

# 苯丙氨酸-肌酐模型反应体系中 甘蔗糖蜜酚酸单体对PhIP的抑制作用

于迪, 龙娟, 黄媛, 黄嘉佳, 赵立春\*, 孔繁磊\*

(广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200)

**摘要:** 该研究探讨了模型反应体系中甘蔗糖蜜含有的阿魏酸和香草酸对 2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-b]吡啶 (PhIP) 的抑制作用。实验通过糖蜜净化处理方法去除糖蜜中的胶体、灰分和重金属等物质, 得到糖蜜粗提物, 建立没食子酸标准曲线, 测定糖蜜提取物中多酚含量。通过 UPLC-MS 对糖蜜提取物进行分析, 确定糖蜜提取物中含有的酚酸种类。将酚酸单体分别加入到模型反应 (苯丙氨酸和肌酐) 体系中, 用 UPLC-MS 系统分析模型反应中 PhIP 的变化。结果发现, 糖蜜提取物中多酚含量多达 3.58 mg/g, 通过和酚酸标准品对照, 发现糖蜜提取物中含有阿魏酸和香草酸。在模型反应体系中, 随着阿魏酸和香草酸浓度的增加, 模型反应中苯丙氨酸含量和 PhIP 的生成量均先逐渐减少后趋于平稳, 当阿魏酸溶液浓度达到  $2.33 \times 10^{-7}$  g/mL 时, 对 PhIP 的抑制效果最佳, 总体抑制率为 76.67%; 当香草酸溶液浓度达到  $2.02 \times 10^{-7}$  g/mL 时, 对 PhIP 的抑制效果最佳, 总体抑制率为 77.43%。综上, 甘蔗糖蜜中含有的阿魏酸和香草酸单体在模型反应体系中均对 PhIP 有较强的抑制作用, 为后续对 PhIP 抑制物的研究提供了基础。

**关键词:** 杂环胺; 2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-b]吡啶 (PhIP); 甘蔗糖蜜; 酚酸

文章编号: 1673-9078(2021)09-86-92

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0014

## Inhibitory Effects of Phenolic Acid Monomers in Sugarcane Molasses on PhIP in a Phenylalanine-creatinine Model Reaction System

YU Di, LONG Juan, HUANG Yuan, HUANG Jia-jia, ZHAO Li-chun\*, KONG Fan-lei\*

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese medicine, Nanning 530200, China)

**Abstract:** The inhibitory effect of ferulic acid and vanillic acid in sugarcane molasses on PhIP was studied in a model reaction system. The colloid, ash and heavy metals in the molasses were removed through the molasses purification treatment method to yield a crude molasses extract. A gallic acid standard curve was established to determine the polyphenol content in molasses extract. The type of phenolic acids in the molasses extract was determined by UPLC-MS analysis. The phenolic acid standard was added to the model reaction system (phenylalanine and creatinine), and changes in PhIP in the model reaction system was analyzed by the UPLC-MS/MS system. The results showed that the polyphenol content in the molasses extract was as high as 3.58 mg/g. Compared with the phenolic acid standard, the molasses extract was found to contain ferulic acid and vanillic acid. In the model reaction system, with the increase of the concentration of vanillic acid or ferulic acid, both the phenylalanine content and the amount of PhIP produced in the model reaction first decreased gradually and then leveled off. When the concentration of ferulic acid reached  $2.33 \times 10^{-7}$  g/mL, the inhibitory effect on PhIP was the best, and the overall inhibitory rate was 76.67%.

引文格式:

于迪, 龙娟, 黄媛, 等. 苯丙氨酸-肌酐模型反应体系中甘蔗糖蜜酚酸单体对 PhIP 的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 86-92, +192

YU Di, LONG Juan, HUANG Yuan, et al. Inhibitory effects of phenolic acid monomers in sugarcane molasses on PhIP in a phenylalanine-creatinine model reaction system [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 86-92, +192

收稿日期: 2021-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060576); 广西科技计划项目 (AD18281081; 2018GXNSFAA294078); 广西教育厅中青年教师基础能力提升项目 (2018KY0272); 广西中医药大学博士科研启动项目 (2017BS030); 广西中医药大学校级课题 (2018MS004); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目 (2018002); 广西高等学校高水平创新团队及卓越学者项目 (2019-52)

作者简介: 于迪 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: yudi1982@126.com

通讯作者: 赵立春 (1980-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学成分及活性, E-mail: hyzlc@126.com; 共同通讯作者: 孔繁磊 (1981-), 女, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: babykong1981@126.com

When the concentration of vanillic acid reached  $2.02 \times 10^{-7}$  g/mL, the inhibitory effect on PhIP was the greatest, and the overall inhibitory rate reached 77.43%. In summary, the ferulic acid and vanillic acid monomers contained in sugarcane molasses had strong inhibitory effects on PhIP in the model reaction system, which provides a basis for subsequent research on the inhibitors of PhIP.

**Key words:** heterocyclic amine, PhIP, sugar cane molasses, phenolic acid

杂环胺 (Heterocyclic aromatic amines, HAAs), 是在 200 °C 以上及长时间烹调加工肉类食物过程中产生的有机胺化合物。研究<sup>[1]</sup>表明, 大多数的杂环胺都具有致癌和致突变作用, PhIP (2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-b]吡啶) 是已知的致癌、致突变性的杂环胺类化合物中非常重要的一种, 属吡啶类杂环胺。由于 PhIP 的致癌效果, 国际癌症研究中心将 PhIP 作为导致人类致癌因素列入国家毒理学计划中, 属于 2B 级类致癌物<sup>[2]</sup>。

杂环胺的形成主要通过自由基途径和美拉德反应两种方式, 而杂环胺的控制手段有多种多样, 如控制加工温度和时间、改变加工方式、控制前体物质的含量、添加保水性物质及添加外源活性成分 (如黄酮类物质、酚酸类物质) 等。目前通过添加外源活性成分来抑制杂环胺成为国内外研究的热点。如 Ruan 等<sup>[3]</sup> 研究中表明添加维生素 E 可有效抑制杂环胺, 其原理是当肉制品发生美拉德反应时, 维生素 E 作为自由基清除剂在高温烹调过程中抑制杂环胺的形成; 鄢嫣等<sup>[4]</sup> 研究中表明当大豆分离蛋白达到 10.0% 的添加量时, 对杂环胺的形成有抑制作用, 抑制率达到 85.7%; 曾茂茂等<sup>[5]</sup> 研究表明添加香辛料 (如百里香、香薄荷等提取物) 可以抑制肉制品中 PhIP 的形成, 但即使是同一种香辛料提取物, 由于作用机制不同, 其抑制效果也不同; Wang 等<sup>[6]</sup> 研究发现添加酚酸类物质 BHA 可以有效抑制杂环胺, 因为酚酸类物质中含有较高的抗氧化剂成分可以作为自由基清除剂来抑制美拉德反应中产生的杂环胺, 但其研究机理还尚未明确。目前, 已有研究表明<sup>[7]</sup>, 苯丙氨酸和肌酸酐 (肌酐) 是 PhIP 形成的重要前体物质。

甘蔗糖蜜又称为糖浆, 是将甘蔗汁液经过加热、沉淀、过滤和浓缩等步骤所得到的粘稠液体, 蔗糖是其重要成分, 还富含有机物、矿物质和酚酸。我国是制糖大国, 广西又是制糖大省, 拥有大量的甘蔗产地, 若能合理的利用甘蔗糖蜜, 可提高其附加值。甘蔗中含有黄酮类物质和多酚类物质, 如今对甘蔗生物活性的研究较多, 如邱荣其等<sup>[8]</sup> 研究表明, 甘蔗制糖过程中的多种原料及制糖终产物废蜜都具有较高的抗氧化性, 赵振刚等<sup>[9]</sup> 发现甘蔗废料中含有多酚类物质, 有较强的自由基清除能力; 于迪等<sup>[10]</sup> 研究发现糖蜜粗体物中保留有大量的抗氧化活性物质, 可抑制杂环胺的

生成。因此, 本研究通过糖蜜净化处理方法得到糖蜜粗提物, 确定糖蜜提取物中含有阿魏酸和香草酸, 同时研究两种酚酸在模型反应体系中对 PhIP 的抑制作用, 为甘蔗糖蜜的综合利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甘蔗糖蜜, 广西崇左糖厂; 无水乙醇 (分析纯), 成都市科隆化学品有限公司; 甲醇 (色谱级), 上海吉至生化科技有限公司; 没食子酸标品 (分析级), 上海源叶生物科技有限公司; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、丙烯酰胺, 广西南宁辰泽实验科技有限公司; D101 大孔树脂、丙氨酸 (分析级)、肌酐 (分析级), 上海麦克林生化科技有限公司; PhIP 标准品 (分析级), Toronto Research Chemicals (加拿大); 福林酚, 北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

752N 型紫外可见分光光度计、台式离心机, 上海仪电分析仪器有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海煜南仪器有限公司; 冷冻干燥机, 北京金洋万达科技有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣仪器生化仪器有限公司; Waters 超高压液相色谱-三重四级杆串联质谱仪 (UPLC-TQD), 美国 Waters 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 甘蔗糖蜜净化处理

称取甘蔗糖蜜 100 g, 用超纯水将糖蜜溶液稀释到 600 g, 用浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 将 pH 值调至 2, 水浴 100 °C 条件下, 加热 90 min, 在酸解后得到的糖蜜溶液中加入 250 mg/L 的磷酸作为澄清剂, 用 Ca(OH)<sub>2</sub> 溶液将 pH 值调至 7, 再加入 5 mg/L 的聚丙烯酰胺, 在 85 °C 水槽中水浴 10 min 进行二次絮凝, 将得到的糖蜜胶体溶液用纱布进行过滤, 滤液在常温下 4000 r/min 离心 10 min, 得到上清液, 再将上清液进行二次离心, 在常温下 2000 r/min 离心 5 min, 保存上清液; 将糖蜜上清液进行 5 倍稀释, 再将溶液通过 D101 大孔树脂柱, 将上述得到的溶液通过旋蒸和真空冷冻干燥, 最终得到甘蔗糖蜜提取物干燥粉末。

#### 1.3.2 糖蜜提取物中多酚的提取及测定

称取 0.0024 g 没食子酸标准品溶于 25 mL 水, 得到没食子酸标准溶液。分别吸取标准溶液 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.30 mL、0.40 mL、0.50 mL、0.60 mL 置于 6 个 10 mL 的棕色容量瓶中, 各加入 0.50 mL 福林酚溶液, 避光静置 5 min 后再分别加入 20% 碳酸钠溶液 1.50 mL, 用蒸馏水定容到刻度, 摇匀后避光静置 30 min。将溶液置于 790 nm 处测定其吸光度, 以没食子酸含量为横坐标, 吸光度为纵坐标得到标准曲线。实验所得的没食子酸标准曲线如图 1 所示, 吸光度值  $y$  与没食子酸含量  $x$  (mg) 间的回归关系为  $y=111.32x+0.0555$ ,  $R^2=0.9974$ 。

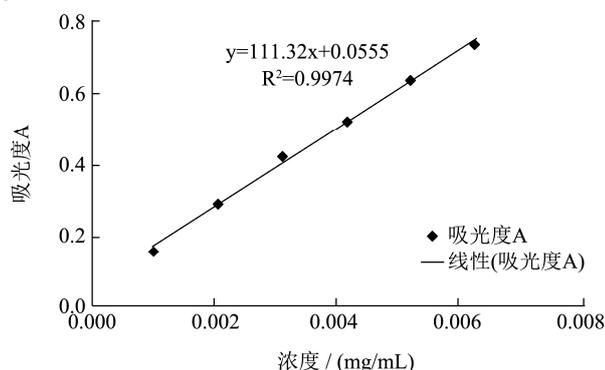


图 1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Gallic acid standard curve

称取 0.0568 g 糖蜜提取物粉末样品置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用 10% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即可得到糖蜜提取物溶液。吸取 3.00 mL 上述溶液于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入 0.50 mL 福林酚溶液, 避光静置 5 min, 再加入 20% 碳酸钠溶液 1.50 mL, 加入水定容, 避光静置 30 min, 将溶液放在 790 nm 处测定其吸光度, 并带入标准曲线方程中计算甘蔗糖蜜中多酚含量。

### 1.3.3 甘蔗糖蜜提取物样品溶液的制作

称取 0.0120 g 糖蜜提取物加入 10% 甲醇 2 mL, 使其充分溶解, 再用水定容至 10 mL 混匀, 得到浓度为 1.2 mg/mL 的甘蔗糖蜜提取物样品溶液。

### 1.3.4 阿魏酸标准品溶液的制备

称取 0.0058 g 阿魏酸标准品溶于 3 mL 甲醇, 再加入水定容到 10 mL, 超声 3 min 混匀, 得到浓度为 0.58 mg/mL 的阿魏酸标准品原溶液。

### 1.3.5 香草酸标准品溶液的制备

与 1.3.4 方法同, 得到浓度为 0.50 mg/mL 的香草酸标准品原溶液。

### 1.3.6 模型反应体系建立

分别称取苯丙氨酸和肌酐标准品 0.6 mmol 于 25 mL 聚四氟乙烯反应管中, 加入 10 mL 水, 混匀密封后加入实验室定制的反应釜中, 在 200 °C 的烘箱内进

行反应 3.5 h 后, 取出降至室温, 再用 0.22  $\mu$ L 微孔滤膜进行过滤备用。

### 1.3.7 阿魏酸单体对杂环胺 PhIP 的影响

将前体物质苯丙氨酸和肌酐各 0.6 mmol 加入到 25 mL 聚四氟乙烯反应管中, 取  $0.58 \times 10^{-3}$  mg/mL 浓度的阿魏酸溶液 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL 分别加入到聚四氟乙烯反应管中, 加水定容至 10 mL 混匀, 在 200 °C 的烘箱内进行反应 3.5 h 后, 取出降至室温, 用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜进行过滤, 将过滤液稀释至  $10^{-6}$  浓度, 冷藏备用。

### 1.3.8 香草酸单体对杂环胺 PhIP 的影响

与 1.3.7 方法同, 取  $0.50 \times 10^{-3}$  mg/mL 浓度的香草酸溶液 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL 分别加入到模型反应体系中, 加水定容至 10 mL 混匀, 在 200 °C 的烘箱内进行反应 3.5 h 后, 取出降至室温, 用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜进行过滤, 将过滤液稀释至  $10^{-6}$  浓度, 冷藏备用。

### 1.3.9 UPLC-MS 检测 PhIP、肌酐、苯丙氨酸

流速: 0.2 mL/min; 进样体积: 5  $\mu$ L; 色谱柱: Waters CO RTECS C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7  $\mu$ m); 泵: Waters Quaternary Solvent Manager-R; 流动相条件: A 相为甲醇, B 相甲酸溶液 (甲酸:水=1:1000, V/V); 洗脱梯度: 0~2 min, A: 0~5%; 2~10 min, A: 5%~90%; 10~14 min, A: 90%~5%; 电离源: ESI 正离子模式; 毛细管温度: 550 °C; 锥孔电压: 30 V; 碎裂碰撞能: 30 eV; UPLC-MS, 目标母离子: PhIP:  $m/z=225$ ; 肌酐:  $m/z=114$ ; 苯丙氨酸:  $m/z=166$ 。

### 1.3.10 数据处理

本实验中, 所有数据均是重复 3 次实验的平均值, 结果数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差, 采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行分析并作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甘蔗糖蜜多酚含量

将甘蔗糖蜜提取物所测得的吸光度带入方程式, 即可得到甘蔗糖蜜提取物中的多酚含量为 3.58 mg/g。研究表明<sup>[11,12]</sup>, 多酚类物质具有较高的药理价值, 有抗氧化、抗菌、抗癌、调节免疫的功效, 芒果皮中的多酚含量为 10.41~11.52 mg/g, 梨全果中的多酚含量为 0.27~0.40 mg/g, 柑橘总酚含量为 0.41~1.69 mg/g, 所以, 甘蔗糖蜜提取物中的多酚含量相对较高。

### 2.2 甘蔗糖蜜提取物中酚酸的鉴定

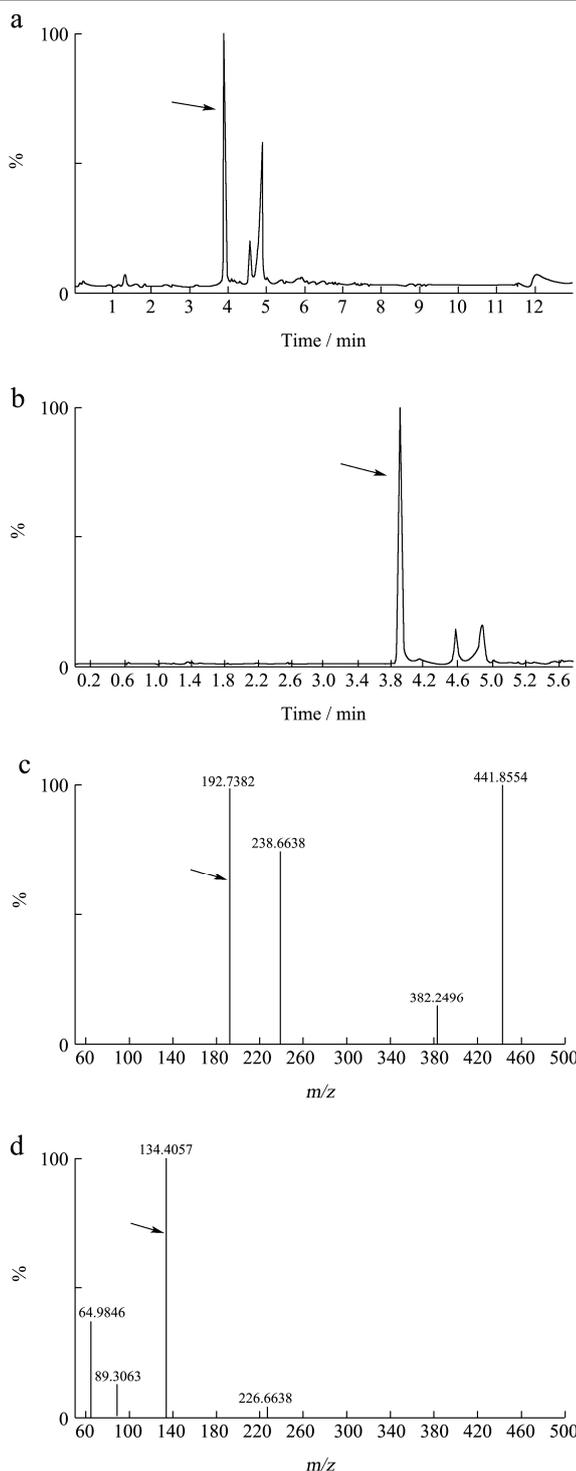


图2 糖蜜提取物中阿魏酸的SIR图(a);阿魏酸标准品SIR图(b);糖蜜提取物中阿魏酸母离子二级碎片图(c);糖蜜提取物中阿魏酸子离子二级碎片图(d)

Fig.2 SIR diagram of ferulic acid in molasses extract (a); SIR diagram of ferulic acid standard (b); The second fragment of ferulic acid precursor ion in molasses extract (c); The second fragment of ferulic acid ion in molasses extract (d)

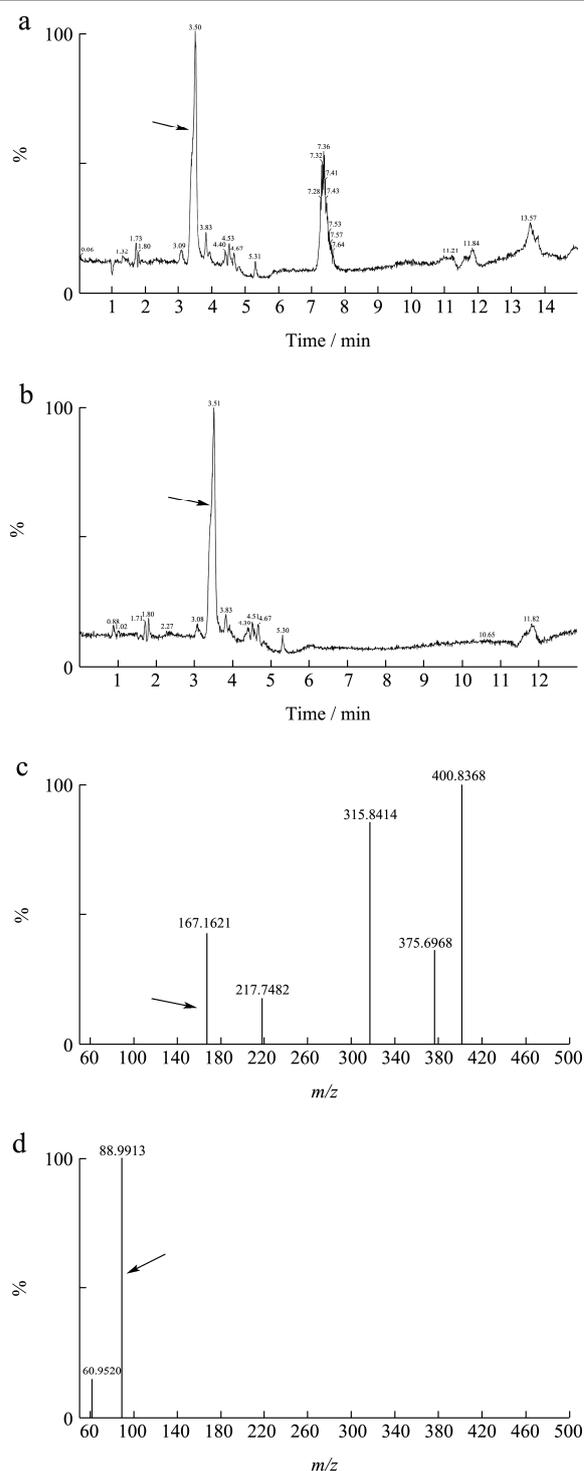


图3 糖蜜提取物中香草酸的SIR图(a);香草酸标准品SIR图(b);糖蜜提取物中香草酸母离子二级碎片图(c);糖蜜提取物中香草酸子离子二级碎片图(d)

Fig.3 SIR image of vanillic acid in molasses extract (a); SIR chart of vanillic acid standard product (b); The second fragment of vanillic acid precursor ion in molasses extract(c); The second fragment of vanillic acid ion in molasses extract(d)

在 SIR 负离子扫描模式下, 利用 UPLC-MS 对阿魏酸和香草酸标准品进行检测得出 SIR 图及二级离子碎片图。参照文献<sup>[13]</sup>, 在负离子扫描模式下, MS/MS 碎裂得出母离子:  $m/z$  193 $\rightarrow$ 134 可初步判定为阿魏酸, MS/MS 碎裂得出母离子:  $m/z$  167 $\rightarrow$ 89 可初步判定为香草酸。如图 2 所示, 在 SIR 负离子扫描模式, 对糖蜜提取物样品和阿魏酸标准品进行检测, 碎裂碰撞能为 30 eV 时, 糖蜜样品中的物质在 3.91 min 时出峰, 与阿魏酸标准品出峰时间一致, 存在质量数为 193 的母离子二级碎片峰; 锥孔电压为 30 V 时, 出现质量数为 133 的子离子二级碎片峰, 响应值为  $5.45e^7$ , 峰型较为明显, 因此可确定此峰所对应的物质为阿魏酸。

同理, 在图 3 中发现, 在 SIR 负离子扫描模式, 碎裂碰撞能为 33 eV 时进行检测, 糖蜜提取物样品中的物质在 3.50 min 时出峰, 与香草酸标准品出峰时间一致, 存在质量数为 167 的母离子二级碎片峰; 锥孔电压为 18 V 时, 出现质量数为 89 的子离子二级碎片峰, 响应值为  $2.38e^5$ , 峰型较为明显, 因此可确定此峰所对应的物质为香草酸。

### 2.3 空白模型反应中 PhIP 的鉴定

利用 1.3.10 的检测条件对 PhIP 标准品和空白模型进行检测, 由图 4 可知, 在 SIR 正离子扫描模式, 碎裂碰撞能为 30 eV 时进行检测, 空白模型中的物质在 3.56 min 时出峰, 与 PhIP 标准品出峰时间一致, 存在质量数为 225 的母离子; 锥孔电压为 33 V 时, 出现质量数为 210 的子离子, 响应值为  $4.82e^6$ , 峰型较为明显, 参照文献<sup>[14]</sup>, 在正离子扫描模式下, MS/MS 碎裂  $m/z$  225 $\rightarrow$ 210 可定性为 PhIP, 因此, 可确定此峰对应的物质是 PhIP。通过 UPLC-MS 对模型体系进行鉴定时, 在 SIR 正离子模式下测得  $m/z$  216 的峰, 出峰时间为 4.89 min, 响应值为  $1.11e^8$ , 峰型较为明显, 参照文献<sup>[15]</sup>可初步判定为中间产物苯乙醛进一步反应生成的丁间醇醛脱水缩合物, 但是否可以确定该物质为丁间醇醛还需进一步研究。

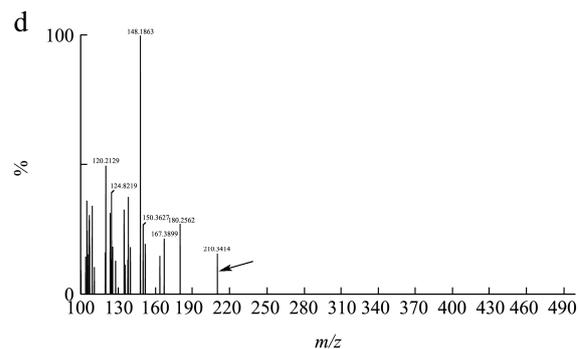
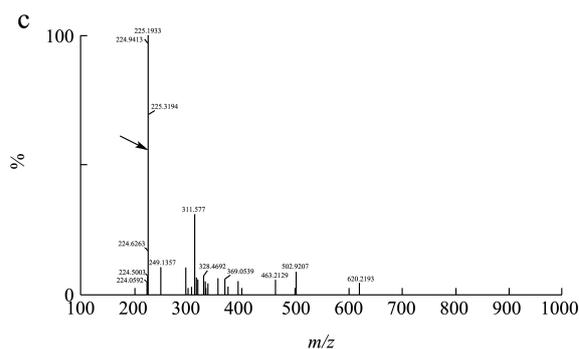
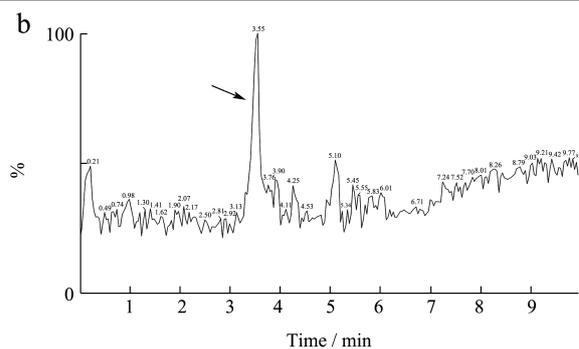
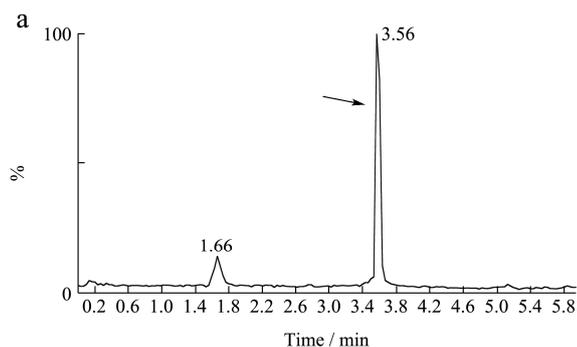


图 4 PhIP 标准品 SIR 图 (a); 空白模型中 PhIP 的 SIR 图 (b); 空白模型中 PhIP 母离子二级碎片图 (c); 空白模型中 PhIP 子离子二级碎片图 (d)

Fig.4 SIR diagram of PhIP standard (a); SIR diagram of PhIP in blank model (b); The second fragment of PhIP precursor ion in the blank model (c); The second fragment of PhIP product ion in the blank model (d)

### 2.4 模型反应中酚酸单体对 PhIP 的抑制作用

将不同浓度梯度的阿魏酸和香草酸单体加入到模型反应中, 以空白模型组作为对照, 通过 UPLC-MS 进行检测, 记录各个酚酸单体在不同浓度下得出的峰面积, 即可得出模型反应中苯丙氨酸、肌酐和 PhIP 的含量变化。

模型反应体系中肌酐、苯丙氨酸和 PhIP 随着阿魏酸标准品浓度的增加所产生的含量变化趋势如图 5 所示, 模型反应中肌酐含量的变化呈先下降后上升再

下降的趋势; 苯丙氨酸含量逐渐减小后趋于平缓; PhIP的生成量则逐渐减少后趋于平缓, 说明随着阿魏酸标准溶液浓度的增加, 模型反应中 PhIP 的生成量逐渐减少, 有明显的抑制作用。

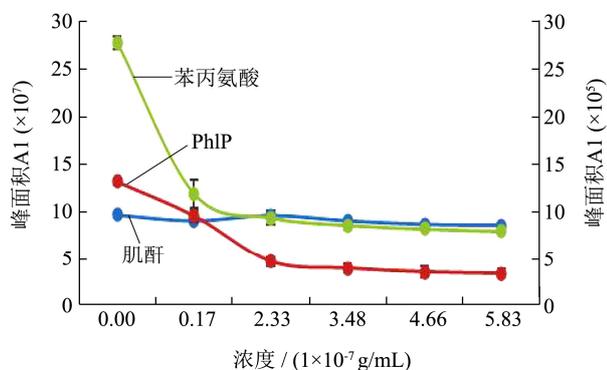


图5 加入阿魏酸的模型体系中苯丙氨酸(左)、肌酐(左)、及 PhIP(右)峰面积变化

Fig.5 Changes in the peak areas of phenylalanine (left), creatinine (left), and PhIP (right) in the model system with ferulic acid

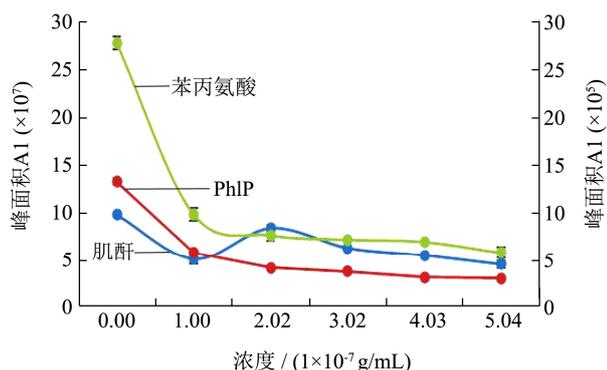


图6 加入香草酸的模型体系中苯丙氨酸(左)、肌酐(左)、及 PhIP(右)峰面积变化

Fig.6 Changes in the peak areas of phenylalanine (left), creatinine (left), and PhIP (right) in the model system with vanillic acid

模型反应中肌酐、苯丙氨酸和 PhIP 随着香草酸标准品浓度的增加所产生的含量变化趋势如图 6 所示; 模型反应中肌酐含量的变化呈先下降后上升再下降的趋势; 苯丙氨酸含量逐渐减小后趋于平缓; PhIP 的生成量则逐渐减少后趋于平缓, 说明随着香草酸标准溶液浓度的增加, 模型反应中 PhIP 的生成量逐渐减少, 有明显的抑制作用。

利用UPLC-MS对配制好的甘蔗糖蜜提取物样品溶液进行成分分析鉴定, 将得到的质谱图与酚酸标准品进行比对, 得出在糖蜜提取物中含量较高的两种多酚物质为: 阿魏酸和香草酸。阿魏酸与香草酸具有较强的抗氧化性, 对过氧化氢、羟自由基、超氧化自由基和过氧化亚硝基的清除效果明显, 使产生自由基的

酶受到抑制, 还可以使清除自由基的酶增加。

由图5可知, 模型反应中PhIP的生成量随着阿魏酸标准溶液浓度的升高而降低, 当阿魏酸溶液浓度从0到 $2.33 \times 10^{-7}$  g/mL时, PhIP的下降量最明显, 对模型反应中PhIP的生成有抑制作用, 其抑制率高达66.86%, 说明阿魏酸在此浓度范围内有较强的自由基清除能力, 而后PhIP的下降量趋于平缓, 总体抑制率为76.67%。当阿魏酸溶液的浓度从 $1.17 \times 10^{-7}$  g/mL增加到 $2.33 \times 10^{-7}$  g/mL时, 肌酐的生成量增加, 苯丙氨酸的生成量减少, PhIP的生成量出现明显的降低。而总体来说, 模型反应中肌酐含量变化与阿魏酸标准溶液浓度的变化无明显的线性关系, 苯丙氨酸呈现下降趋势。由图6可知, 模型反应中PhIP的生成量随着香草酸标准溶液浓度的升高而降低, 与在模型反应中添加阿魏酸时的变化相似, 当香草酸溶液浓度从0到 $2.02 \times 10^{-7}$  g/mL时, PhIP的下降量最明显, 对模型反应中PhIP的生成有抑制作用, 其抑制率高达69.67%, 说明香草酸在此浓度范围内有较强的自由基清除能力, 而后PhIP的下降量趋于平缓, 总体抑制率为77.43%。而模型反应中肌酐的含量变化与香草酸标准溶液浓度的变化无明显的线性关系。在相同的物质的量 ( $3 \times 10^{-5}$  mmol) 时, 香草酸单体比阿魏酸单体对杂环胺PhIP的抑制效果更佳。

苯丙氨酸和肌酐作为PhIP的重要前体物质, 研究表明<sup>[16]</sup>, 高温条件下, 苯丙氨酸与肌酐反应可生成PhIP, 苯丙氨酸首先通过美拉德反应生成Strecker醛-苯乙醛, 醛类再与肌酐通过醇醛缩合反应随后脱水形成缩合物--丁间醇醛。PhIP结构吡啶基团中氮原子主要来源于肌酐的氨基与中间体的含氧基团反应、苯丙氨酸中的氨基和游离氨等。

实验发现, 模型反应体系中苯丙氨酸和PhIP均出现随着酚酸含量增加明显减少的现象, 两种酚酸单体可能通过以下两种途径抑制PhIP的形成: ①酚酸在一定程度上通过阻断苯丙氨酸生成苯乙醛。阿魏酸和香草酸在化学结构上均含有羟基和羧基, 酚酸中的羧基可以和苯丙氨酸中的氨基脱水形成肽键, 从而消耗PhIP的前体物质苯丙氨酸, 使苯丙氨酸不能有效的转化成苯乙醛, 达到抑制PhIP的形成作用; ②酚酸通过捕获苯乙醛阻止醛类与肌酐缩合形成丁间醇醛。阿魏酸属于酚类化合物, 酚类物质具有清除自由基、淬灭活性炭和螯合金属的能力, 所以阿魏酸与香草酸是通过清除自由基, 能很好的清除 $O_2^-$ 及 $\cdot OH$ 来抑制PhIP的形成, 从而阻断了苯乙醛与肌酐进一步反应生成PhIP, 使得PhIP的生成量减少。结合本实验结果, 从理论上推测酚酸单体可能会通过以上两种途径抑制PhIP的形

成,但其具体的抑制机理还有待进一步研究。

### 3 结论

实验通过糖蜜净化处理方法去除糖蜜中的胶体、灰分和重金属等物质,得到糖蜜粗提物,建立没食子酸标准曲线,测定糖蜜提取物中多酚含量,发现多酚含量多达 3.58 mg/g。甘蔗糖蜜提取物中富含多种多酚类化合物,其中,存在的酚酸物质有阿魏酸和香草酸,均具有较强的自由基清除能力,对模型反应体系中 PhIP 的生成有明显的抑制作用。当阿魏酸溶液浓度达到  $2.33 \times 10^{-7}$  g/mL 时,对 PhIP 的抑制效果最佳,总体抑制率为 76.67%;当香草酸溶液浓度达到  $2.02 \times 10^{-7}$  g/mL 时,对 PhIP 的抑制效果最佳,总体抑制率为 77.43%。甘蔗糖蜜作为一种能量原料,多用作改善口感的调节剂,甘蔗糖蜜提取物成分较多且复杂,其含有的多酚类化合物种类较多,若将甘蔗糖蜜作为食品添加剂加入到食品中,可有效降低由于长时间高温烹调产生 PhIP,为后续对 PhIP 抑制物的研究提供了基础,但其具体抑制机理还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Turesky R J, Vouros P. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts *in vitro* and *in vivo* [J]. J Chromatogr B, 2004, 802(1): 155-166
- [2] Zuckerman A J. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans [J]. J Clin Pathol, 1995, 48(7): 691
- [3] Ruan E D, Juárez M, Thacker R, et al. Dietary vitamin E effects on the formation of heterocyclic amines in grilled lean beef [J]. Meat Sci, 2014, 96(2): 849-853
- [4] 鄢嫣,曾茂茂,陈洁,等.不同添加量的大豆分离蛋白和淀粉对烤猪肉中杂环胺形成的影响[J].食品工业科技,2016,37(22):324-328,339  
YAN Yan, ZENG Mao-mao, CHEN Jie, et al. Effects of soy protein isolation and starch with different addition levels on the formation of heterocyclic aromatic amines in roasted pork [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 324-328, 339
- [5] 曾茂茂,王俊辉,陈静,等.香辛料的抗氧化活性及对肉制品中杂环胺的影响[J].食品与生物技术学报,2018,37(1):1-6  
ZENG Mao-mao, WANG Jun-hui, CHEN Jing, et al. Antioxidant capacity and effect of spices on heterocyclic amines formation in meat products [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(1): 1-6
- [6] Wang Y Y, Vuolo L L, Spingarn N E, et al. Formation of mutagens in cooked foods. V. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef [J]. Cancer Lett, 1982, 16: 179-189
- [7] Jinap S, Mohd-mokhtar M S, Farhadian A, et al. Effects of varying degrees of doneness on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and beef satay [J]. Meat Science, 2013, 2: 202-220
- [8] 邱荣其,赵振刚,丰永红,等.甘蔗抗氧化物质的提取与分离[J].中国甜菜糖业,2007,3:1-4  
QIU Rong-qi, ZHAO Zhen-gang, FENG Yong-hong, et al. Extraction and separation of antioxidants from sugarcane [J]. China Beet & Sugar, 2007, 3: 1-4
- [9] 赵振刚.甘蔗多酚成分及其多酚氧化酶特性研究[D].广州:华南理工大学,2010  
ZHAO Zhen-gang. Study on polyphenol components and polyphenol oxidase characteristics of sugarcane [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [10] Yu D, Chen M S, Yu S J. Effect of sugarcane molasses extract on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) in a model system [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 924-929
- [11] 杨郑州,陆雪梅,谢晓娜.芒果多酚含量及抗氧化能力的测定[J].安徽农学通报,2017,23(11):148-149,176  
YANG Zheng-zhou, LU Xue-mei, XIE Xiao-na. Determination of polyphenol content and antioxidant capability of mango [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2017, 23(11): 148-149, 176
- [12] 赵谋明,董红竹,林恋竹.八种水果多酚的定量分析与抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2017,33(10):225-236  
ZHAO Mou-ming, DONG Hong-zhu, LIN Lian-zhu. Comparative study on the phenolic profiles of eight fruits and their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 225-236
- [13] Wang M, Jiang N, Wang Y, et al. Characterization of phenolic compounds from early and late ripening sweet cherries and their antioxidant and antifungal activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(26): 5413-5420
- [14] Zamora Rosario, Alcón Esmeralda, Hidalgo Francisco J. Ammonia and formaldehyde participate in the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in addition to creati(ni)neand phenylacetaldehyde [J]. Food Chemistry, 2014, 155(1): 74-80

(下转第192页)