

杨梅提取物抑制二羰基化合物活性研究

仲宇晴, 肖留榜, 卢永翎, 吕丽爽*

(南京师范大学食品与制药工程学院, 南京 210023)

摘要: **目的** 分离纯化杨梅果实提取物并考察不同组分对模型及曲奇饼干中甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)、乙二醛(glyoxal, GO)的抑制效果。**方法** 乙醇浸提制备杨梅果实粗提取物(crude extract, CE), 采用 AB-8 大孔吸附树脂, 以不同体积分数的乙醇(20%、40%、60%)洗脱, 得到 3 种杨梅提取物; 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法、pH 示差法、液相色谱-串联质谱法测定提取物中花色苷、总黄酮含量和主要成分, 并用气相色谱法考察其对模型和曲奇饼干中 MGO/GO 的抑制活性。**结果** 40%乙醇组分 F_1 得率最高, 活性最好, 主要成分为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷(cyanidin-3-*O*-glucoside, C-3-Glu)和杨梅素-3-*O*-鼠李糖苷(myricetin-3-*O*-rhamnoside, M-3-Rha); 60%乙醇洗脱组分 F_2 的主要成分为槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷(quercetin-3-*O*-rhamnoside, Q-3-Rha); 当曲奇饼干中提取物添加量为 0.4%时, F_1 、 F_2 对 MGO 和 GO 均有抑制活性, 其中 F_1 效果最佳, 分别为 61.5%和 40.4%。**结论** 杨梅果实提取物具有良好清除 MGO/GO 的能力, 为其作为添加剂应用于抑制食品加工中的 MGO 和 GO 提供了一定的理论基础。

关键词: 杨梅果实提取物; 甲基乙二醛; 乙二醛; 气相色谱法; 曲奇饼干

Study on the inhibitory activities of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. fruit on reactive carbonyl compounds

ZHONG Yu-Qing, XIAO Liu-Bang, LU Yong-Ling, LV Li-Shuang*

(School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and purify the extract of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. fruit and investigate the inhibitory activities of different elution components on methylglyoxal (MGO), glyoxal (GO) in model and cookies, respectively. **Methods** The crude extract (CE) of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. fruit was prepared by ethanol extraction, further separated and purified using AB-8 microporous adsorption resin and different concentrations of ethanol (20%, 40%, 60%), obtaining 3 kinds of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. extraction components. The content of anthocyanins and total flavonoids and the main chemical constituents in each eluted fraction were determined by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetric method, pH differential method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, respectively. Gas chromatography was used to investigate the inhibitory activity against MGO/GO of each eluted fraction in model and cookies. **Results** The 40% ethanol eluting component (F_1) had the highest yield and activity, its main ingredients were cyanidin-3-*O*-glucoside (C-3-Glu) and myricetin-3-*O*-rhamnoside (M-3-Rha);

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272433)、江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(22KJB550010)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32272433), and the General Project of Basic Science (Natural Science) in Colleges and Universities of Jiangsu Province (22KJB550010)

*通信作者: 吕丽爽, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品化学。E-mail: lishuanglv@126.com

*Corresponding author: LV Li-Shuang, Professor, Nanjing Normal University, No.2, Xuelin Road, Qixia District, Nanjing 210023, China. E-mail: lishuanglv@126.com

quercetin-3-*O*-rhamnoside (Q-3-Rha) was the main component of 60% ethanol eluting component (F₂). F₁ and F₂ both had inhibitory activities on MGO and GO when the additive amount of the extract in the cookie was 0.4%. Among them, F₁ had the best effects, which were 61.5% and 40.4%, respectively. **Conclusion** The extracts of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. fruit have good ability to eliminate MGO and GO, which provide a theoretical basis for its application as an additive to inhibit MGO and GO in food processing.

KEY WORDS: extract of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. fruit; methylglyoxal; glyoxal; gas chromatography; cookies

0 引 言

近年来, 活性羰基化合物(reactive carbonyl species, RCS), 如甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)、乙二醛(glyoxal, GO), 作为高活性的蛋白糖基化剂, 其反应活性比葡萄糖高 200~50000 倍^[1]。这类 RCS 可以在体内或食品中通过迈克尔加成或美拉德的席夫碱反应与 DNA^[2]、RNA^[3]、蛋白质^[4]、磷脂等物质的亲核位点发生共价结合, 生成一系列晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)。体内 AGEs 的积聚会引发糖尿病^[5]、心脑血管疾病^[6]、神经系统疾病^[7]、阿尔茨海默症^[8-9]、癌症^[10]等, 甚至作为内分泌干扰物威胁人类后代^[11]。

大量文献报道, 活性羰基化合物 MGO、GO 存在于多种加工类食品中, 如油炸、烤制、烘焙食品, 以及微生物发酵食品^[12]。研究表明, 高温加热会导致食品中更高浓度 RCS 的积累; 同时, RCS 的形成还受到食品所用原料成分的影响, 其中, 蛋白质和脂肪含量与 MGO、GO 形成量呈正相关, 但碳水化合物的影响又远大于前两者^[13]。由于烘焙食品高油、高糖、高蛋白质, 在高温烘烤过程中极易发生美拉德反应、焦糖化反应和脂质过氧化反应^[14]从而加剧了 MGO、GO 的形成。如高油高糖的曲奇饼干中 GO 含量为 4.8~26 mg/kg, MGO 含量为 3.7~81.4 mg/kg^[15], 高于其他烘焙食品 10 倍。据报道, 日常饮食中 MGO 每日预估平均摄入量为 5~20 mg/d^[13], 而从曲奇饼干中摄入的 MGO、GO 分别为 213 和 216 μg/(人·d)^[15]。

目前国内外研究发现通过添加天然抑制剂, 可以有效减少食品中或体内 MGO 和 GO 的含量。如卷心菜、花椰菜和大白菜提取物^[16], 其对 MGO 的抑制率分别为 46.1%、55.6%和 47.8%。ZHANG 等^[17]从紫甘蓝和小麦麸皮中提取的不溶性膳食纤维, 可以清除 35.8%~50.0%的 MGO 和 23.2%~40.0%的 GO。此外, 还有橄榄叶提取物^[18]对 MGO、GO 也有一定的抑制活性。总体来说, 这些提取物即使在模型体系中对 MGO、GO 的抑制率均不超过 60%, 因此, 寻求高效、安全, 便于食品中添加的食源性 RCS 抑制剂是当前的研究的热点。

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)属杨梅科杨梅属, 含有丰富的蛋白质、花色素、黄酮类物质、酚酸类物质、维生素和矿质元素等, 营养价值高^[19], 已有大量研究证明其

提取物具有多种生物活性, 如抗氧化、保护胰岛 B 细胞^[20]、抑制食品致病菌活性^[21]及抗炎活性^[22]。目前有研究已报道杨梅中含有的主要成分, 如矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷(cyanidin-3-*O*-glucoside, C-3-Glu)^[23-24]、杨梅素^[25]以及槲皮素^[26], 可以有效清除体内的 MGO、GO。由于前期实验中使用的都是相应物质的标准品, 而这些物质尚未被批准应用于食品添加剂, 无法作为 RCS 抑制剂添加至食品中。此外, 当前杨梅提取物—杨梅红已批准作为食品添加剂(GB 31622—2014《食品安全国家标准 食品添加剂 杨梅红》)。如何将杨梅提取物作为 MGO/GO 抑制剂应用于实际食品体系鲜有报道。

本研究以杨梅果实为原料, 分离制备杨梅果实粗提取物(crude extract, CE)并对其作进一步的分离纯化, 得到不同纯度组分, 分别采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法、pH 示差法及液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)对各组分进行花色苷与总黄酮含量及组分成分分析, 并应用于曲奇饼干加工过程中, 考察其对 MGO 和 GO 的抑制效果, 以期为杨梅的深加工和提高附加值提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杨梅果实: 浙江仙居; 复合膨松剂、鸡蛋: 当地超市购买。

AB-8 大孔吸附树脂(天津浩聚树脂科技有限公司); HSGF254 硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司); 未添加抗氧化剂的菜籽油(南京邦基粮油有限公司); 蔗糖(南京甘汁园糖业有限公司); 低筋面粉(益海嘉里食品营销有限公司); 丙酮醛、乙二醛(40%水溶液)、邻苯二胺(纯度>98%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 杨梅素(纯度 98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯)、芦丁、杨梅素-3-*O*-鼠李糖苷(myricetin-3-*O*-rhamnoside, M-3-Rha)、槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷(quercetin-3-*O*-rhamnoside, Q-3-Rha)、乙醇、甲酸(分析纯)(上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

1260 高效液相色谱仪、7820 气相色谱仪、1290/6460 三重串联四极杆液质联用仪、HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm,

0.25 μm)(美国 Agilent 公司); UV-6100A 紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); UV-3000 型紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); WHY-2 水浴恒温振荡器(常州国宇仪器制造有限公司); SHZ-III 循环水式多用真空泵(南京科仪仪器设备有限公司); RV8-HB10 旋转蒸发器(德国 IKA 公司); YXP 101-2 商用电烤炉、BUD 302 搅拌机(上海早苗食品有限公司); kromasil100-5 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)(瑞典 Kromasil 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 杨梅果实黄酮粗提物的制备

粗提物: 杨梅果实去核并捣碎。70%乙醇水溶液与杨梅果肉以 10: 1 ($V:m$) 比例混合后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌 3 h 后抽滤, 重复两次, 合并滤液, 将其于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发浓缩得到杨梅 CE。

果实提取物: CE 经 AB-8 大孔树脂过柱(Φ 4 $\times$ 40 cm) 分离纯化, 先用水洗脱 2 倍柱体积(bed volume , BV), 再以 1 BV/h 的洗脱速率依次用 20%、40%、60% 不同体积分数的乙醇水溶液洗脱, 收集各组分流洗脱液。通过薄层色谱法跟踪检测, 展开体系为正丁醇: 水: 冰乙酸=4: 5: 1 ($V:V:V$), 合并比移值(R_f value, R_f) 相同的洗脱组分, 真空浓缩并冷冻干燥。得到 F_0 (20%洗脱组分)、 F_1 (40%洗脱组分)、 F_2 (60%洗脱组分)。

1.3.2 杨梅果实提取物中总花色苷、总黄酮含量测定

采用 pH 示差法^[27-28]测定总花色苷含量。运用公式(1) 计算杨梅果实提取物中总花色苷含量。

$$\text{花色苷总量} = A \times \text{MW} \times B \times \frac{V}{\xi} \times m \quad (1)$$

其中, $A = [(A_{520} - A_{700})\text{pH}1.0 - (A_{520} - A_{700})\text{pH}4.5]$; MW 为 C-3-Glu 的分子量; B 为稀释倍数; V 为样品体积, mL; ξ 为 C-3-Glu 的摩尔消光系数, $\xi = 29600$; m 为样品质量, g。

采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法^[29]测定总黄酮含量。

1.3.3 LC-MS/MS 分析杨梅果实提取物中的成分

用甲醇配制 3 mg/mL 的杨梅果实提取物溶液, 进行成分分析。

液相色谱条件: 色谱柱: kromasil100-5 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 254、280、360、520 nm; 进样量: 10 μL ; 流动相: A 为纯水(0.1%甲酸), B 为乙腈(0.1%甲酸); 洗脱程序: 0~5 min 保持 10% B, 5~28 min 线性提升至 70% B, 在 1 min 内降至 10% B, 并保持 3 min; 流速: 0.6 mL/min。

质谱条件: 扫描范围 m/z 50~1000; 毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾电压 3500 kV; 裂解电压: 200 V; 辅助气压 5 psi; 雾化气压 45 psi。分别采用正离子($[\text{M}+\text{H}]^+$)和负离子($[\text{M}-\text{H}]^-$)两种模式进行分析。

1.3.4 气相色谱法分析杨梅果实提取物对 MGO/GO 的抑制活性

(1)MGO 和 GO 的衍生化

参考 LI 等^[30]文献方法。

(2)气相色谱条件

色谱柱: HP-5 (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm); 分流比: 1:1 ($V:V$); 压力: 10 psi; 进样温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 氢火焰离子化检测器温度: 280 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温: 0~1 min: 40 $^{\circ}\text{C}$, 以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 140 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 总运行时间 30.2 min。 N_2 流速: 25 mL/min; H_2 流速: 30 mL/min; 空气流速: 300 mL/min。

(3)杨梅果实提取物抑制模型中 MGO/GO 活性

用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS) (pH 7.4, 0.1 mol/L) 配制浓度为 0.33 mmol/L 的 MGO/GO 溶液和质量浓度为 0.318 mg/mL 杨梅提取物样品溶液, 各取 1 mL 上述溶液加入到 5 mL 离心管中, 空白组用 PBS 溶液代替杨梅提取物溶液。涡旋混匀后, 于恒温水浴振荡器中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别反应 0、30、60、120、240、480 min, 反应结束后取 2 mL 反应液以 1.3.4(1) 的方法进行衍生化, 计算各个组分对 MGO/GO 的抑制率。每个样品均做 3 组平行。

1.3.5 杨梅果实提取物对曲奇饼干加工中产生的 MGO/GO 抑制效果

(1)曲奇饼干的制作

参考美国谷物化学师协会制定的方法^[31]稍作修改制作曲奇饼干: 称取 20 g 蔗糖与 25 g 黄油, 用搅拌机中速搅拌直至混合物呈现绒毛状, 分别在蛋液中加入 0.40% 的杨梅全果粉、 F_1 、 F_2 , 分别取 10 g 蛋液加入混合物中, 搅拌均匀后, 将 40 g 低筋粉和 0.6 g 小苏打过筛混合, 用搅拌机低速拌匀。用模具将面团制作成厚度为 0.2 cm、直径为 5 cm 的胚后置于烤箱中, 上火 180 $^{\circ}\text{C}$, 下火 170 $^{\circ}\text{C}$, 烘烤 15 min。

(2)杨梅果实提取物对曲奇饼干中 MGO/GO 的抑制活性

参考文献[32]方法将曲奇饼干进行预处理。按照 1.3.4(1) 进行衍生化, 计算各个组分对 MGO/GO 的抑制率。每个样品均做 3 组平行。

1.4 数据处理与分析

所有实验均重复 3 次, 采用 Origin 2021、SPSS 25.0 软件分析实验数据, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。采用单因素方差分析模式分析, 显著性差异采用 Duncan 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 杨梅果实提取物中花色苷和总黄酮的含量

乙醇提取杨梅果实得到粗提物 CE, 得率为 12.74%, 其中含花色苷 0.84%, 含总黄酮 1.67%。鉴于有效成分含量过低, 为进一步富集杨梅的活性组分, 采用大孔吸附树脂进行纯化。通过多种大孔吸附树脂的静态、柱层析选型, 最终确定采用大孔吸附树脂 AB-8 进行纯化, 得到不同乙醇浓度的洗脱组分。由表 1 可得, 40%乙醇洗脱物(F_1)的固形物得率、花色苷含量和总黄酮含量均最高。经

纯化后的 F₁ 中花色苷和黄酮的含量与粗提物 CE 相比, 分别提高了 16.74 和 35.33 倍。所得提取物组分中, 总黄酮含量均高于花色苷含量, 表明黄酮类化合物是杨梅提取物的主要成分。

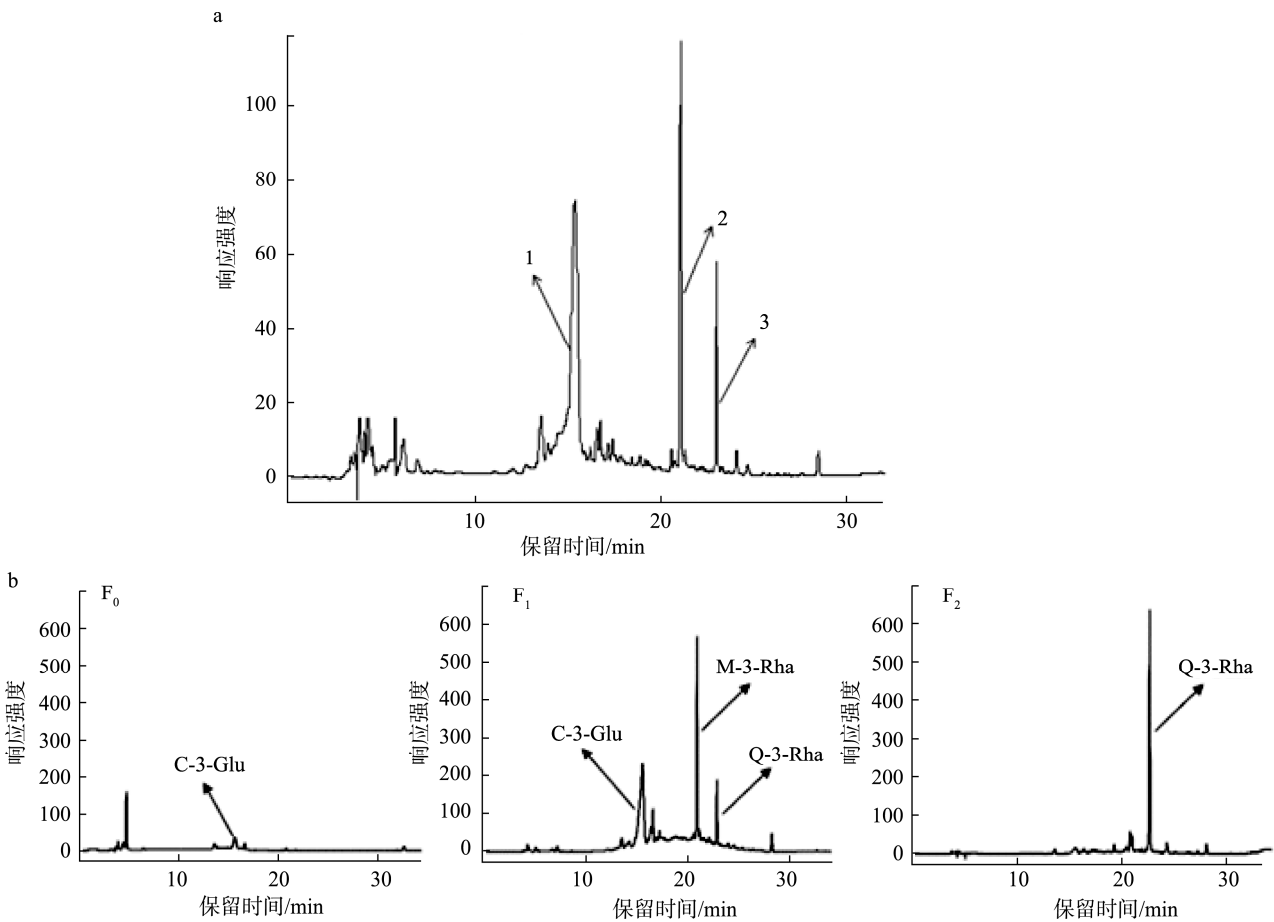
表 1 杨梅粗提物及不同浓度乙醇洗脱物中花色苷及总黄酮的含量测定结果

Table 1 Determination results of anthocyanins and total flavonoids in crude extracts of <i>Myrica rubra</i> Sieb.et Zucc. and different concentrations of ethanol eluates			
组分	得率/%	花色苷含量/%	总黄酮含量/%
CE	12.74±0.43	0.84±0.33	1.67±0.26
F ₀	7.20±1.12	0.24±0.03	0.63±0.21
F ₁	58.23±1.94	14.90±2.82	60.67±0.91
F ₂	34.57±0.17	5.75±1.02	42.95±1.63

2.2 LC-MS/MS 分析杨梅果实提取物中的成分

采用 LC-MS/MS 对粗提物 CE 及大孔吸附树脂纯化后

的组分 F₀、F₁、F₂ 进行分析。如图 1a 所示, 杨梅果实粗提物 CE 主要有 3 种化合物组成。化合物 1 液相色谱峰保留时间(retention time, RT)为 15.3 min, 其准分子离子峰是 449.1 [M+H]⁺, 表明其分子量为 449, LC-MS² 主要碎片离子峰是该化合物裂解葡萄糖基后产生的苷元, 为矢车菊素(图 2A)。根据杨梅果实中所富含的主要花青素的报道^[33], 初步推测化合物 1 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C-3-Glu)。化合物 2 的 RT=21.2 min, 其准分子离子峰是 463.1 [M-H]⁻, 表明其分子量为 464, 主要碎片离子峰是该化合物裂解鼠李糖糖基后产生的苷元杨梅素(图 2B); 化合物 3 (RT=22.7 min)在负离子模式中准分子离子峰是 447.1 [M-H]⁻, 表明其分子量为 448, 主要碎片离子峰 301.0 [M-146-H]⁻是该化合物裂解糖基后产生的苷元槲皮素(图 2C), 根据 YAN 等^[34]报道, 推断化合物 2 与 3 分别为杨梅素-3-O-鼠李糖苷(M-3-Rha)、槲皮素-3-O-鼠李糖苷(Q-3-Rha)。此 3 种物质的 RT、一级质谱分子量和二级质谱碎片离子(表 2)与对应标准品相一致。确定 3 种物质分别为 C-3-Glu、M-3-Rha、Q-3-Rha, 结构如图 3 所示。



注: a. CE; b. F₀、F₁、F₂。

图 1 杨梅果实提取物在 254 nm 下的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatograms of extract of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. at 254 nm

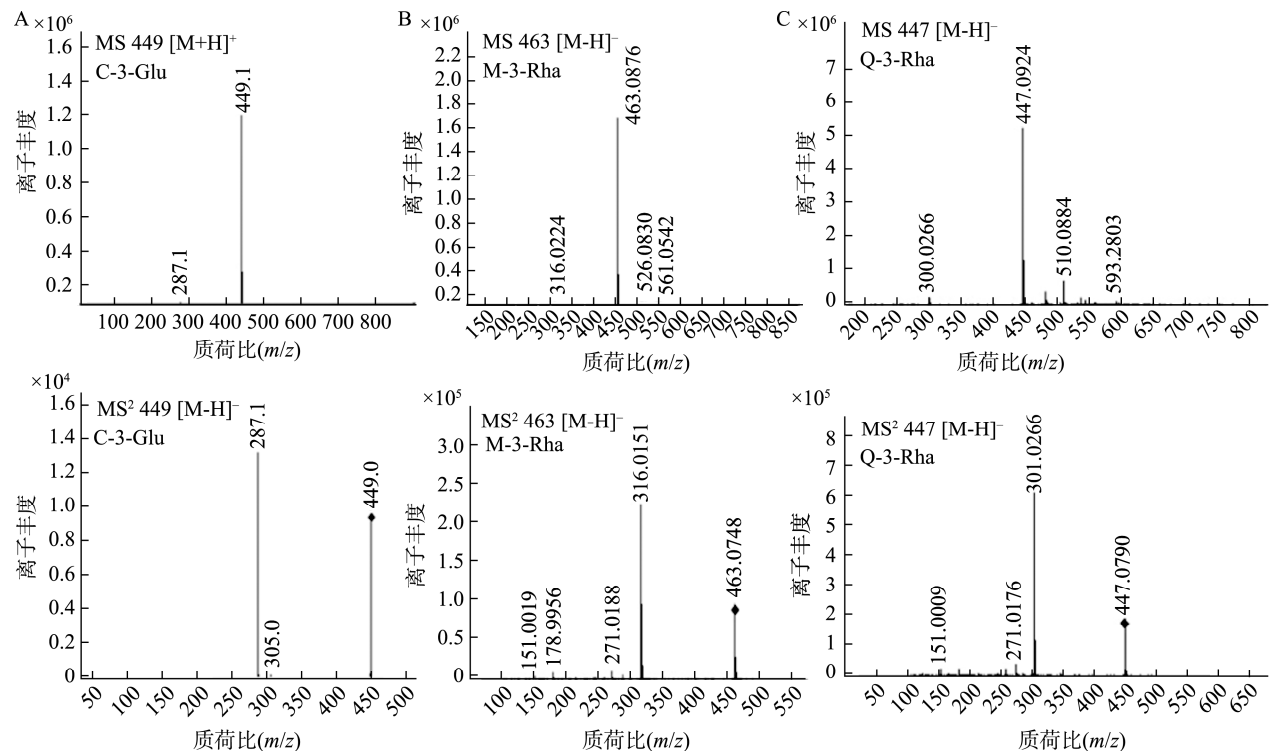


图 2 杨梅提取物 LC-MS/MS 分析
Fig.2 Analysis of extract of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. by LC-MS/MS

表 2 杨梅提取物中主要化合物的质谱信息

Table 2 MS informations of main compounds in *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. fruit extract

化合物	模式	准分子离子峰 (<i>m/z</i>)	分子量	碎片离子峰 (<i>m/z</i>)
1	ESI+	449.1 [M+H] ⁺	449	287.1 [M-162] ⁺
2	ESI-	463.1 [M-H] ⁻	464	361.0 [M-146-2H] ⁻
3	ESI-	447.1 [M-H] ⁻	448	301.0 [M-146-H] ⁻

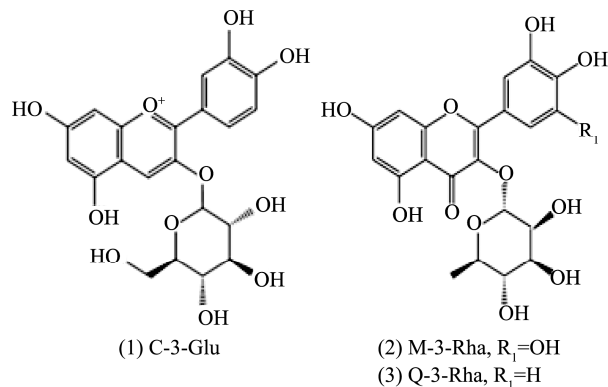


图 3 C-3-Glu、M-3-Rha、Q-3-Rha 化学结构式
Fig.3 Chemical structural formulas of C-3-Glu, M-3-Rha and Q-3-Rha

在图 1b 中, F₀、F₁、F₂ 是杨梅果实粗提物通过 AB-8 大孔树脂分离纯化后得到的不同浓度乙醇洗脱组分。可以看出 F₀ 中含有少量的 C-3-Glu; F₁ 中主要含有 C-3-Glu 和

M-3-Rha 两种化合物, 同时也含有少量的 Q-3-Rha; F₂ 中的成分比较单一, 主要成分是 Q-3-Rha。这为下一步探究杨梅提取物各组分对 MGO/GO 清除活性之间的差异奠定了理论基础。

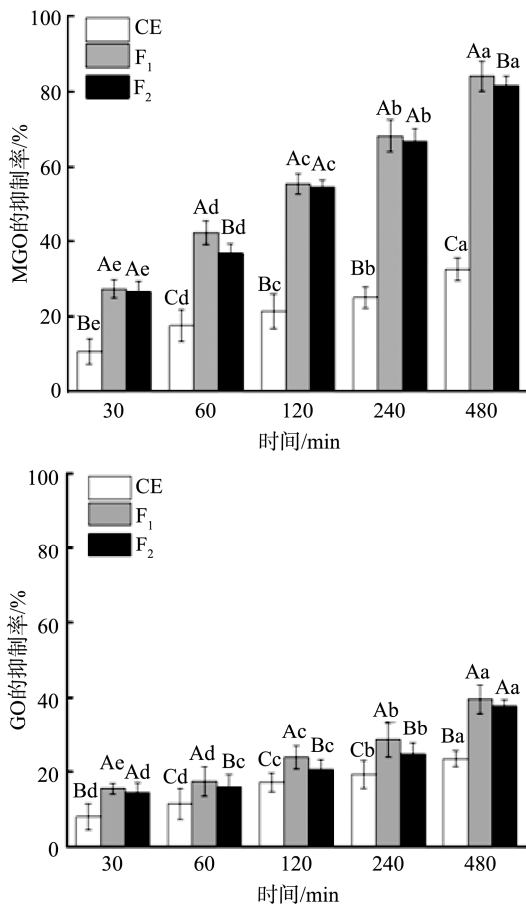
2.3 杨梅果实提取物(CE、F₁、F₂)抑制模型中 MGO/GO 活性

在初步分析 CE、F₁、F₂ 组分后, 分别对 3 种组分抑制 MGO/GO 活性进行了分析比较。由图 4 可知, CE、F₁、F₂ 3 种组分均能有效抑制 MGO/GO, 且呈现时-效关系。这 3 种组分对 MGO 的抑制活性高于 GO, 当反应 120 min 时, F₁、F₂ 对 MGO 的抑制率即可达到 50% 以上; 当反应 480 min 时, F₁、F₂ 对 MGO 的抑制率分别为 84.13%、81.71%, 对 GO 的抑制率分别为 39.46%、37.59%。原因推测为 GO 在水溶液中以水合单体、二聚体和三聚体的形式存在, 因此其抑制活性小于 MGO^[32]。这也与文献研究结果一致^[35-36]。此外, 与粗提物 CE 相比, 纯化后的组分 F₁、F₂ 对 MGO/GO 的抑制活性均显著提高(*P*<0.05), 其原因可能为 F₁ 组分中含有 C-3-Glu、M-3-Rha 和 Q-3-Rha 3 种物质, 且总黄酮和花色苷的含量均远高于粗提物(表 1)。F₂ 主要成分只有 Q-3-Rha, 但抑制活性在多个时间点与 F₁ 之间没有显著性差异(*P*>0.05)。虽然得率低于 F₁, 但其良好的活性值得推广应用。

前期研究表明, 黄酮醇类化合物, 如矢车菊素^[37]、杨梅素^[38]、槲皮素^[39]可清除体内 RCS, 其机制为 RCS 在

黄酮 A 环的 C-6 和 C-8 位发生加成反应。杨梅果实提取物中的主要成分均为糖苷形式而不是苷元, 由于是 C-3 糖苷, C-6 和 C-8 的活性位点依然存在。且本研究结果得到杨梅中存在的 3 种糖苷依然具有良好的抑制活性, 高达 80% 以上, 远远高于已报道的天然提取物对 MGO 的抑制活性^[16-18], 如十字花科植物提取物、谷物提取物以及橄榄叶提取物等。

鉴于当前对黄酮糖苷抑制 MGO/GO 活性应用于实际食品体系中的研究相对较少; 且报道多为单一成分的活性, 本研究发现杨梅果实提取物中同时含有多种黄酮组分, 其实际体系的应用值得进一步探讨。



注: 采用 Duncan's 多重比较法进行显著性检验, 不同大写字母代表不同提取组分之间的差异性显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母代表同一提取组分不同反应时长之间的差异性显著 ($P < 0.05$)。

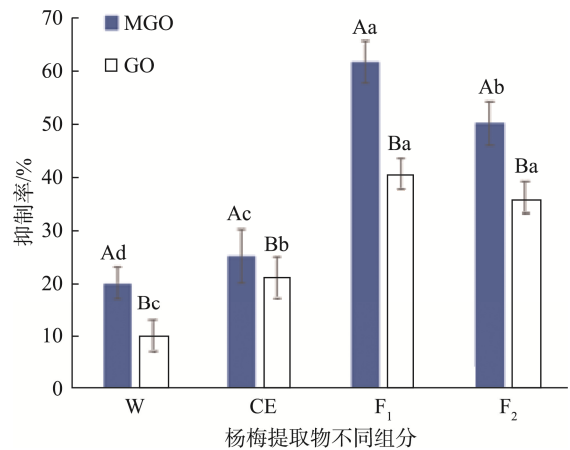
图 4 杨梅提取物(CE、F₁、F₂)对 MGO/GO 的抑制率($n=3$)
Fig.4 MGO/GO inhibition rates of extract of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. (CE, F₁, F₂) ($n=3$)

2.4 杨梅果实提取物对曲奇饼干中形成 MGO/GO 的抑制

在曲奇饼干制作过程中, 原料含有黄油或奶油脂肪 (>30%)、糖类(约 60%)和蛋白质(约 6%), 在高温烘焙过程中, 容易发生脂质氧化反应^[40]、碳水化合物裂解^[41]和美拉

德反应, 使得 MGO/GO 的含量大幅上升。本研究证明了杨梅果肉提取物在模型体系中对 MGO/GO 的良好抑制活性后, 进一步将提取物应用于曲奇饼干烘焙中, 考察其实际应用价值。

如图 5 所示, 杨梅全果粉(W)、CE、F₁、F₂均可以有效地抑制曲奇饼干中 MGO/GO 的形成, 抑制活性依次为 F₁>F₂>CE>W, 其中 F₁ 抑制效果分别达到了 61.5% (MGO)和 40.4% (GO); 此外, 各组分对 MGO 的抑制活性均显著大于 GO ($P < 0.05$)。推测原因为烘焙体系中产生的 MGO 的含量高于 GO^[15]。



注: 采用 Duncan's 多重比较法进行显著性检验, 不同大写字母代表同一添加组分不同活性羰基化合物种类间的显著性差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母代表不同添加组分之间的差异性显著 ($P < 0.05$)。

图 5 不同杨梅提取物组分对曲奇饼干中 MGO/GO 的抑制率
Fig.5 Inhibition rates of different extract of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc. on MGO/GO in cookies

3 结 论

本研究选用杨梅果实为原料制备得到杨梅 CE, 进而采用 AB-8 大孔吸附树脂, 分别得到 3 种组分, 其中 F₁ 组分中花色苷与总黄酮含量分别达到 14.90%和 60.67%, 质谱分析得到其主成分为 C-3-Glu 和 M-3-Rha; F₂ 组分中花色苷与总黄酮含量分别为 5.75%和 42.95%, 其主成分为 Q-3-Rha。模型实验表明, 杨梅提取物对 MGO/GO 的抑制活性为 F₁>F₂>CE, 最高可分别达到 84.13%和 39.46%。将 0.40%杨梅提取物添加于曲奇饼干中, F₁、F₂ 均表现出对 MGO/GO 良好的抑制活性, 其中 F₁ 效果最佳, 分别为 61.5%和 40.4%。以上结果表明, 杨梅提取物有潜力成为食品加工过程中 MGO/GO 的天然清除剂。

参考文献

- [1] LEE JH, SAMSUZZAMAN M, PARK MG, et al. Methylglyoxal-derived hemoglobin advanced glycation end products induce apoptosis and

- oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 409–421.
- [2] SHUCK SC, WUENSCHHELL GE, TERMINI JS. Product studies and mechanistic analysis of the reaction of methylglyoxal with deoxyguanosine [J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31(2): 105–115.
- [3] CIMINERA AK, SHUCK SC, TERMINI J. Elevated glucose increases genomic instability by inhibiting nucleotide excision repair [J]. *Life Sci Alliance*, 2021, 4(10): e202101159.
- [4] MCEWEN JM, FRASER S, GUIR ALS, *et al.* Synergistic sequence contributions bias glycation outcomes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3316.
- [5] SCHALKWIJK CG, STEHOUWER CDA. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases [J]. *Physiol Rev*, 2019, 100(1): 407–461.
- [6] DASH PK, ALOMAR FA, COX JL, *et al.* A link between methylglyoxal and heart failure during hiv-1 infection [J]. *Front Card Med*, 2021, 8: 792180.
- [7] AKHTER F, CHEN D, AKHTER A, *et al.* Age-dependent accumulation of dicarbonyls and advanced glycation endproducts (ages) associates with mitochondrial stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 164: 429–438.
- [8] MOREIRA AP, VIZUETE AFK, ZIN LEF, *et al.* The methylglyoxal/rage/nox-2 pathway is persistently activated in the hippocampus of rats with stz-induced sporadic Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(2): 395–409.
- [9] WEI CC, LI SW, WU CT, *et al.* Dietary methylglyoxal exposure induces Alzheimer's disease by promoting amyloid beta accumulation and disrupting autophagy in *caenorhabditis elegans* [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(32): 10011–10021.
- [10] LAI SWT, LOPEZ GEJ, ZOUKARI T, *et al.* Methylglyoxal and its adducts: Induction, repair, and association with disease [J]. *Chem Res Toxicol*, 2022, 2: 2e00160.
- [11] RAVICHANDRAN G, LAKSHMANAN DK, RAJU K, *et al.* Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: An emerging threat to contemporary and future generation [J]. *Environ Int*, 2019, 123: 486–500.
- [12] ZHU Y, SNOOKS H, SANG S. Complexity of advanced glycation end products in foods: Where are we now? [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1325–1329.
- [13] MAASEN K, SCHEIJEN J, OPPERHUIZEN A, *et al.* Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls [J]. *Food Chem*, 2021, 339: 128063.
- [14] HELLWIG M, GENSBERGER-REIGL S, HENLE T, *et al.* Food-derived 1,2-dicarbonyl compounds and their role in diseases [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 49: 1–8.
- [15] ARRIBAS-LORENZO G, MORALES FJ. Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(5): 2966–2972.
- [16] THILAVECH T, MARNPAE M, MAKYNEN K, *et al.* Phytochemical composition, antiglycation, antioxidant activity and methylglyoxal-trapping action of brassica vegetables [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2021, 76(3): 340–346.
- [17] ZHANG H, TROISE AD, QI Y, *et al.* Insoluble dietary fibre scavenges reactive carbonyl species under simulated physiological conditions: The key role of fibre-bound polyphenols [J]. *Food Chem*, 2021, 349: 129018.
- [18] NAVARRO M, MORALES FJ. Evaluation of an olive leaf extract as a natural source of antiglycative compounds [J]. *Food Res Int*, 2017, 92: 56–63.
- [19] 徐畅. 设施栽培对杨梅果实采后品质和贮运性的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- XU C. Effect of facility cultivation on postharvest storage and transportation quality of Chinese bayberry (*Morella rubra* sieb. Et zucc.) fruit [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [20] 占刘欢. 杨梅果实降血糖活性物质稳定性及制备工艺放大研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- ZHAN LH. Stability and scale-up of separation on anti-diabetic compounds from Chinese bayberry [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [21] YAO WR, WANG HY, WANG ST, *et al.* Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(10): 5312–5317.
- [22] GUO H, ZHONG R, LIU Y, *et al.* Effects of bayberry juice on inflammatory and apoptotic markers in young adults with features of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrition*, 2014, 30(2): 198–203.
- [23] SONG X, LU Y, SI B, *et al.* Inhibitory effect on acrolein by cyanidin-3-O-glucoside and its acrolein adducts from the pigment of myrica red [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(40): 11937–11946.
- [24] SONG X, LU Y, LU Y, *et al.* Adduct formation of acrolein with cyanidin-3-O-glucoside and its degradants/metabolites during thermal processing or *in vivo* after consumption of red bayberry [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(44): 13143–13154.
- [25] ZHANG S, XIAO L, LV L, *et al.* Trapping methylglyoxal by myricetin and its metabolites in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(35): 9408–9414.
- [26] 刘贵梅. 槲皮素抑制美拉德反应中丙酮醛机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
- LIU GM. Mechanism of quercetin inhibiting methylglyoxal in Maillard reaction [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017.
- [27] HUANG Z, WANG B, WILLIAMS P, *et al.* Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2008, 42(4): 819–824.

- [28] SUN Y, LIAO X, WANG Z, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Europ Food Res Technol*, 2007, 225(3–4): 511–523.
- [29] JINSONG B, YIZHONG C, MEI S, *et al.* Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6): 2327–2332.
- [30] LI X, ZHENG T, SANG S, *et al.* Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(50): 12152–12158.
- [31] KWEON M, SLADE L, LEVINE H, *et al.* Cookie-versus cracker-baking—what's the difference? Flour functionality requirements explored by src and alveography [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(1): 115–138.
- [32] 司波, 曹玉发, 陆洋, 等. 无糖低热量魔芋饼干的配方优化[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 180–187.
- SI B, CAO YF, LU Y, *et al.* Formula optimization of sugar-free and low-calorie konjac biscuits [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(7): 180–187.
- [33] SUN CD, ZHANG B, ZHANG JK, *et al.* Cyanidin-3-glucoside-rich extract from chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Med Food*, 2012, 15(3): 288–298.
- [34] YAN S, ZHANG X, WEN X, *et al.* Purification of flavonoids from Chinese bayberry (*Morella rubra* sieb. Et zucc.) fruit extracts and α -glucosidase inhibitory activities of different fractionations [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1148.
- [35] SANG S, SHAO X, BAI N, *et al.* Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: A new trapping agent of reactive dicarbonyl species [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(12): 1862–1870.
- [36] SHAO X, BAI N, HE K, *et al.* Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: New trapping agents of reactive dicarbonyl species [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 2042–2050.
- [37] SUANTAWEE T, CHENG H, ADISAKWATTANA S. Protective effect of cyanidin against glucose- and methylglyoxal-induced protein glycation and oxidative DNA damage [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(Pt A): 814–821.
- [38] ZHANG D, JIANG X, XIAO L, *et al.* Mechanistic studies of inhibition on acrolein by myricetin [J]. *Food Chem*, 2020, 323: 126788.
- [39] LIU G, XIA Q, LU Y, *et al.* Influence of quercetin and its methylglyoxal adducts on the formation of α -dicarbonyl compounds in lysine and glucose model system [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(10): 2233–2239.
- [40] CRACOWSKI JL, DURAND T, BESSARD GJTIPS. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: Physiology, pharmacology and clinical implications [J]. *Trend Pharmacol Sci*, 2002, 23(8): 360–366.
- [41] LEDL F, SCHLEICHER RNHEJACIE. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 29(6): 565–594.

(责任编辑: 于梦娇 黄周梅)

作者简介



仲宇晴, 硕士研究生, 主要研究方向为功能性食品及食品化学。
E-mail: 212702007@njnu.edu.cn



吕丽爽, 教授, 主要研究方向为功能性食品及食品化学。
E-mail: lishuanglv@126.com