

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.06.002

己糖修饰的糖基化卵清蛋白产物及其致敏性分析

Analysis of glycation products and sensitization of ovalbumin modified by different hexoses

毛积华¹ 王 辉¹ 涂宗财^{1,2} 钟比真¹MAO Ji-hua¹ WANG Hui¹ TU Zong-cai^{1,2} ZHONG Bi-zhen¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 江西师范大学功能有机小分子教育部重点实验室, 江西 南昌 330022)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China;

2. Key Laboratory of Functional Small Organic Molecule, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要:研究了不同己糖修饰的糖基化卵清蛋白的接枝度、表面疏水性、紫外光谱、荧光光谱及致敏性变化。结果表明:半乳糖修饰的卵清蛋白糖基化程度最高,果糖修饰的最低;糖基化反应使卵清蛋白表面疏水性降低;紫外光谱和荧光光谱构象表征表明,糖基化过程中的热处理以及分子基团的改变破坏了卵清蛋白原有构象,使芳香族氨基酸外露,且半乳糖对卵清蛋白构象的破坏程度最高;糖基化反应使卵清蛋白致敏性降低,但果糖修饰的卵清蛋白的 IgG/IgE 结合力下降轻微,远低于半乳糖和葡萄糖的。

关键词:卵清蛋白;己糖;糖基化反应;致敏性;IgG/IgE 结合能力

Abstract: The grafting degree, surface hydrophobicity, ultraviolet spectrum, fluorescence spectrum and sensitization of glycosylated ovalbumin modified by different hexoses were studied. The results showed that galactose-modified ovalbumin had the highest degree of glycosylation and the lowest fructose modification; the glycosylation reaction reduced the surface hydrophobicity of ovalbumin. UV and fluorescence conformational characterization showed that heat treatment during glycosylation, and the change of molecular group destroyed the original conformation of ovalbumin, with exposing the aromatic amino acid, and the highest degree of destruction of ovalbumin conformation by galactose. The glycosylation reduced the allergenicity of ovalbumin, while the binding capacity of fructose-modified ovalbumin IgG/IgE

decreased slightly, which was much lower than that of galactose and glucose.

Keywords: ovalbumin; hexose; glycation reaction; allergenicity; IgG/IgE binding ability

食物过敏是由于食物的特定成分(通常是蛋白质,也可能是化学半抗原)被人体免疫细胞识别并引发特异性免疫反应导致的过敏症状,其机理可分为免疫球蛋白 E (IgE) 介导、非 IgE 介导和混合型介导^[1]。目前大部分食物过敏为 IgE 介导的,在食物摄入后的 1 h 内产生过敏症状,但也有免疫球蛋白 G (IgG) 介导的案例^[2]。目前,引起过敏的食物至少有 160 种,其中 90% 以上的食物过敏都是由鸡蛋、牛奶、鱼、贝类、花生、其他坚果、大豆和含麸质的谷类食品造成的^[3]。

卵清蛋白(ovalbumin, OVA)是蛋清中含量最高的蛋白^[4],是一种由 385 个氨基酸组成的水溶性蛋白,等电点为 4.5,分子量为 45 kDa,具有免疫调节等生物活性^[5]。此外,OVA 同时含有的疏水基团和亲水基团赋予其优良的乳化性、起泡性和凝胶性,故一直被用作乳化剂、起泡剂和胶凝剂等^[6-7]。

糖基化是美拉德反应的前期阶段,是食品加工中经常发生的反应。糖基化反应能改变食物过敏原的功能特性^[8]和过敏特性。Li 等^[9]研究表明,以乳清分离蛋白与麦芽糖质量比 1.04 : 1,于 60.8 °C 反应 54.3 h 时,乳清分离蛋白显现出最低的抗原性。研究^[10-11]表明,当温度为 40~80 °C,相对湿度为 60%~85% 时,糖基化反应的接枝效果最好。试验拟以 OVA 和不同己糖(果糖、葡萄糖、半乳糖)为原料,在相对湿度 74%、65 °C 反应 3 h,采用理化分析和光谱分析等方法研究糖基化 OVA 自由氨基含

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:21706111)

作者简介:毛积华,男,南昌大学在读硕士研究生。

通信作者:王辉(1982—),女,南昌大学副研究员,博士。

E-mail: wanghui00072@aliyun.com

收稿日期:2020-03-30

量、表面疏水性、紫外吸收光谱、内源和同步荧光光谱以及 IgG/IgE 结合力的变化规律,探究不同己糖在最适糖基化修饰条件下对 OVA 糖基化反应及其 IgG/IgE 结合能力的影响,旨在为 OVA 的致敏性降低提供一定方法参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

卵清蛋白:Grade V,美国 Aldrich-sigma 公司;

L-赖氨酸:Vetec 优级纯,美国 Aldrich-sigma 公司;

葡萄糖($\geq 98\%$)、果糖($\geq 99\%$)、半乳糖($\geq 99\%$):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

大耳兔:雄性,3 月龄,重量 2 kg 左右,南昌龙平兔业有限公司;

IgE 所用一抗:6 个鸡蛋过敏病人血清(其相关信息见表 1),美国 Plasmalab 公司;

表 1 鸡蛋过敏病人信息

Table 1 Egg allergy patients' information

年龄	性别	临床症状	其他过敏	IgE/(kU · l ⁻¹)
33	男	过敏性鼻炎	动物过敏	12.8
47	女	过敏性鼻炎	无	10.8
51	男	过敏性鼻炎	牛草过敏	13.5
49	男	过敏性鼻炎	虾类过敏	16.5
28	男	过敏性鼻炎	牛草过敏	24.9
16	男	过敏性鼻炎	花生过敏	26.3

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:ML 104/02 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-4 型,常州爱华仪器制造有限公司;

pH 计:PHS 25 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

酶标仪:Synergy H1 型,美国伯腾仪器有限公司;

紫外分光光度计:U-2910 型,日本日立高新技术公司;

荧光分光光度计:F-7000 型,日本日立高新技术公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 OVA 分别与葡萄糖、半乳糖、果糖以质量比 2 : 1 溶解于 PBS 溶液(0.1 mol/L,pH 8.0),冻干,于 65 °C,相对湿度 74% 的糖基化反应模型中反应 3 h,冰浴 30 min,透析,将样品浓度调至 1 mg/mL,于 -20 °C 冰箱备用。葡萄糖、半乳糖、果糖糖基化产物分别命名为

O-glc、O-gal、O-fru。

1.2.2 接枝度的测定 参照 Nielsen 等^[12]的方法并略作修改。准确称取 7.62 g 硼砂、0.2 g SDS 和 176 mg DTT 溶解于 150 mL 蒸馏水中,0.16 g OPA 溶于 4 mL 无水乙醇中,混匀,定容至 200 mL。取 50 μ L 质量浓度为 4 mg/mL 的样品与 1 mL OPA 混合,避光反应 2 min,测定 340 nm 处吸光值。按式(1)计算接枝度。

$$DG = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

DG——接枝度,%;

A₀——未糖基化的 OVA 吸光度值;

A₁——糖基化 OVA 吸光度值。

1.2.3 表面疏水性的测定 参照 Xiang 等^[13]的方法并略有修改。用 PBS(10 mmol/L, pH 7.4) 将样品稀释至 0.125,0.250,0.500 mg/mL,取 4 mL 样品与 20 μ L ANS 溶液(8 μ mol/L)混合,于荧光光度计中扫描。激发波长 370 nm,狭缝宽度 5 nm,发射波长 400~600 nm,扫描速度 600 nm/min,将荧光强度对蛋白浓度作图进行拟合,其斜率即表面疏水性。

1.2.4 紫外光谱扫描 样品稀释至 1 mg/mL,狭缝宽度 1.5 nm,扫描速度 1 200 nm/min,扫描波长 250~350 nm。

1.2.5 荧光光谱扫描 样品稀释至 1 mg/mL,内源荧光扫描条件为激发波长 290 nm,扫描速度 1 200 nm/min,狭缝宽度 5 nm,扫描波长 250~450 nm;同步荧光扫描条件为扫描速度 1 200 nm/min,狭缝宽度 5 nm,激发波长 275~350 nm 或 230~350 nm,激发与发射波长间隔($\Delta\lambda$) 15 nm 或 60 nm。

1.2.6 兔抗 OVA 血清的制备 将 4 只大耳兔平均分成两组,分别命名为空白对照组(1 号和 2 号兔)和抗原注射组(3 号和 4 号兔),喂养 5 d 无异常后开始免疫。采用静脉注射,注射所用试剂和耗材均为无菌级。具体步骤为:用 10 mmol/L,pH 7.4 的 PBS 溶液将 99% 的 OVA 稀释至 3 mg/mL,第一次免疫加等体积弗氏完全佐剂进行乳化,并按 1 mg/只的量沿兔耳缘静脉注射进行免疫。初次免疫后的第 2,4,6 周分别使用等量的弗氏不完全佐剂乳化 OVA,按 0.5 mg/只进行加强免疫 3 次。第 7 周时沿兔耳缘静脉采血 1 mL,参照李雪^[14]的方法测量兔血清效价。效价 > 10 000,表明抗体水平较高,可停止继续免疫,从心脏大量采血^[15]。将采集到的全血倾斜于 37 °C 烘箱中平衡 0.5 h,然后于 4 °C 冰箱过夜,6 000 r/min 离心 10 min,用已灭菌的离心管分装于 -40 °C 冰箱备用^[16]。

1.2.7 IgG/IgE 结合能力的测定 参照 Yang 等^[17]的方法并稍有修改。IgG 所用一抗为实验室自制兔抗 OVA 血清。将 100 μ L 4 μ g/mL 的 OVA 加入酶标板中,37 °C 孵育 2 h,用 PBST 洗板 3 次,每次 5 min。再加入 250 μ L

1%鱼明胶,37℃封闭2h。同时将等量的兔抗OVA血清(PBST稀释至1:60万)与样品(PBST稀释至2μg/mL)于离心管中混匀,37℃预孵育1h。封闭结束后洗板,再将100μL预孵育的样品与血清混合液加入酶标板中,37℃孵育1h,洗涤。将100μL辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG酶标二抗(PBST稀释至1:5000)加入酶标板,37℃孵育1h,洗板,加入100μL TMB显色液,37℃孵育15min,最后加入100μL的2mol/L硫酸,测定450nm处吸光度。

IgE结合能力测定与IgG的相似,不同之处在于IgE所用封闭液为5%脱脂奶粉,样品、一抗人血清与羊抗人IgE酶标二抗分别用封闭液稀释至1μg/mL、1:20和1:400。IgG和IgE结合能力用抑制率表示,并按式(2)计算。

$$I_n = \frac{A}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

I_n ——抑制率,%;

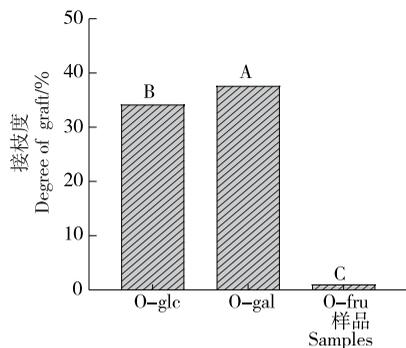
A, A_0 ——分别表示含有样品的吸光度和阳性对照孔(用抗体稀释液代替样品)的吸光度。

1.2.8 统计学分析 采用SPSS 25.0对试验数据进行统计学分析,采用GraphPad Prism 8进行绘图分析,所有试验均重复3次。

2 结果与分析

2.1 接枝度

由图1可知,O-fru的接枝度仅为1.1%,O-glc与O-gal的接枝度分别为34.2%,37.7%,与O-fru的差异显著,3种己糖在干热条件下与OVA发生糖基化修饰反应的活性程度为半乳糖>葡萄糖>果糖。半乳糖、葡萄糖分子中含有醛基,而果糖含有酮基,醛基中的羰基碳比酮基中的更亲电,更易发生亲电取代反应^[18],因此,含醛基的半乳糖、葡萄糖比含酮基的果糖发生糖基化修饰反应



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图1 己糖修饰的卵清蛋白接枝度

Figure 1 Degree of graft of ovalbumin modified by hexoses

的活性更高。Chen等^[19]发现在等湿度β-Ig糖基化系统中,葡萄糖发生糖基化反应的活性大于果糖,与试验结果一致。

2.2 表面疏水性

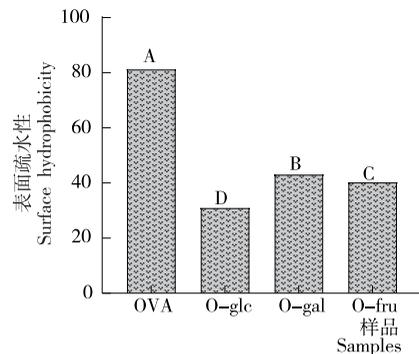
由图2可知,与OVA相比,糖基化OVA的表面疏水性明显降低,可能是OVA在糖基化过程中由于加热而解折叠,然后通过疏水相互作用聚集,使其表面疏水性降低^[20],或者是因为糖基化过程中己糖分子对赖氨酸和精氨酸的封闭作用,阻断了疏水氨基酸和ANS探针间的连接。其中,相比于O-fru和O-glc,O-gal的表面疏水性下降得最少,可能是半乳糖C4碳原子的L构型抑制了OVA的疏水相互作用,使表面疏水性下降的趋势减弱。

2.3 紫外吸收光谱

由图3可知,还原糖修饰的OVA的最大吸收峰出现在278nm附近,吸光度主要取决于色氨酸和酪氨酸残基。与OVA相比,糖基化OVA的紫外吸光度值都有不同程度的上升,由OVA的0.591上升至O-gal的0.818,可能是因为反应过程中己糖分子的接入,蛋白质分子部分展开,引起构象变化,色氨酸与酪氨酸残基在糖基化反应过程中逐渐暴露于蛋白分子表面,从而增加了糖基化产物的吸光度值,与Liu等^[21]的结果一致。3种不同还原糖修饰的反应物中,O-glc的吸光值略高于O-fru,O-gal的吸光值最高,表明在相同的反应条件下,半乳糖修饰的OVA的紫外吸收增强较多,可能是半乳糖诱导的糖基化反应更剧烈,对构象破坏较大,解折叠过程中更多芳香族氨基酸被释放,导致紫外吸收增多。

2.4 荧光光谱

由图4可知,与OVA相比,糖基化OVA的荧光强度峰值逐渐降低,从OVA的319.3降低至O-gal的249.2,可能是OVA构象被糖基化反应逐渐改变的过程中,OVA荧光发色团被暴露在极性环境中,与极性溶剂水发



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图2 己糖修饰的卵清蛋白表面疏水性

Figure 2 Surface hydrophobicity of ovalbumin modified by hexoses

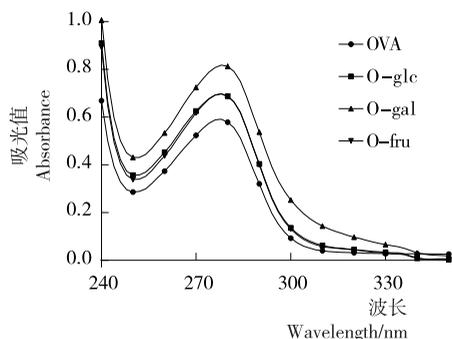


图 3 己糖修饰的卵清蛋白紫外吸收光谱

Figure 3 UV absorption spectra of ovalbumin modified by hexoses

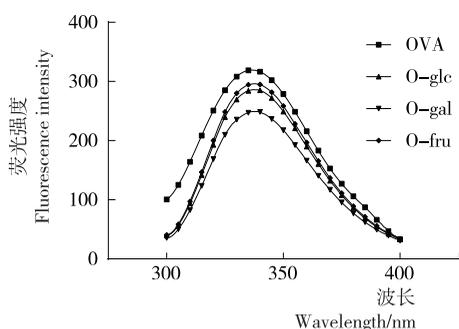


图 4 己糖修饰的卵清蛋白内源荧光光谱

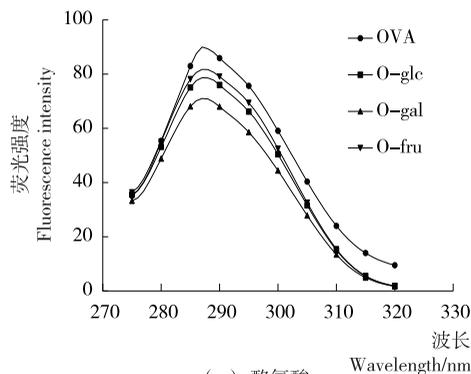
Figure 4 Intrinsic fluorescence spectra of ovalbumin modified by hexoses

生了荧光猝灭,导致荧光强度降低^[22]。O-fru 的荧光强度高于 O-glc 和 O-gal,表明果糖在糖基化过程中对 OVA 构象改变不大,可能是因为相比于醛糖,酮糖的反应趋势更缓和,对构象造成的影响较小。O-gal 的荧光强度低于 O-glc,表明半乳糖对 OVA 构象的影响强于葡萄糖,可能是半乳糖诱导的反应中释放出了更多芳香族氨基酸,与极性溶剂水接触导致荧光猝灭。

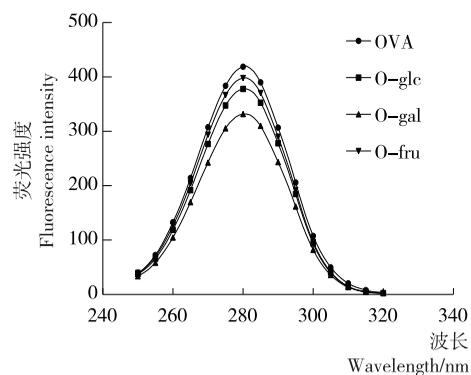
同步荧光光谱可反映出反应过程中特定氨基酸的分子微环境,是表征特异性氨基酸的重要指标,其中 $\Delta\lambda$ 为 15 nm 时同步荧光光谱表征的是酪氨酸, $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时则是色氨酸^[23-24]。由图 5 可知,与未糖基化的 OVA 相比,糖基化的 OVA 同步荧光强度显著降低,由未糖基化时的 90.03 分别下降至 O-gal 的 71.05、O-glc 的 78.74 和 O-fru 的 81.81,表明在糖基化反应改变 OVA 的构象结构时,酪氨酸所处的微环境逐渐由疏水环境变为亲水环境^[25]。其中,O-gal 的荧光强度下降程度最高,可能是半乳糖对 OVA 构象结构更剧烈的破坏所导致的。色氨酸表现出与酪氨酸相一致的趋势。

2.5 IgG/IgE 结合能力

由图 6 可知,与天然 OVA 相比,糖基化样品的 IgG/IgE 结合力均显著下降,OVA 的 IgG/IgE 结合能力从



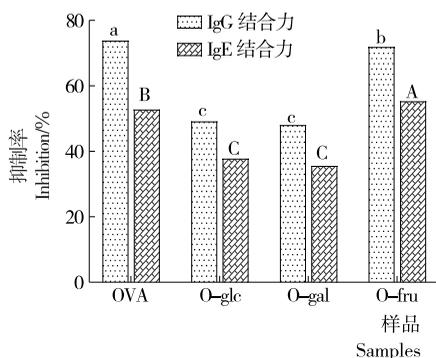
(a) 酪氨酸



(b) 色氨酸

图 5 己糖修饰的卵清蛋白同步荧光光谱

Figure 5 Synchronous fluorescence spectra of ovalbumin modified by hexoses



小写字母不同表示样品的 IgG 结合的差异显著($P < 0.05$);大写字母不同表示样品的 IgE 结合的差异显著($P < 0.05$)

图 6 己糖修饰的卵清蛋白的 IgG/IgE 结合能力

Figure 6 IgG/IgE binding ability of ovalbumin modified by different hexoses

73.8%,52.8%降低至 O-gal 的 48.1%,35.6%,而 O-fru 的 IgG/IgE 结合能力无明显变化,可能是葡萄糖和半乳糖对 OVA 的糖基化修饰程度高,糖基化过程中 OVA 分子结构展开,其构象表位遭到破坏,以及还原糖分子的共价结合阻碍了抗体对 OVA 分子的抗原表位识别^[26-28],而果糖对 OVA 的糖基化修饰程度较低,OVA 的分子结

构比较完整,其构象表位并未遭到较大破坏。3种己糖中,果糖的糖基化反应活性最低,对OVA的IgG/IgE结合能力降低效果最差;半乳糖的糖基化程度高于葡萄糖的,而半乳糖和葡萄糖修饰的OVA的IgG/IgE结合能力比较接近一致,可能是碳水化合物和蛋白质过敏位点的结合能力不同所致^[29]。

3 结论

研究了不同己糖(葡萄糖、半乳糖、果糖)修饰后的OVA在结构性和IgG/IgE结合力上的变化。结果表明,半乳糖修饰的OVA的糖基化程度最高,而果糖修饰的最低。反应过程中,OVA由于加热而解折叠,然后通过疏水相互作用聚集,使其表面疏水性降低。糖基化过程中的热处理以及分子基团的改变破坏了OVA的原有构象,芳香族氨基酸外露,紫外吸收增强,荧光强度降低。糖基化反应使OVA的致敏性降低,但果糖修饰的OVA的IgG/IgE结合力下降轻微,远低于半乳糖和葡萄糖的。3种己糖中,果糖为酮糖,半乳糖和葡萄糖均为醛糖,醛糖修饰的糖基化程度和改变蛋白质空间布局的能力高于酮糖,因此半乳糖和葡萄糖能显著降低OVA的致敏性。试验探究了构象的变化对OVA致敏性的影响,但OVA构象是如何变化,其变化又如何影响OVA致敏性还有待深入探究。后续应利用圆二色光谱仪、生物质谱、分子对接等技术,研究糖基化反应对OVA的二级结构变化、糖基化位点及OVA与糖分子的相互作用。

参考文献

- [1] HAN Y, KIM J, AHN K. Food allergy[J]. Korean Journal of Pediatrics, 2012, 55(5): 153.
- [2] HØST A. Cow's milk allergy[J]. Journal of the Royal Society of Medicine, 1997, 90(S30): 34-39.
- [3] BENEDE S, LÓPEZ-EXPÓSITO I, MOLINA E, et al. Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing[J]. Food & Function, 2015, 6(3): 694-713.
- [4] SUGINO H, NITODA T, JUNEJA L R. General chemical composition of hen eggs[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997: 12.
- [5] ENOMOTO H, ISHIMARU T, LI Can-peng, et al. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: Effect of carbohydrate chain on the phosphorylation level and heat stability[J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 526-532.
- [6] LE FLOCH-FOUÉRÉ C, PEZENNEC S, LECHEVALIER V, et al. Synergy between ovalbumin and lysozyme leads to non-additive interfacial and foaming properties of mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(2): 352-365.
- [7] PEZENNEC S, GAUTHIER F, ALONSO C, et al. The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface[J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14(5): 463-472.
- [8] 冯燕英, 牟代臣, 祁文磊, 等. 蛋白质糖基化接枝改性研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 190-195.
- [9] LI Zheng, LUO Yong-kang, FENG Li-geng. Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(3): 387-394.
- [10] GE PAN G, MELTON L D. Nonenzymatic browning of lactose and caseinate during dry heating at different relative humidities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(24): 10 036-10 042.
- [11] MALEC L S, PEREYRA GONZALES A S, NARANJO G B, et al. Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system [J]. Food Research International, 2002, 35(9): 849-853.
- [12] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.
- [13] XIANG B Y, NGADI M O, OCHOA-MARTINEZ L A, et al. Pulsed electric field-induced structural modification of whey protein isolate[J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(8): 1 341-1 348.
- [14] 李雪. 超声波对 β -乳球蛋白结构, 免疫特性和美拉德反应的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 12-13.
- [15] ADDOU-BENOUNANE S, TOMÉ D, KHEROUA O, et al. Parenteral immunization to β -lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit [J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(12): 1 559-1 563.
- [16] BALL G, SHELTON M J, WALSH B J, et al. A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding[J]. Clinical & experimental allergy, 1994, 24(8): 758-764.
- [17] YANG Wen-hua, TU Zong-cai, WANG Hui, et al. Mechanism of reduction in IgG and IgE binding of β -lactoglobulin induced by ultrasound pretreatment combined with dry-state glycation: A study using conventional spectrometry and high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(36): 8 018-8 027.
- [18] CHEETANGDEE N, FUKADA K. Emulsifying activity of bovine β -lactoglobulin conjugated with hexoses through the Maillard reaction [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 450: 148-155.
- [19] CHEN Ying-jia, LIANG Li, LIU Xiao-ming, et al. Effect of fructose and glucose on glycation of β -lactoglobulin in an intermediate-moisture food model system: Analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and data-independent acquisition LC-MS (LC-MSE)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(42): 10 674-10 682.

(下转第98页)

- [2] 杜伟锋. 凉茶饮料中多种植物毒素的检测研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017: 9.
- [3] LACHENMEIER Dirk W, EMMERT J, KUBALLA T, et al. Thujone: Cause of absinthism[J]. *Forensic Science International*, 2006, 158: 1-8.
- [4] SHAO Hua, HUANG Xiao-li, WEI Xiao-yi, et al. Phytotoxic effects and a phytotoxin from the invasive plant *xanthium italicum moretti*[J]. *Molecules*, 2012, 17: 4 037-4 046.
- [5] SU Juan, ZHANG Chuan, ZHANG Wei, et al. Qualitative and quantitative determination of the major coumarins in Zushima by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1 216; 2 111-2 117.
- [6] 中华人民共和国广东出入境检验检疫局. 世界各国食品中化学污染物限量规定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 35-40.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 29602—2013 固体饮料[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 4-6.
- [8] 杜伟锋, 张瑞瑞, 周思, 等. 高效液相色谱同时测定植物饮料中 7 种植物毒素[J]. *中国酿造*, 2016, 33(8): 169-172.
- [9] 周思, 邓龙, 杜伟锋, 等. 固相萃取—气相色谱—质谱法测定植物饮料中的 9 种植物毒素[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(3): 311-316.
- [10] 曲斌. QuEChERS 在动物源性食品兽药残留检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 327-331.
- [11] 王伟, 石志红, 康健, 等. 改进的 QuEChERS 结合 LC-MS/MS 同时测定蜂蜜中 60 种兽药残留[J]. *分析试验室*, 2013, 32(4): 82-88.
- [12] 黄善松, 范忠, 黄世杰, 等. 超高效液相色谱串联质谱联用法测定香精香料中的香豆素和黄樟素[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(20): 6 805-6 806, 6 844.
- [13] DAWIDOWICZ A L, DYBOWSKI M P. Fast determination of α - and β -thujone in alcoholic beverages using solid-phase extraction and gas chromatography [J]. *Food Control*, 2015, 25: 197-201.
- [14] LOPEZ P, SISSEREN M V, MARCO S D, et al. A straightforward method to determine flavouring substances in food by GC-MS [J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 407-416.
- [15] 朱晓兰, 洪深求, 李盼盼, 等. 分散液液微萃取/气相色谱—质谱法同时测定烟用添加剂中 8 种烷基苯类香味有害物质[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(3): 351-354.
- [16] CAO Chen, WANG Jing-zhe, WANG Lu, et al. Simultaneous determination of seven principal constituents in *Asari Radix et Rhizoma* by HPLC[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2015, 24(8): 530-537.
- [17] 姚曦, 岳永德, 汤锋. 高效液相色谱法同时测定 8 种丛生竹竹叶中香豆素类成分[J]. *食品科学*, 2015, 36(20): 105-109.
- [18] 马强, 白桦, 王超, 等. 超高效液相色谱—四极杆—飞行时间质谱法快速筛查化妆品中 18 种香豆素类化合物[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(3): 248-255.
- [19] 宋宁宁, 张科明, 刘向红, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法快速测定凉茶中非法添加的 12 种化学药物[J]. *色谱*, 2015, 33(10): 1 026-1 031.

(上接第 15 页)

- [20] STATHOPOULOS C E, TSIAMI A A, DAVID SCHOFIELD J, et al. Effect of heat on rheology, surface hydrophobicity and molecular weight distribution of glutens extracted from flours with different bread-making quality[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47(2): 134-143.
- [21] LIU Guang-xian, TU Zong-cai, YANG Wen-hua, et al. Investigation into allergenicity reduction and glycation sites of glycosylated β -lactoglobulin with ultrasound pretreatment by high-resolution mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 99-107.
- [22] PALLARÈS I, VENDRELL J, AVILÉS F X, et al. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α -chymotrypsin[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342(1): 321-331.
- [23] REN Guo-yan, SUN He, GUO Jin-ying, et al. Molecular mechanism of the interaction between resveratrol and trypsin via spectroscopy and molecular docking[J]. *Food & Function*, 2019, 10(6): 3 291-3 302.
- [24] DAS S, GHOSH P, KOLEY S, et al. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 192: 211-221.
- [25] JING Jian, QU Xin, TU Zhi, et al. Spectroscopic investigations of the interaction of the anti-hypertension drug valsartan with human serum albumin[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(6): 2 191-2 196.
- [26] NAKAMURA A, SASAKI F, WATANABE K, et al. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(25): 9 529-9 534.
- [27] GRUBER P, VIETHS S, WANGORSCH A, et al. Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(12): 4 002-4 007.
- [28] 宋启东, 涂宗财, 王辉, 等. 超声协同糖基化对蛋清粉致敏性及结构的影响[J]. *食品与机械*, 2018, 34(5): 1-5, 26.
- [29] ZHANG Ming, ZHENG Jun-yan, GE Ke-shan, et al. Glycation of α -lactalbumin with different size saccharides: Effect on protein structure and antigenicity [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(2): 220-228.