用 BSA/还原糖体系、MGO 诱导人原代真皮成纤维细胞 CML 检测模型以及斑马鱼 AGEs 增加模型,多层次评估槐花水提物的抗糖化活性,并初步探讨槐花主要化学成分在 BSA/还原糖体系中抑制 AGEs 的效果,为槐花抗糖化作用和药效物质基础研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

槐花 产地山东,购自安徽益生源中药饮片科技有限公司,经上海中医药大学附属龙华医院高级实验师刘淑芳博士鉴定为豆科植物槐 *Sophora japonica* L.的干燥花朵; Lifeline Cat#FC-0024 原代人皮肤成纤维细胞(HDFs) 上海 Lifeline® Cell Technology 公司;酪氨酸酶(25 KU, 9002-10-2)、二甲基亚砜 DMSO(#D4540)、牛血清白蛋白 BSA(SRE0098) 美国 Sigma 公司;甲醇(色谱级) 美国 Honeywell 公司;芦丁($\geq 98.0\%$)、异槲皮苷($\geq 98.0\%$)、水仙苷(HPLC $\geq 99.0\%$)、槲皮苷($\geq 98.0\%$)、槲皮素($\geq 98.0\%$)、异鼠李素($\geq 98.0\%$)、山奈酚($\geq 98.0\%$)

上海诗丹德生物技术有限公司;氨基胍、葡萄糖、果糖 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DMEM 高糖培养基(11965084)、胎牛血清 FBS(10099141C)、青霉素-链霉素(10000 U/mL)(10378016)、磷酸缓冲液 PBS pH7.4(10010023)、0.025% 胰酶(R001100)

美国 Gibco 公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒) 上海碧云天;甲基乙二醛 MGO、Triton-X-100(88963A) 美国 Adamas 公司;羧甲基赖氨酸抗体 CML 一抗(ab125145)、含细胞核荧光染料(DAPI)的抗荧光猝灭封片液(ab104139) 美国 Abcam 公司; Alexa Fluor®488 驴抗小鼠 IgG(二抗) 美国 Invitrogen 公司; 96 孔板(批号 16920006) 美国 Corning 公司;其他试剂 均购自上海泰坦科技股份有限公司;斑马鱼 均饲养于 28 °C 的养鱼用水中(水质:每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率为 450~550 $\mu\text{S/cm}$; pH 为 6.5~8.5;硬度为 50~100 mg/L CaCO_3),实验动物使用许可证号为:SYXK(浙)2012-0171,饲养管理符合国际 AAALAC 认证(认证编号:001458)的要求。野生型 AB 品系斑马鱼,以自然成对交配繁殖方式进行。年龄为受精后 5 d(5 dpf)的斑马鱼用于样品抗衰老功效评价。

液质联用系统: Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;串联 AB Sciex Triple TOF® 4600 高分辨质谱 SCIEX 公司; Milli-Q 超纯水系统 上海技舟化工科技有限公司; XS2051/10 万分之一电子天平及 MS3002S 型电子分析天平 梅特勒-托利多国际贸易有限公司; WF-

600EHT 型超声波清洗机 宁波海曙五方超声设备有限公司; RWB3220CY-2 高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; BB150 二氧化碳恒温箱、SH-PG-010 恒温水浴锅 美国 Thermo 公司; FlexStation 3 多功能酶标仪 美国 Molecular 公司; DMi8 倒置荧光显微镜 德国 Leica 公司; Heraeus Fresco17 高速冷冻离心机 德国 Thermo Fisher 公司; JXFSTPRP-24L 全自动样品快速研磨仪 上海净信实验设备科技部; HZ-9211K 恒温振荡器 太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 槐花水提物制备 槐花粉碎, 40 目过筛, 精密称定 20.0 g, 用 12 倍体积热水 100 °C 回流提取 2 次, 每次 1 h。提取液滤过, 合并滤液, 滤液真空浓缩到小体积, 冻干, 置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 AGEs 抑制实验 以 Mou 等^[17]的方法为基础, 稍加改进以建立 BSA-葡萄糖/D-果糖体系。用磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH7.40)配制 4 mg/mL BSA、0.5 mol/L 葡萄糖/D-果糖溶液及不同浓度的槐花水提物(31.3~2000.0 μg/mL)。将 BSA、葡萄糖/D-果糖和样品溶液过 0.45 μm 滤膜, 并等体积混合, 于 37 °C 下孵化 7 d。测定其经 360 nm 激发光激发后, 在 453 nm 处的荧光强度, 激发和发射狭缝宽度为 5 nm。样品对照组: 以 100 μL PBS 替代 100 μL BSA。空白组: 100 μL 样品溶剂替代 100 μL 样品溶液。空白对照组: 100 μL 样品溶剂替代 100 μL 样品溶液, 并用 100 μL PBS 替代 100 μL BSA。阳性对照组: 氨基胍(AG)用作阳性对照, 用水溶解配制成 2 mmol/L 溶液。芦丁、异槲皮苷、水仙苷、槲皮苷用 5% DMSO 溶解, 配制成 2 mmol/L 溶液, 并用 5% DMSO 稀释成各浓度梯度。槲皮素、异鼠李素用 10% DMSO 溶解, 配制成 1 mmol/L 溶液, 并用 10% DMSO 稀释成各浓度梯度。山奈酚用 20% DMSO 溶解, 配制成 0.5 mmol/L 溶液, 并用 20% DMSO 稀释成各浓度梯度。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (F_1 - F_2)/(F_3 - F_4)] \times 100$$

式中: F_1 : 样品组荧光值; F_2 : 样品对照组荧光值; F_3 : 空白组荧光值; F_4 : 空白对照组荧光值。

1.2.3 细胞抗糖化实验 以 Khmaladze 等^[18]的方法为基础, 采用 0.5 mmol/L 的 MGO 诱导 HDFs 细胞建立高 CML 模型。HDFs 细胞培养于含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中(含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素), 置 CO₂ 孵箱, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境下用于实验。

1.2.3.1 细胞活力测定 当细胞生长至对数期时, 0.25% 胰酶消化制成细胞悬液。并以每孔 10000 个细胞的密度接种到 96 孔板上。当细胞汇合达到 90% 时, 用不同浓度的样品处理(n=3)。48 h 后细胞在 PBS 中洗涤一次, 然后按生产说明书使用 CCK-

8 试剂盒检测细胞活力。酶标仪于 450 nm 处测定各孔的吸光度(A)值。实验分为空白组: 只含培养液; 对照组: 加培养液正常培养细胞; 实验组: 不同浓度(1~40 μg/mL)槐花水提物的培养液。按照公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_1 - A_3)/(A_2 - A_3) \times 100$$

式中: A_1 : 实验组吸光度; A_2 : 对照组吸光度; A_3 空白组吸光度。

1.2.3.2 槐花水提物对 MGO 诱导的 HDFs 细胞中 CML 表达量的影响 当细胞生长至对数期时, 消化制成细胞悬液。以每孔 5 万个细胞的密度接种到 12 孔培养皿上。48 h 后用 0.5 mmol/L MGO 处理细胞, 继续孵育 48 h, 空白组不加 MGO 继续孵育。随后, 加入阳性药(0.1 mmol/L 氨基胍溶液)或不同浓度的样品溶液(10、40 μg/mL)继续孵育 48 h, 空白组依旧不做任何处理继续孵育 48 h。弃去培养液, PBS 洗涤 1 次后, 4 °C 下用多聚甲醛固定细胞一晚。加入 0.1% 的 Triton-X-100 室温通透 5 min; PBS 清洗 2 次后, 加入 1% BSA 室温封闭 1 h。按照 1:50 稀释 CML 一抗, 4 °C 过夜; 次日滴加 1:1000 荧光标记的二抗在室温下孵育 2 h。加入含有 DAPI 的抗荧光猝灭封片液, 室温孵育 10 min 后在倒置荧光显微镜下观察, 显微镜下采集相关荧光图像。用 Image J 软件量化各组随机选取的不同视觉的 CML 绿色荧光强度。

1.2.4 斑马鱼体内 AGEs 抑制实验 槐花水提物用 0.4 mol/L 葡萄糖溶液配制成 20.0 mg/mL 母液, 现配现用。阳性对照: 氨基胍用超纯水配制成 20.0 mg/mL 母液, -20 °C 储存。

随机选取 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼于 1.5 mL 离心管中, 每管(实验组)均处理 10 尾斑马鱼。空白组给予水溶液, 模型组给予 0.4 mol/L 葡萄糖溶液建立斑马鱼 AGEs 增加模型, 同时设置阳性对照及样品组, 分别用 0.4 mol/L 葡萄糖溶液给予阳性对照 200 μg/mL 氨基胍溶液及不同浓度的槐花水提物(500、1000 和 2000 μg/mL), 每管容量为 150 μL。设置 3 个平行实验。60 °C 摇床处理 24 h 后, 离心取上清, 测定其经 360 nm 激发光激发后, 在 453 nm 处的荧光强度, 激发和发射狭缝宽度为 5 nm, 以该指标的统计学分析结果评价样品抗糖化功效。

1.2.5 UPLC-Q-TOF-MS 分析槐花化学成分 取槐花水提物适量, 加入 0.5 mL 纯水溶解, 超声 51 kHz 处理 5 min, 摇匀, 离心(转速为 12000 r/min)5 min, 取上清液进样分析。

超高效液相条件: 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相 A 为 0.2% 乙酸, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱: 0~8 min, 15%~50% B; 8~10 min, 50%~80% B; 10~12 min, 80% B; 12~13 min, 80%~15% B, 流速为 0.2 mL/min, 柱

温 30 ℃, 检测波长为 340 nm, 进样量 1 μL。

质谱条件: 离子源为 ESI 源; 一级质谱参数为扫描范围: 50~1700 m/z; 雾化气(psi): 50; 气帘气(psi): 35; 离子源电压(V): 5000; 离子源温度(℃): 500; 去簇电压(V): 100; 碰撞能(eV): 10。二级质谱参数为扫描范围: 50~1250 m/z; 去簇电压(V): 100; 碰撞能(eV): 40; 碰撞电压摆幅(eV): 20。

数据采集软件为 MassHunter Workstation Software LC/MS Data Acquisition for 6200 series TOF/6500 series Q-TOF(version B.06.01), 数据处理软件为 MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis(version B.07.00)。鉴定时优先将质谱数据与 MassHunter PCDL Manager(version B.07.00)数据库进行匹配, 根据各色谱峰得分信息对化合物进行初步筛选, 进一步根据各色谱峰一级、二级信息等对化合物进行确认。数据库中未收录的化合物, 则根据文献报道、质谱裂解规律等进行鉴定。

1.3 数据处理

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验数据进行分析, 数据结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 槐花水提取物对 AGEs 生成的影响

采用体外 BSA/还原糖体系作为非酶糖基化反应的模型, 考察槐花水提取物对 AGEs 生成的抑制活性。结果如图 1 所示, 不同浓度的槐花水提取物(31.25~2000.0 μg/mL)均有一定的体外抑制 AGEs 生成的活性, 抑制率为 38.47%±3.05%~94.63%±1.48%, 呈明显的剂量依赖关系, IC_{50} 为 53.93 μg/mL。阳性药氨基胍的 IC_{50} 为 26.03 μg/mL。尽管槐花水提取物的 IC_{50} 略高于阳性对照 IC_{50} , 其依然显示出较强的 AGEs 体外生成抑制活性。

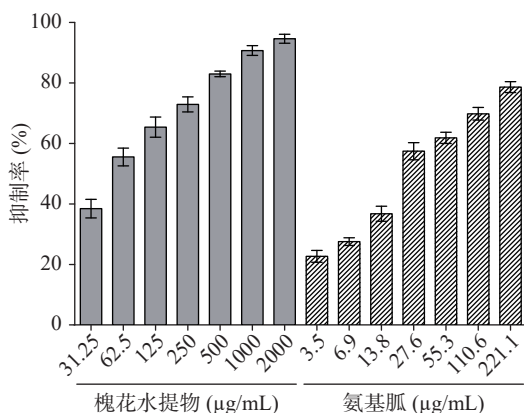


图 1 槐花水提取物对荧光性 AGEs 的抑制

Fig.1 Inhibition of fluorescent AGEs by *Sophora japonica* flower aqueous extract

2.2 槐花水提取物对 HDFs 细胞活力及 CML 表达量的影响

在 AGEs 的形成过程中, MGO 是非酶糖基化过

程中产生的中间体, 是重要的强活性前体^[19-20], 与赖氨酸侧链反应生成羧甲基赖氨酸(Nε-carboxymethyllysine, CML)^[21-23], 因此在蛋白质糖基化中起关键作用。随着年龄的增长 CML 会在人体内不断积聚增多, 并与特定的细胞表面受体结合, 诱导细胞信号通路的激活, 导致细胞功能障碍和细胞死亡, 使人表现出衰老现象^[24]。由于 CML 没有荧光性^[25], 常规的体外荧光分析法无法检测, 较为常见的是采用特异性结合的单克隆或多克隆抗体的免疫分析法测定 CML 含量^[26]。因此, 本文采用 MGO 诱导 HDFs 细胞表达 CML 进行细胞造模实验, 利用单克隆抗体免疫分析法研究槐花在 HDFs 细胞上的抗糖化效果。

由图 2 可知, 1~40 μg/mL 槐花水提取物与 HDFs 共孵育 48 h 后均未见明显的细胞毒性。因此, 选择安全剂量 10 及 40 μg/mL 作为低高剂量组继续实验。在 HDFs 细胞模型中, 图 3A 显示空白组 CML 绿色荧光响应值很低, 说明正常细胞本身几乎不分泌 CML。模型组用 MGO 处理 HDFs 以诱导糖基化, 其 CML 表达量是空白组的 5.8 倍, 表明 MGO 可显著诱导 CML 的表达($P < 0.0001$)。阳性对照组与模型组相比, CML 表达量极显著降低了 88.11%($P < 0.0001$)。实验中分别选用 10 及 40 μg/mL 槐花水提取物和模型组细胞共孵育, 结果由图 3B 可知, 槐花水提取物对 MGO 诱导的糖基化均有极显著的抑制作用($P < 0.0001$), 与模型组相比 CML 表达量分别降低了 72.28% 和 83.85%, 高浓度抑制效果接近于阳性对照药物。

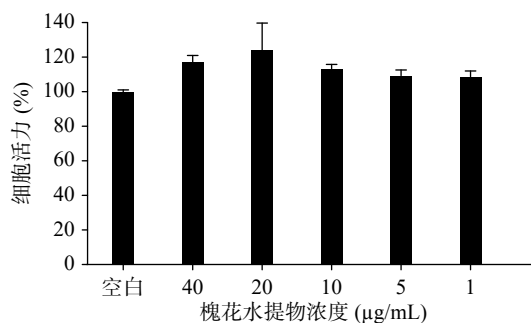


图 2 槐花水提取物对成纤维细胞(HDFs)的细胞毒性

Fig.2 Cytotoxicity of *Sophora japonica* flower aqueous extract to fibroblasts(HDFs)

2.3 槐花水提取物对斑马鱼体内 AGEs 生成的影响

斑马鱼(Danio rerio)属于热带鱼类, 是一种小型脊椎动物。其基因组与人类基因组有 70% 的相似性, 与已知的人类疾病基因有 80% 以上同源性^[27]。相比于其他动物模型, 斑马鱼有其独特优势, 例如发育快, 成本低, 可快速大量繁殖, 药物处理方便(可直接从水中吸收药物)、能实时动态观察表型等优点, 有研究发现长时间暴露于高浓度葡萄糖溶液中会使斑马鱼体内产生大量 AGEs 及糖化血红蛋白^[28-29], 在抗糖化活性评价方面具有广泛的应用前景^[30]。因此, 本文采用高糖诱导斑马鱼生成 AGEs, 并研究槐花水提取物在斑马鱼模型上的抗糖化效果。

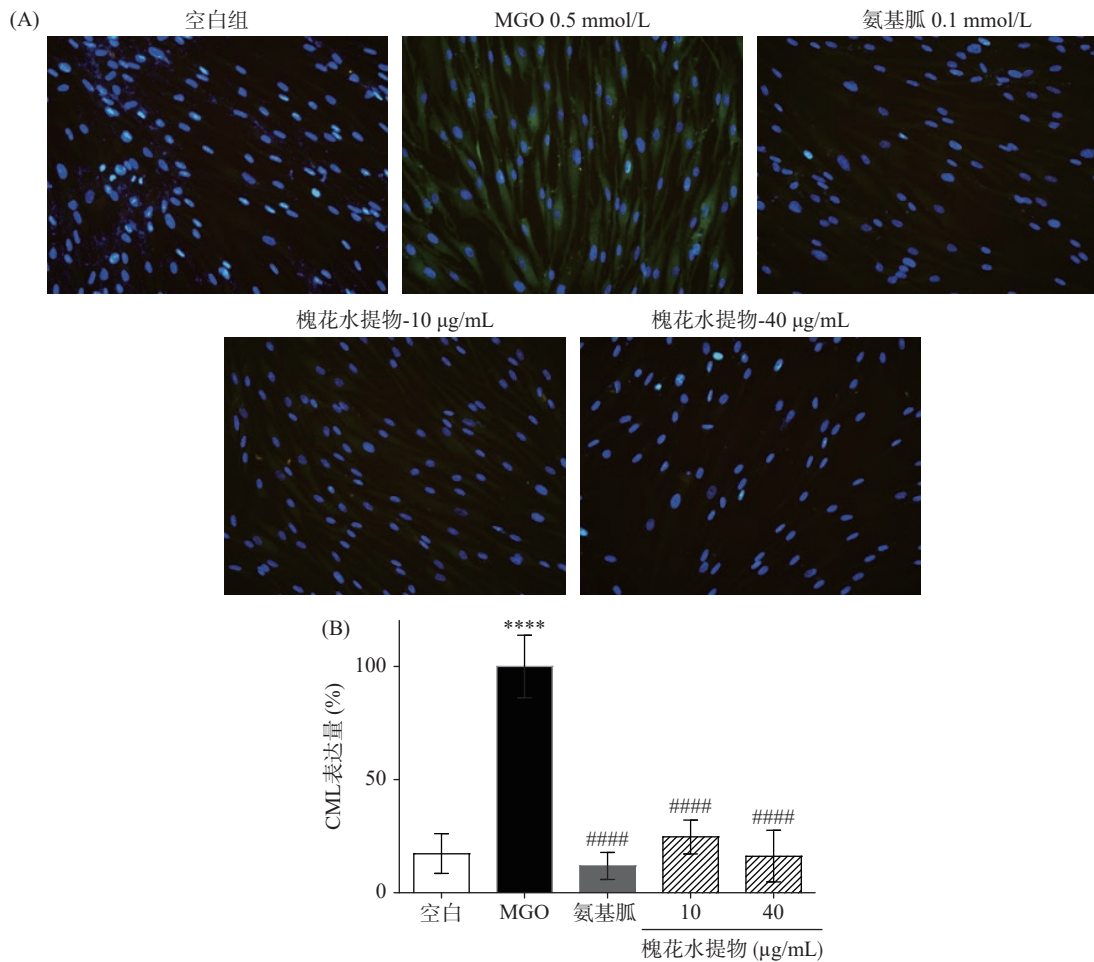


图 3 槐花水提取物对 MGO 诱导 HDFs 细胞 CML 表达量的影响

Fig.3 The effect of CML expression in glyoxal-induced HDFs by *Sophora japonica* flower aqueous extract
注: (A)免疫荧光图像; (B)CML 表达量统计结果; 与空白组比较, **** $P<0.0001$; 与模型组比较, #### $P<0.0001$ 。

如图 4, 与空白组比较, 用 0.4 mol/L 葡萄糖溶液处理的斑马鱼作为模型组, 其 AGEs 生成量显著升高 ($P<0.001$), 是空白组的 1.2 倍。与模型组相比, 阳性对照组 AGEs 生成量显著降低 13.9% ($P<0.001$)。而槐花水提取物样品组在 500、1000 及 2000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时对斑马鱼的糖基化反应均发生了极显著的抑

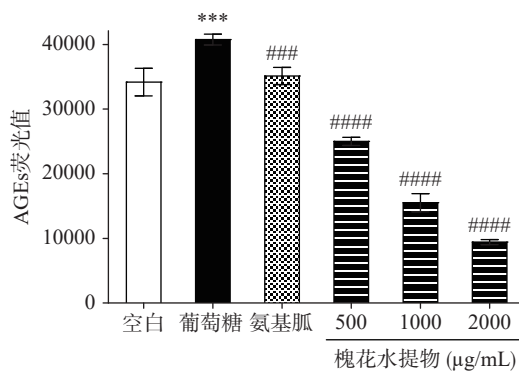


图 4 槐花水提取物对斑马鱼体内 AGEs 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Effects of *Sophora japonica* flower aqueous extract on AGEs production in zebrafish

注: 与空白组比较, *** $P<0.001$, 与模型组比较, #### $P<0.0001$, ##### $P<0.0001$ 。

制作用 ($P<0.0001$), 分别降低了 38.65%, 61.94% 及 76.85%, 且呈剂量依赖关系。

2.4 槐花水提取物化学成分分析

通过 UPLC-Q-TOF-MS 对槐花提取液进行分析, 结合“Analyst 1.1.7”及“Peakview 1.2.0.3”软件中色谱峰对应的准分子离子信息、二级碎片信息, 并参考相关文献(表 1), 初步鉴定了 14 个化合物(见图 5), 均为黄酮类化合物。化合物 12 的一级质谱准分子离子峰为 $m/z301.03$, UPLC-Q-TOF-MS 根据数据处理软件计算其分子式可能为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, 其二级碎片 $m/z179$ 、151、121 对应的元素依次为 $\text{C}_8\text{H}_3\text{O}_5$ 、 $\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_4$ 和 $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$, 与文献报道的槲皮素相一致^[31]。化合物 1~6、9~11 均含有二级离子碎片 $m/z301$, 是苷元槲皮素的离子峰, 推测均为槲皮素衍生物。化合物 5 的分子离子峰 [M-H] 的 m/z 值为 609.14, 丢失末端鼠李糖分子形成碎片 $m/z463.08$, 离子丢失芸香糖形成碎片 $m/z301.03$, 根据上述信息, 并与标准品出峰时间比对, 推断化合物 5 为槲皮素-3-O-葡萄糖-鼠李糖苷(芦丁), 与文献 [32] 报道的相一致, 是槐花的主要成分^[33]。其他化合物也依据其保留时间、碎片信息、参考文献进行初步推断, 结果见表 1。

表1 UPLC-QTOF-MS法鉴定槐花水提物主要成分

Table 1 Compounds of *Sophora japonica* flowers aqueous extract identified by UPLC-QTOF-MS

序号	时间(min)	中文名	分子式	分子量	加合离子	MS	MS/MS数据	ppm	参考文献
1	3.33	槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	772.21	[M-H] ⁻	771.1965	609.1447;446.0843;301.0341;271.0219	-2.4	[34]
2	3.45	槲皮素-3-葡萄糖基-(1→2)-鼠李糖苷-7-鼠李糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	756.21	[M-H] ⁻	755.2022	609.1447;446.0843;301.0843;271.0219	-1.7	[34]
3	3.55	槲皮素-7-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15	[M-H] ⁻	609.1448	463.0825;301.0327;300.0264;271.0229	-1.2	[34]
4	4.01	/	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	742.20	[M-H] ⁻	741.1867	609.1462;463.0875;301.034;178.9979	-1.5	
5	4.35	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15	[M-H] ⁻	609.1483	463.0825;301.0327;300.0264;178.9964	4.5	[35]
6	4.71	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.10	[M-H] ⁻	463.0874	301.0320;300.0269;271.0241;178.9982	-0.5	[34]
7	4.86	山奈酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.16	[M-H] ⁻	593.1509	285.0390;284.0322;255.0292;151.0033	0.4	[36]
8	4.96	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.17	[M-H] ⁻	623.1617	315.0502;300.0265;151.0027	0.8	[37]
9	5.08	槲皮素-3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15	[M-H] ⁻	609.1457	301.0344;300.0256;178.9964;151.0031	0.2	[38]
10	5.33	槲皮素-3-O-新橙皮糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15	[M-H] ⁻	609.1453	301.0343;300.0263;178.9973;151.0033	-0.4	[39]
11	6.01	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.10	[M-H] ⁻	447.0929	301.0339;300.0269;255.0279;151.0030	0.4	[38]
12	7.47	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04	[M-H] ⁻	301.0359	178.9971;151.0033;121.0292;107.0137	3.6	[38]
13	8.75	山奈酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.05	[M-H] ⁻	285.0411	255.0268;227.0337;143.0488;117.0337	4.2	[38]
14	8.91	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.06	[M-H] ⁻	315.0504	300.0261;271.0241;151.0027;107.0133;63.0235	-0.2	[40]

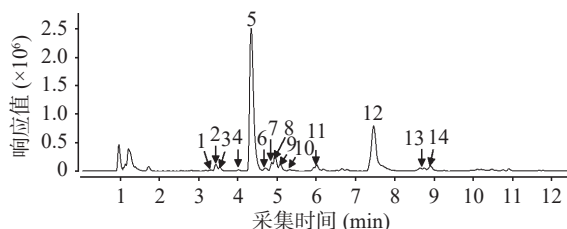


图5 槐花水提物的基峰总离子流图(负离子模式)

Fig.5 Total ion chromatogram of *Sophora japonica* flower aqueous extract samples (negative ion mode)

2.5 槐花水提取物中主要化合成分对 AGEs 生成的抑制活性

选取槐花中主要且市售易得的7个黄酮类化合物(芦丁5、异槲皮苷6、水仙苷8、槲皮苷11、槲皮素12、山奈酚13、异鼠李素14)进行AGEs抑制活性分析,结果如图6所示。7种化合物均能有效地抑

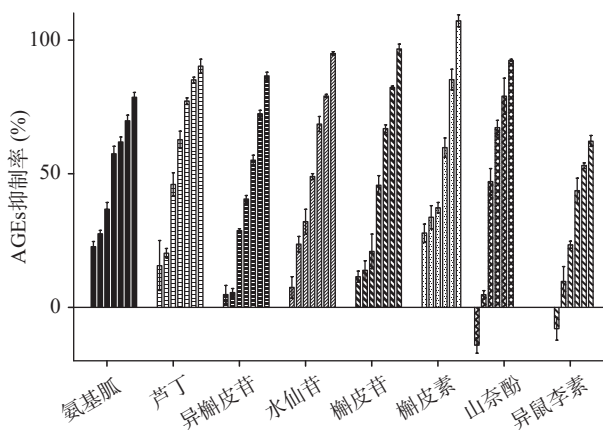


图6 槐花水提取物中部分化学成分对荧光性AGEs的抑制活性

Fig.6 Inhibition of fluorescent AGEs by compounds from *Sophora japonica* flower aqueous extract

注:氨基胍、芦丁、异槲皮苷、水仙苷、槲皮苷浓度:31.25~2000 μmol/L;槲皮素、异鼠李素浓度:31.25~1000 μmol/L;山奈酚浓度:7.8~500 μmol/L。

制糖基化终末产物 AGEs 的产生,并且随着化合物浓度的增加活性增强,呈现出浓度依赖关系。化合物5、6、8、11~14的IC₅₀分别为165.5、383.2、244.5、290.3、133.0、42.9和457.0 μmol/L,山奈酚的活性最高,异鼠李素活性最弱。其中山奈酚、槲皮素和芦丁的IC₅₀低于阳性药氨基胍,IC₅₀排序为:山奈酚<槲皮素<芦丁<阳性对照药物氨基胍(IC₅₀,235.5 μmol/L),显示出非常好的AGEs抑制活性。山奈酚和异鼠李素结构非常相似,异鼠李素仅在5'位多了一个甲氧基,有可能C环4'-OH和5'-OCH₃形成分子内氢键,从而影响活性表达。槲皮素为黄酮苷元,当其3-OH变成3-O-糖苷时(芦丁、槲皮苷和异槲皮苷),活性有所下降。因此,推测槐花水提取物的抗糖化功效可能与其黄酮类化合物体外抑制非酶糖基化有关。

3 讨论与结论

人体组织中的糖化过程是非常漫长的过程^[41],过多的生成和积累AGEs会对机体造成不可逆的损害,诱导多种糖尿病并发症的产生。皮肤胶原蛋白中存在多种AGEs,包括CML,其含量的积累会损伤皮肤成纤维细胞^[42-43],造成皮肤老化和暗斑的形成。本实验通过创建不同抗糖化评价模型,如BSA/还原糖体系评价方法、MGO诱导成纤维(HDFs)细胞损伤模型以及斑马鱼AGEs生成模型,全面评估槐花水提取物的抗糖化效果。体外BSA/还原糖体系,发现槐花水提取物能明显抑制AGEs生成,IC₅₀为53.93 μg/mL;进而在HDFs细胞模型上发现槐花水提取物能抑制细胞糖化过程,极显著降低HDFs细胞的CML表达量(P<0.0001),提示槐花的抑制糖基化作用机制可能就是通过抑制CML的合成路径;最后在斑马鱼体系中进一步验证了槐花水提取物的糖基化抑制作用,2 mg/mL浓度时,与模型组相比,糖基化程度降低了76.85%。蒋楠等^[16]研究发现,槐花提取物与MGO共孵育后,

其主要成分芦丁会发生明显变化,并推测是芦丁与 MGO 结合,从而阻止糖化反应的进行。但并没有直接研究槐花提取物及其活性成分的抗糖化效果。

为了进一步研究槐花抑制糖基化的主要活性成分,采用 UPLC-QToF/MS 技术分析并鉴定了槐花水提物中 14 个化学成分,主要为以芦丁为代表的黄酮类成分。选取其主要成分芦丁、异槲皮苷、水仙苷、槲皮苷、槲皮素、山奈酚、异鼠李素等 7 种黄酮类化合物进行了生化体系中 AGEs 抑制实验,结果发现 7 种黄酮类成分均能显著抑制 AGEs 的生成,初步认为槐花水提物的抗糖化效果可能是黄酮类化合物共同作用的结果。其中芦丁、槲皮素和山奈酚的糖基化抑制活性高于阳性药物氨基胍,其 IC_{50} 值山奈酚 ($42.9 \mu\text{mol/L}$) < 槲皮素 ($133.0 \mu\text{mol/L}$) < 芦丁 ($165.5 \mu\text{mol/L}$) < 氨基胍 ($235.5 \mu\text{mol/L}$)。槲皮素和山奈酚作为黄酮苷元,与其他化合物相比,对 AGEs 生成的抑制效果最佳。韩文凤^[44] 通过研究三种黄酮单体对 CML 的抑制作用,也发现对 CML 的抑制率苷元大于苷同时芦丁作为槐花中含量最高的活性成分,含量在 5.94%~9.43% 之间^[45],同时芦丁在体内也能进一步代谢为槲皮素^[46],因此推测槐花抗糖化活性的主要贡献来自于芦丁。国外文献报道,部分黄酮类化合物可通过捕获 MGO 和 GO 二羰基化合物形成加合物,从而抑制 AGEs 的形成^[47]。且抑制糖基化能力可能与黄酮类化合物羟基的位置、数量及取代基种类有关^[48-49],但具体作用机制目前还不清楚,值得后续进一步深入研究。

本文分别从体外生化、细胞、斑马鱼体系全面评估了槐花水提物的抗糖化作用,并鉴定了槐花水提物中主要的抗糖化活性成分,为槐花提取物在抗糖化作用方向提供数据参考和依据,也为以后槐花的综合开发应用提供理论支持依据。

参考文献

[1] ELOSTA A, GHOU S, AHMED N. Natural products as anti-glycation agents: Possible therapeutic potential for diabetic complications[J]. *Current Diabetes Reviews*, 2012, 8(2): 92-108.

[2] WEI Q, LIU T, SUN D, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 82: 32-45.

[3] DARIVA B, NAGARAJU G. Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(9): 1614-1623.

[4] BUSER W, ERBERSDOBLER H F, LIARDON R. Identification and determination of N ϵ -carboxymethyllysine by gas-liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1987, 387: 515-519.

[5] 韩文凤, 谭兴和, 林晓丽, 等. 食品中羧甲基赖氨酸的形成机理和抑制途径研究进展[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(1): 251-257.

[HAN W F, TAN X H, LIN X L, et al. Research progress on formation mechanism and inhibition pathway of carboxymethyl lysine

in food[J]. *Modern Food Technology*, 2018, 34(1): 251-257.]

[6] EMEL V. Glycation, antiglycation, and deglycation: Their role in aging mechanisms and geroprotective effects (literature review)[J]. *Advances in Gerontology*, 2017, 7(1): 1-9.

[7] OTT C, JACOBS K, HAUCKE E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling[J]. *Redox Biology*, 2014, 2: 411-429.

[8] NEDIC O, RATTAN S, GRUNE T, et al. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signaling pathways, ageing and pathophysiology[J]. *Free Radical Research*, 2013, 47(Suppl 1): 28-38.

[9] AHMED N. Advanced glycation end products role in pathology of diabetic complications[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2005, 67(1): 3-21.

[10] FERREIRA C, PENNACCHI P C, ARAUJO T H, et al. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 772: 83-91.

[11] RICHARDSON M A, FURLANI R E, PODELL B K, et al. Inhibition and breaking of advanced glycation end-products (AGEs) with bis-2-aminoimidazole derivatives[J]. *Tetrahedron Letters*, 2015, 56(23): 3406-3409.

[12] 郑子锋, 孙培冬. 龙眼核多酚对蛋白非酶糖基化的抑制及机制研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(9): 25-31. [ZHENG Z F, SUN P D. Inhibition and mechanism of longan nuclear polyphenols on non-enzymatic glycosylation of protein[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(9): 25-31.]

[13] LEE H L, LEE C J, CHOI S Y, et al. Inhibitory effect of sea buckthorn extracts on advanced glycation end product formation[J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131364.

[14] ALI M Y, JANNAT S, RAHMAN M M. Ginsenoside derivatives inhibit advanced glycation end-product formation and glucose-fructose mediated protein glycation *in vitro* via a specific structure-activity relationship[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 111: 104844.

[15] 刘金亮, 李隆云, 何光华, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学与抗氧化能力评价不同产地槐米的品质[J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4644-4652. [LIU J L, LI L Y, HE G H, et al. Evaluation of quality of *Sophora japonica* from different habitats by HPLC fingerprint combined with stoichiometry and antioxidant capacity[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2018, 49(19): 4644-4652.]

[16] 蒋楠, 王富静, 封亮, 等. 基于非酶糖基化反应的槐花抑制 AGEs 形成的活性组分筛选[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(14): 3100-3106. [JIANG N, WANG F J, FENG L, et al. Screening of active components of *Sophora japonica* for inhibiting AGEs formation based on non-enzymatic glycosylation[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 44(14): 3100-3106.]

[17] MOU L, HU P, CAO X, et al. Comparison of bovine serum albumin glycation by ribose and fructose *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2022, 1868(1): 166283.

[18] KHMALADZE I, OSTERLUND C, SMILJANICS, et al. A novel multifunctional skin care formulation with a unique blend of antipollution, brightening and antiaging active complexes[J]. *Jour-*

- nal of Cosmetic Dermatology, 2020, 19(6): 1415–1425.
- [19] PARK S H, DO M H, LEE J H, et al. Inhibitory effect of arachis hypogaea (peanut) and its phenolics against methylglyoxal-derived advanced glycation end product toxicity[J]. Nutrients, 2017, 9(11): 12–14.
- [20] MARAMALDJ G, TOGNI S, FRANCESCHI F, et al. Anti-inflammation and antiglycation activity of a novel botanical ingredient from African biodiversity (Centevita™)[J]. Clinical Cosmetic & Investigational Dermatology, 2013, 7: 1–9.
- [21] ZENG, J, DAVIES, M J. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl) cysteine on reaction of α -Dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins[J]. Chemical Research in Toxicology, 2005, 18(8): 1232–1241.
- [22] SCHWARZENBOLZ U, HENLE T, HAENER R, et al. On the reaction of glyoxal with proteins[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1997, 205(2): 121–124.
- [23] ERBERSDOBLER H F, SOMOZA V. Forty years of furo-sine-forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(4): 423–430.
- [24] KASPER M, FUNK H W. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs)[J]. Archives of Gerontology and Geriatrics, 2001, 32(3): 233–243.
- [25] SHARMA C, KAUR A, THIND S S, et al. Advanced glycation end-products (AGEs): An emerging concern for processed food industries[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(12): 7561–7576.
- [26] GARAY M E, LUEVANO C, CHAPMAN K. Nutritional modulation of advanced glycation end products[J]. Molecular Basis of Nutrition & Aging, 2016: 263–276.
- [27] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498–503.
- [28] GUTIERREZ M P, VELAZQUEZ E G. Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *Spinacia oleracea* (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase activity (RLAR)[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 128: 110–299.
- [29] ALVAREZ Y, CHEN K, REYNOLDS A L, et al. Predominant cone photoreceptor dysfunction in a hyperglycaemic model of non-proliferative diabetic retinopathy[J]. Disease Models & Mechanisms, 2010, 3(3): 236–245.
- [30] ADAM M S, MICHAEL N, KEITH W, et al. Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD)[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2014, 50(1): 27–36.
- [31] 侯晓楠. 槐米中功效成分的分离纯化及其生物活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2018. [HOU X N. Purification and bioactivity of active components from *Sophora japonica*[D]. Tianjing: Tianjing University, 2018.]
- [32] 王翼, 顾苑婷, 丁筑红, 等. 超高效液相色谱-串联高分辨质谱对刺梨槲皮素及其糖苷类化合物的鉴定分析[J]. 分析化学, 2020, 48(7): 955–961. [WANG Y, GU Y T, DING Z H, et al. Identification and analysis of quercetin and its glycosides of *Rosa roxburghii* Tratt by ultra-performance liquid chromatography-tandem high resolution mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2020, 48(7): 955–961.]
- [33] 李文杰, 高志慧. 刺槐的槐花与槐米营养成分和芦丁含量的比较[J]. 食品工业, 2020, 41(3): 337–339. [LI W J, GAO Z H. Comparison of nutrient composition and rutin content between flowers and buds of *Sophora japonica*[J]. Food Industry, 2020, 41(3): 337–339.]
- [34] ABAD B, LOBATO S G, BERRUETA L A, et al. On-line characterization of 58 phenolic compounds in citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry[J]. Talanta, 2012, 99(15): 213–224.
- [35] 钟月葵, 蔡庆群, 丘振文. 超高效液相色谱法测定不同产地桑叶中4种主要黄酮含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 55–60. [ZHONG Y K, CAI Q Q, QIU Z W. Determination of four flavonoids in *Folium mori* from different habitats by ultra-performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2021, 12(5): 55–60.]
- [36] TANG Y, WANG J H, LI Y F, et al. Flavonols and flavonol glycosides from the pericarp of *Sophora japonica*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2001, 10(2): 59–60.
- [37] 皮文霞, 赵文望, 蔡宝昌, 等. 槐花对照提取物的制备及槐花中4个黄酮类成分的含量测定[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 52–59. [PI W X, ZHAO W W, CAI B C, et al. Extracts preparation and determination of four flavonoids in *Sophora japonica*[J]. Chinese Pharmacy, 2018, 29(19): 52–59.]
- [38] YANG Y, TIAN Y P, ZHANG Q H, et al. Comparative effects of flavonoids from fructus sophorae on rat osteoblasts *in vitro*[J]. Records of Natural Products, 2019, 14(1): 65–76.
- [39] DEVKOTA H P, KAWAMURA K, SASANUMA M, et al. Flavonoid glycosides from the leaves of *Aphananthe aspera* (Thunb.) Planch. (Cannabaceae) and their chemotaxonomic significance[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2019, 83: 112–113.
- [40] 李尧尧, 原思通. 中药槐花饮片 RP-HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 37–41. [LI R R, YUAN S T. Study on RP-HPLC characteristic chromatogram of *Sophora japonica* decoction pieces[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(11): 37–41.]
- [41] 杨益宁. 糖基化终产物对人肾系膜细胞胞外基质和 mmp-2 表达影响及氨基胍干预[D]. 南京: 东南大学, 2006. [YANG Y N. Effect of glycosylation end products on extracellular matrix and mmp-2 expression in human renal mesangial cells and intervention of aminoguanidine[D]. Nanjing: Dongnan University, 2006.]
- [42] ALIKHANI Z, ALIKHANI M, BOYD C M, et al. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(13): 12087–12095.
- [43] 郭昊. 石榴提取物对角质形成细胞抗氧化、抗糖化、抗炎作用和 Paget 病研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020. [GUO H. Study on antioxidation, anti-glycosylation, anti-inflammatory effects

- of pomegranate extract on keratinocytes and Paget's disease[D]. Shenyang: China Medical University, 2020.]
- [44] 韩文凤. 水果多酚抑制食品中羧甲基赖氨酸形成的作用机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020. [HAN W F. Study on the mechanism of fruit polyphenols inhibiting the formation of carboxymethyl lysine in food[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020.]
- [45] 唐燕玲, 罗卓卡, 蔡庆群, 等. 超高效液相色谱法测定不同产地槐花中 4 种黄酮含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(21): 8. [TANG Y L, LUO Z K, CAI Q Q, et al. Determination of four flavonoids in *Sophora japonica* from different producing areas by ultra-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2020, 11(21): 8.]
- [46] 伍明江, 吴晓磊, 张德芹, 等. UPLC-Q-TOF/MS 鉴定芦丁在大鼠体内的代谢产物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 7. [WU M J, WU X L, ZHANG D Q, et al. Identification of metabolites of rutin in rats by UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulae*, 2017, 23(17): 7.]
- [47] LI L S, SHAO X, CHEN H D, et al. Genistein inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(4): 579–586.
- [48] MATSUDA H, WANG T, MANAGI H, et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities[J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(24): 5317–5323.
- [49] WU C H, HUANG S M, LIN J A, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs[J]. *Food & Function*, 2011, 2(5): 224.