

# 香辛料中多酚复配对丙烯醛协同抑制的研究

冯小兰<sup>1</sup>, 陆洋<sup>2</sup>, 梁雨<sup>2</sup>, 吕丽爽<sup>2</sup>, 卢永翎<sup>2\*</sup>

(1. 江苏旅游职业学院烹饪科技学院, 扬州 225007; 2. 南京师范大学食品与制药工程学院, 南京 210023)

**摘要: 目的** 研究香辛料中多酚化合物复配抑制丙烯醛(acrolein, ACR)的协同作用。**方法** 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array detection, HPLC-DAD)测定了模拟食品加工条件下小豆蔻明(cardamonin, CAR)、山姜素(alpinetin, ALP)、乔松素(pinocembrin, PIN)、槲皮素、姜黄素、山奈酚、高良姜素和芦丁对 ACR 的抑制活性, 并根据 Chou-Talalay 法则进行复配联用, 使用 CompuSyn 软件筛选出协同抑制 ACR 的组合。鉴于 CAR、ALP、PIN 共存于香辛料草豆蔻中, 将草豆蔻应用于抑制煮肉中形成的 ACR。**结果** 在模型中, 联用 CAR+ALP、CAR+PIN、CAR+姜黄素、CAR+芦丁、CAR+山奈酚, 均可以协同抑制 ACR。在煮肉过程中, 当添加 6%草豆蔻, 抑制 ACR 效率可达到 50.3%, 显著优于单用效果; 超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检出除草豆蔻中的 CAR、ALP 和 PIN 外, 还有这 3 种物质与 ACR 形成的加合物 CAR-ACR-1、ALP-ACR、PIN-ACR-1。**结论** CAR 分别与 ALP、PIN、姜黄素、芦丁、山奈酚联用对有害物 ACR 可发挥协同抑制作用, 其协同抑制效用以草豆蔻为载体在煮肉过程中得以验证, 抑制作用机制为捕获 ACR 形成加合物。本研究可为耐高温食源性 ACR 抑制剂的开发提供新思路 and 理论基础。

**关键词:** 丙烯醛; 多酚; 协同作用; 草豆蔻

## Study on synergistic inhibition of acrolein by multiple polyphenols in spices

FENG Xiao-Lan<sup>1</sup>, LU Yang<sup>2</sup>, LIANG Yu<sup>2</sup>, LV Li-Shuang<sup>2</sup>, LU Yong-Ling<sup>2\*</sup>

(1. College of Cooking Science and Technology, Jiangsu College of Tourism, Yangzhou 225007, China; 2. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the synergistic effects of polyphenol compounds in spices on inhibiting acrolein (ACR) activity. **Methods** High performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) was used to investigate the inhibitory effects of polyphenols [cardamonin (CAR), alpinetin (ALP), pinocembrin (PIN), quercetin, curcumin, kaempferol, galangin and rutin] on acrolein under simulated food processing conditions. Considering the moderate activity of cardamonin, binary combinations were performed with other polyphenols in turn to investigate the synergistic effect of polyphenols on acrolein and quantify their synergy according to the Chou-Talalay rule. Moreover, *Alpinia katsumadai* Hayata was applied to the boiled pork process in view of the coexistence of CAR, ALP and PIN in it. **Results** CAR combined with ALP, PIN, curcumin, rutin and kaempferol had synergistic inhibitory effects on ACR. When *Alpinia katsumadai* Hayata was applied to the boiled pork process (6% addition), the inhibition

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

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

\***通信作者:** 卢永翎, 高级实验师, 主要研究方向为功能性食品及食品化学。E-mail: lyldh@126.com

\***Corresponding author:** LU Yong-Ling, Senior Engineer, Nanjing Normal University, No.2, Xuelin Road, Qixia District, Nanjing 210023, China. E-mail: lyldh@126.com

rate could reach 50.3%, which was significantly better than using any polyphenol compound alone. In addition to CAR, ALP and PIN, the adducts CAR-ACR-1, ALP-ACR and PIN-ACR-1 formed by these 3 substances and ACR were detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Conclusion** CAR combined with ALP, PIN, curcumin, rutin and kaempferol respectively can play a synergistic inhibitory effects on harmful acrolein. Its synergistic inhibitory effect is verified in the boiled pork with *Alpinia katsumadai* Hayata as the carrier, and the mechanism is to capture ACR to form adducts. This study can provide a new idea and theoretical basis for the development of food derived acrolein inhibitors which are resistant high-temperature.

**KEY WORDS:** acrolein; polyphenols; synergistic effects; *Alpinia katsumadai* Hayata

## 0 引言

丙烯醛(acrolein, ACR)是一种最简单的  $\alpha,\beta$ -不饱和醛,同时具有两个反应位点(C=C 双键和 C=O 羰基),在生物体内均具有高反应活性和毒性,在人体内蓄积后可与大分子如蛋白质、DNA、核酸、磷脂等亲核位点发生共价结合,导致糖尿病并发症、心脑血管疾病、阿尔茨海默症、癌症等慢性病症<sup>[1-3]</sup>。饮食摄入是外源性 ACR 的主要来源之一,碳水化合物和氨基酸的热降解<sup>[4]</sup>、甘油脱水热处理、脂质过氧化<sup>[5]</sup>和微生物代谢及发酵<sup>[6]</sup>等过程均能产生 ACR,给食品安全带来潜在的风险。肉制品含有丰富的氨基酸和蛋白质,且加工过程中通常采用高温、高油、加糖熟制等工艺,极易产生 ACR,如烤香肠、烤牛排、烤猪排<sup>[7]</sup>,炸鱼、烟熏三文鱼<sup>[8]</sup>,腌猪肉<sup>[9]</sup>等肉类食品中 ACR 的含量在 50~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。ACR 与 DNA、氨基酸和蛋白质的加合物已作为监测相关病变<sup>[10]</sup>和加工食品污染物<sup>[11]</sup>的生物标志物。

大量文献报道表明,天然多酚类物质能有效捕获 ACR,如槲皮素<sup>[12]</sup>、橙皮素<sup>[13]</sup>、白藜芦醇<sup>[13]</sup>、表没食子儿茶素没食子酸酯<sup>[14]</sup>、根皮素<sup>[14]</sup>、染料木素<sup>[15]</sup>、姜黄素<sup>[16]</sup>、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷<sup>[17]</sup>等,且槲皮素与姜黄素复配能够协同抑制烤鸡翅中的 ACR,将抑制率提升到 72%,远高于单一多酚抑制活性<sup>[16]</sup>,不过这些多酚不能直接应用于食品中,且高温加工条件下多酚稳定性较差,同时多酚物质的色泽和风味对产品品质也会造成一定的干扰。香辛料具有较好的风味并常用于食品热加工,其中多酚类化合物含量丰富,如草豆蔻(*Alpinia katsumadai* Hayata)中含有小豆蔻明(cardamonin, CAR)、山姜素(alpinetin, ALP)和乔松素(pinocembrin, PIN)<sup>[18]</sup>,小茴香<sup>[19]</sup>、山奈<sup>[20]</sup>、丁香<sup>[21]</sup>、高良姜<sup>[22]</sup>中含有山奈酚,已有研究表明这些多酚均具有抑制 ACR 的作用<sup>[23-24]</sup>,因此可以从香辛料中寻求耐高温食源性 ACR 抑制剂,并进一步研究通过不同多酚的复配提升热加工中的协同增效作用。通常化合物组合协同或拮抗计算方法有:金正均 Q 值法、参数法、等效线图解法、Chou-Talalay 法则等<sup>[25-26]</sup>,其中 Chou-Talalay 法则又称中位药效法,为 CHOU 和 TALALAY 教授于 1984 年共同建立的药物联用的定量方法,2005 年 MARTIN 团队进一步开发

出药物联合作用量-效分析软件 CompuSyn,从定性定量的角度反映药物相互作用后引起药效学参数(如抑制效果等)发生的连续变化,并给出联合指数(combination index, CI),其不仅能定量描述联合用药的协同作用、相加作用和拮抗作用,也能够对给定的量-效水平下的效应进行定性描述,该方法广泛应用在化合物联用效果的评估,其评判效果显著优于其他方法<sup>[27]</sup>。

因此,本研究拟通过模拟食品加工条件,从药食两用香辛料中筛选出 ACR 抑制剂,进而对高活性多酚类化合物进行复配联用,采用 Chou-Talalay 法则筛选出协同增效的最佳复配组合;在此基础上,选用草豆蔻(富含 CAR、ALP 和 PIN 3 种物质),作为香辛料应用于煮肉过程中,探究草豆蔻对高温煮制过程中产生的 ACR 的抑制效果和作用机制,以期对开发肉类热加工食源性 ACR 抑制剂奠定理论基础,对提高加工食品的安全性具有现实意义和应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

草豆蔻(*Alpinia katsumadai* Hayata, 桂味王餐饮有限公司)。

CAR、PIN(纯度 98%,西安天丰生物科技有限公司);ALP(纯度 98%,成都埃法生物科技有限公司);槲皮素、姜黄素(纯度 98%,上海麦克林生化试剂有限公司);山奈酚、高良姜素(纯度 98%,南京广润生物试剂有限公司);芦丁[纯度 98%,阿拉丁试剂(上海)有限公司];乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、二氯甲烷、盐酸(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司);2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH, 纯度 97%,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

### 1.2 仪器与设备

1290/6460 Triple Quad 液相色谱-质谱联用仪、1260 高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司];N-EVAP 氮气吹干仪(美国 Organomation 公司);Nanopure 超纯水机(美国 Thermo Fisher Scientific 科技公司);ZQTY-70 台式震荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);HYQ-3110 涡旋混匀器(美

国 Crystal 公司); PWC 254 分析天平(精度 0.1 mg, 英国 ADAM 公司); kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(瑞典 AkzoNobel 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 8 种多酚在模拟加工条件下对 ACR 抑制率的测定

精密量取浓度为 0.5 mmol/L 的 ACR 溶液 0.5 mL(由 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制), 分别加入 0.125~4.000 mmol/L 浓度的不同种类多酚化合物 DMSO 溶液 0.5 mL, 涡旋混匀, 置于 100°C 恒温水浴振荡器中反应 2 h, 结束后取 0.5 mL 反应液参照本实验室方法<sup>[28]</sup>, 以 DNPH 为衍生试剂, 使用高效液相色谱-二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array detection, HPLC-DAD)测定 DNPH-ACR 的峰面积  $A_i$ , 用 DMSO 代替多酚溶液作为对照测定峰面积  $A_j$ , 按公式(1)计算不同种类和浓度的多酚化合物对 ACR 的抑制率。根据不同浓度的 8 种多酚对 ACR 的清除作用, 用 SPSS Statistics 25.0 软件计算出反应 2 h 时上述 8 种多酚对 ACR 的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_i - A_j}{A_i} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.3.2 8 种多酚二元联用对 ACR 的抑制作用分析

##### (1) 化合物联用方法原理

两物质采用恒定比率添加剂量, 以近似两物质的 IC<sub>50</sub> 比值为比率, 以接近 IC<sub>50</sub> 值为中点, 用 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 倍的中点剂量联合。两物质联合抑制作用可通过 Fa-CI(组合指数)曲线评估, CI 按式(2)计算, 当 CI=1 时, 两物质为相加作用; 当 CI<1 时, 两物质为协同作用, 且 CI 值越小协同效应越强; 当 CI>1 时, 两物质为拮抗作用, 且 CI 值越大拮抗效应越强。

$$CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}} \quad (2)$$

式中:  $D_1$  和  $D_2$  为联合作用抑制率为 Fa 时复配物 1 和复配物 2 各自的浓度, mmol/L;  $D_{x1}$  和  $D_{x2}$  为单独作用抑制率为 Fa 时复配物 1 和复配物 2 的浓度, mmol/L。

##### (2) CAR 与 7 种多酚二元联用对 ACR 的抑制作用

分别配制 0.125 IC<sub>50</sub>、0.250 IC<sub>50</sub>、0.500 IC<sub>50</sub>、1.000 IC<sub>50</sub>、2.000 IC<sub>50</sub>、4.000 IC<sub>50</sub> 浓度的 8 种多酚溶液(DMSO 作溶剂), 以 DMSO 代替多酚溶液作为对照, 加入等体积 0.5 mmol/L 的 ACR 溶液涡旋混匀后, 置于 100°C 恒温水浴振荡器中反应 2 h, 反应结束后取 0.5 mL 反应液按 1.3.1 中方法检测 DNPH-ACR。

配制不同浓度的 CAR 与 ALP/PIN/槲皮素/姜黄素/高良姜素/山奈酚/芦丁溶液, 使得反应体系中 CAR 与 ALP/PIN/槲皮素/姜黄素/高良姜素/山奈酚/芦丁的终浓度分别为 0.125 IC<sub>50</sub>、0.250 IC<sub>50</sub>、0.500 IC<sub>50</sub>、1.000 IC<sub>50</sub>、2.000 IC<sub>50</sub>、4.000 IC<sub>50</sub>。将上述混合液与等体积 0.5 mmol/L ACR

涡旋混匀后, 置于 100°C 恒温水浴振荡器中反应 2 h, 结束后取 0.5 mL 反应液按 1.3.1 中方法检测 DNPH-ACR。应用 CompuSyn 软件, 根据 Chou-Talalay 方程计算出联合作用指数 CI, 评价 CAR 与 7 种多酚化合物的联合作用效果。

#### 1.3.3 煮肉时草豆蔻及 3 种多酚对 ACR 的清除作用

定量分析表明, 草豆蔻中 CAR、ALP 和 PIN 的含量分别为 5.53、3.30 和 8.27 mg/g<sup>[29]</sup>。按 2%、4%、6% 草豆蔻添加量计算 3 种单一多酚化合物的添加量。选择肥瘦相间的五花肉, 清洗刮去表皮污垢, 切成 2 cm×2 cm×2 cm 方块状肉块, 大小均匀, 分成若干份, 每份定量为 500 g, 分别添加 CAR 粉末(55.3、110.6、165.8 mg/500 g)、ALP 粉末(33.0、65.9、98.9 mg/500 g)、PIN 粉末(82.7、165.4、248.1 mg/500 g) 以及草豆蔻粉末(10、20、30 g/500 g), 加入肉量的 1.5 倍水, 大火煮沸后改用小火慢煮, 熬煮 2 h。冷却后, 将肉汤汤汁、肥肉及瘦肉肉块分别于 -80°C 冰箱冻藏备用。

分别准确称取 3.0 g 瘦肉粉碎后置于离心管中, 加入 5.0 mL 蒸馏水, 涡旋混合 3 min 后超声萃取 60 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 再向离心管中加入 5.0 mL 50% 的甲醇水溶液, 涡旋混合后超声萃取 60 min, 8000 r/min 离心 10 min, 再次取上清液, 将两次上清液合并混匀, 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液 0.5 mL 按 1.3.1 中方法检测 DNPH-ACR 含量, 计算单一抑制剂及草豆蔻的不同添加量对煮肉过程中 ACR 的抑制率。

#### 1.3.4 超高效液相色谱-串联质谱法分析煮肉中草豆蔻抑制 ACR 机制

取 1.3.3 中添加 2% 草豆蔻粉末的煮肉样品, 分别准确称取 3.0 g 肉汤汤汁、3.0 g 肥肉和 3.0 g 瘦肉, 粉碎后置于离心管中, 参照文献[30]方法加入 5.0 mL 乙腈饱和的正己烷溶液并涡旋混匀 2 min, 再加入 15 mL 正己烷饱和的乙腈溶液并涡旋混匀 2 min, 超声 30 min, 静置分层, 将乙腈层转入浓缩瓶中, 重复提取 2 次, 并将乙腈层提取液合并, 使用旋转蒸发仪浓缩至干, 使用 1 mL 乙腈复溶, 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 使用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析草豆蔻中多酚类化合物 CAR、ALP 和 PIN 与 ACR 的加合产物。

色谱条件: 色谱柱: kromasil 100-5 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 紫外检测器; 柱温: 30°C; 检测波长: 300 nm。洗脱条件: 流动相 A: 纯水(含 0.1% 甲酸); 流动相 B: 乙腈(含 0.1% 甲酸); 流动相梯度: 0~3.0 min: 30% B; 3.0~28.0 min: 30%~75% B; 28.0~28.1 min: 75%~100% B; 28.1~31.0 min: 100% B; 31.0~31.1 min: 100%~30% B; 31.1~36.0 min: 30% B。流速: 0.6 mL/min; 进样量: 20 μL。

质谱条件: 电喷雾正离子化(electron spray ionization, ESI+), 扫描范围为  $m/z$  50~1000; 喷雾电压 3.5 kV; 雾化气压 45 psi; 辅助气压 5 psi; 毛细管温度 300°C; 裂解电压 200 V; 气体流速 5.1 L/min。

## 1.4 数据处理与分析

采用 Excel 2019 软件进行数据分析, 所有实验重复 3 次, 结果以平均值±标准偏差表示。采用 SPSS Statistics 25.0 软件对数据进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)和 Duncan 检验法比较,  $P < 0.05$  表示存在显著性差异。采用 CompuSyn 软件, 根据 Chou-Talalay 方程计算出联合作用指数 CI, 评价不同多酚复配的联合作用效果。

## 2 结果与分析

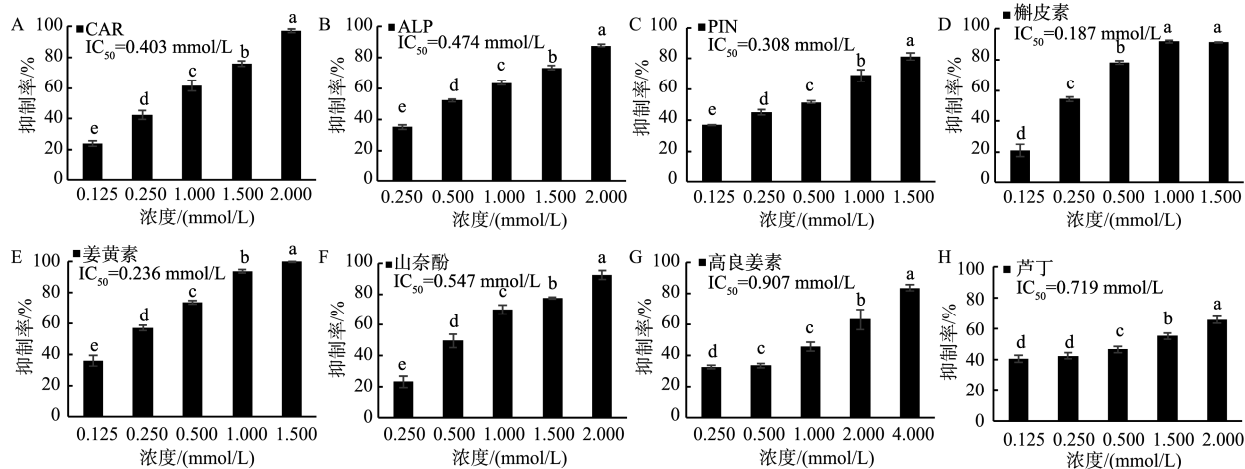
### 2.1 多酚单用在模拟加工条件下对 ACR 抑制活性的影响

从食源性多酚中筛选出 8 种高活性化合物, 分别为 CAR、ALP、PIN、槲皮素、姜黄素、山奈酚、高良姜素和芦丁。图 1 结果表明, 随着反应浓度的增加, CAR、ALP、PIN、姜黄素、山奈酚、高良姜素、芦丁 7 种多酚对 ACR 的抑制活性增强, 且存在显著性差异( $P < 0.05$ )(图 1A、B、C、E、F、G、H)。槲皮素在低浓度时随着浓度增加, 抑制率增加; 当浓度增加到 1.000 和 1.500 mmol/L 时(图 1D), 差异性不显著( $P > 0.05$ )。

酚类化合物对 ACR 的  $IC_{50}$  值越小, 则抑制活性的能力越强, 图 1 结果表明, 8 种多酚对 ACR 的抑制率由高到低依次为槲皮素、姜黄素、PIN、CAR、ALP、山奈酚、芦丁、高良姜素。鉴于 CAR 和 ALP 的抑制效果中等且接近, 前期研究表明两者更适合热加工, 耐高温性明显优于槲皮素和杨梅素等高活性多酚类抑制剂, CAR 在溶液中能够闭合 C 环转换为 ALP, ALP 也能通过打开 C 环转换为 CAR, 在高温条件下两者仅相互转化而没有任何损失<sup>[23]</sup>。因此进一步选择 CAR 与其他 7 种多酚联用, 研究复配后对 ACR 抑制率的影响。

### 2.2 CAR 分别与 7 种多酚二元联用对 ACR 的抑制效果

根据 Chou-Talalay 组合定理发现, 在 100°C、2 h、pH



注: 不同小写字母表示同一物质在不同反应浓度下差异显著( $P < 0.05$ )。

图 1 不同浓度的多酚化合物对 ACR 的抑制作用( $n=3$ )

Fig.1 Inhibitory effects of different concentrations of polyphenols on ACR ( $n=3$ )

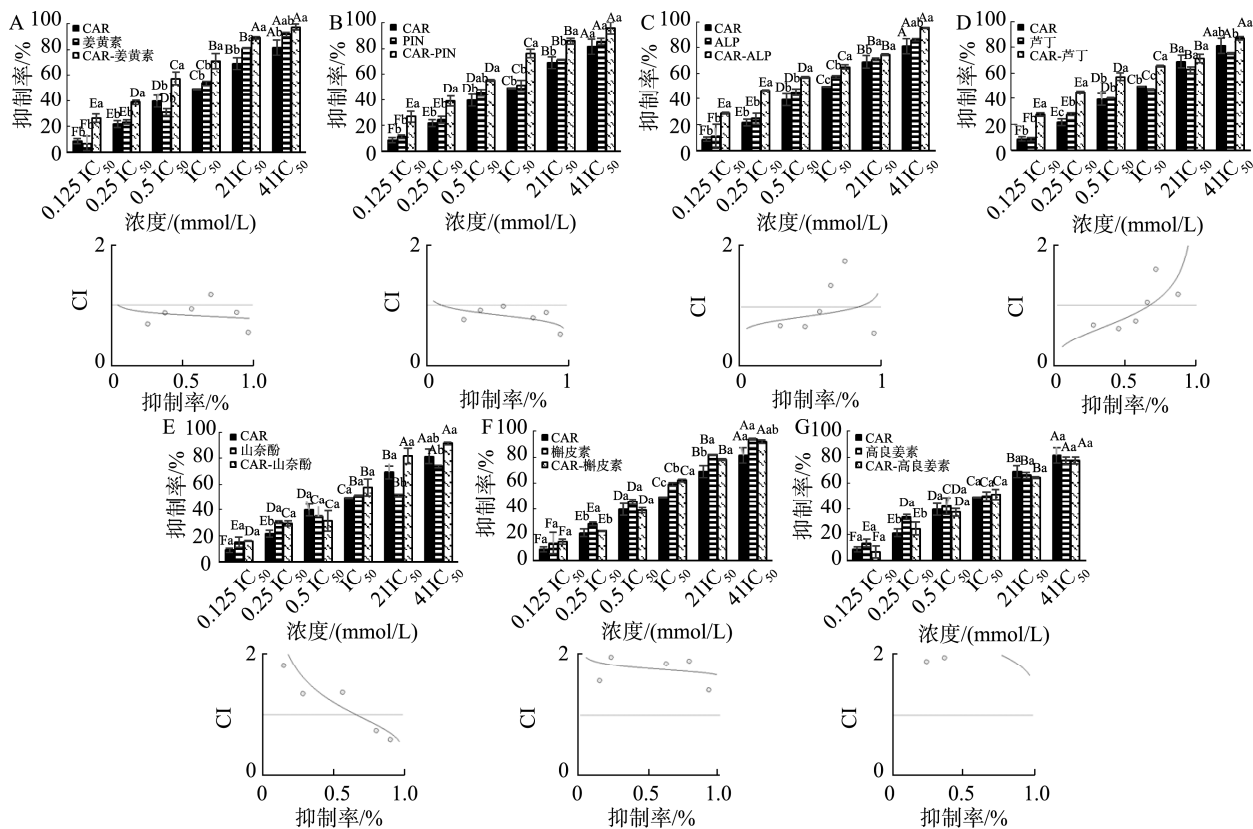
7.0 条件下, CAR+姜黄素、CAR+PIN、CAR+ALP、CAR+芦丁、CAR+山奈酚联用时对 ACR 的清除具有协同作用, CAR 与槲皮素和高良姜素联用则具有拮抗作用。

由图 2A 可知, CAR 与姜黄素联用后的 CI 值始终小于 1, 且随着抑制率升高呈现逐渐下降的趋势, 表明协同作用逐步增强。当 CAR 浓度在 0.024~9.911 mmol/L、姜黄素浓度在 0.022~2.157 mmol/L 时, 两者按  $IC_{50}$  比例联用可协同抑制 ACR 活性。由图 2B 可知, 低浓度复配时, CAR 与 PIN 联用的  $CI > 1$ , 为拮抗效应; 当复配浓度进一步提升, CAR 浓度在 0.075~9.911 mmol/L、PIN 浓度在 0.046~6.198 mmol/L 时, 两者按  $IC_{50}$  比例联用可发挥协同作用。由图 2C 可知, CAR 浓度在 0.024~1.395 mmol/L、ALP 浓度在 0.023~1.295 mmol/L 时两者按  $IC_{50}$  比例联用有协同作用, 随着复配浓度升高, 协同抑制率升高, 协同效应降低。由图 2D 可知, CAR 浓度在 0.024~0.679 mmol/L、芦丁素浓度在 0.030~1.510 mmol/L 时两者按  $IC_{50}$  比例联用有协同作用。由图 2E 可知, CAR 浓度在 0.842~9.911 mmol/L、山奈酚浓度为 2.098~85.061 mmol/L 时, 两者按  $IC_{50}$  比例联用有协同作用, 复配浓度越大, 协同作用越显著。

### 2.3 草豆蔻中多酚类化合物对煮肉中 ACR 的抑制分析

#### 2.3.1 草豆蔻及其主要多酚添加量对煮肉中 ACR 抑制效果的影响

由图 3 可知, 在煮肉过程中草豆蔻及其主要多酚化合物 CAR、ALP 和 PIN 均具有一定的抑制效果, 且随着添加量的增加, 对瘦肉中 ACR 的抑制率也增加。不同添加量下草豆蔻的抑制效果均显著高于单独使用一种多酚化合物, 当草豆蔻的添加量为 6% 时, 抑制率达到 50.3%, 可见草豆蔻中的 3 种多酚协同发挥抑制作用。



注: 不同大写字母表示同一物质在不同反应浓度下的显著性差异( $P < 0.05$ ); 不同小写字母表示不同物质在同一浓度下的显著差异( $P < 0.05$ ); 图3同。

图2 CAR与姜黄素(A)、CAR与PIN(B)、CAR与ALP(C)、CAR与芦丁(D)、CAR与山奈酚(E)、CAR与槲皮素(F)、

CAR与高良姜素(G)分别单用及二元联用对ACR的抑制作用和Fa-CI曲线( $n=3$ )

Fig.2 Inhibitory effects and Fa-CI curve of CAR and curcumin (A), CAR and PIN (B), CAR and ALP (C), CAR and rutin (D), CAR and kaempferol (E), CAR and quercetin (F), CAR and galangin (G) on ACR ( $n=3$ )

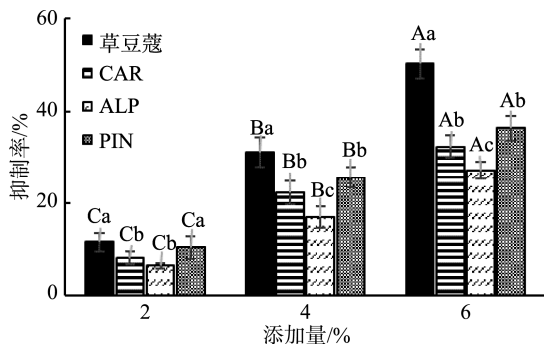


图3 不同添加量的草豆蔻及其多酚化合物对煮肉中瘦肉的ACR抑制作用( $n=3$ )

Fig.3 Inhibitory effects of ACR by *Alpinia katsumadai* Hayata and its polyphenols with different additions in boiled lean pork ( $n=3$ )

### 2.3.2 草豆蔻抑制煮肉中ACR机制

采用UPLC-MS/MS研究添加草豆蔻降低煮肉过程中的ACR的作用机制,结果见图4、5。由图4A所示,液相色谱图上出现了保留时间(retention time,  $t_R$ )为16.2、21.0、23.9 min的3个色谱峰。由图5A、B可知,色谱峰( $t_R=16.2$  min)和色谱峰( $t_R=23.9$  min)的母离子质量均为 $m/z$  271  $[M+H]^+$ ,其二级碎片离子均出现了 $m/z$  167  $[M+H]^+$ 和 $m/z$  103  $[M+H]^+$ ,

与ALP/CAR相同,该峰的保留时间与ALP/CAR标准品一致,因此这两个色谱峰依次为ALP和CAR。由图5C可知,色谱峰( $t_R=21.0$  min)的母离子质量为 $m/z$  257  $[M+H]^+$ ,其二级碎片离子出现了 $m/z$  103  $[M+H]^+$ 和 $m/z$  153  $[M+H]^+$ ,与PIN相同,该峰的保留时间与PIN标准品一致,因此该色谱峰为PIN。

图4B所示,液相色谱图上还出现了保留时间为18.9、21.7、25.7 min的3个色谱峰。由图5D、E可知,色谱峰( $t_R=18.9$  min)和色谱峰( $t_R=25.7$  min)的母离子质量均为 $m/z$  327  $[M+H]^+$ ,比ALP/CAR的母离子质量 $m/z$  271  $[M+H]^+$ 多56 ( $MW_{ACR}=56$ ),其二级碎片离子均出现 $m/z$  283  $[M-44+H]^+$ ,推测为化合物加合成环后丢失一个 $[-CHOH-CH_2-]$ 基团所得<sup>[24]</sup>,其保留时间和片段与本实验室制备的ALP-ACR (ALP与ACR的一加合物)和CAR-ACR-1 (CAR与ACR的一加合物)标准品相同<sup>[29]</sup>,因此这两个色谱峰依次为ALP-ACR和CAR-ACR-1。由图5F可知,色谱峰( $t_R=21.7$  min)的母离子质量为 $m/z$  313  $[M+H]^+$ ,比PIN的母离子质量 $m/z$  257  $[M+H]^+$ 多56 ( $MW_{ACR}=56$ ),其二级碎片离子出现了 $m/z$  269  $[M-44+H]^+$ ,可能为PIN加合一分子ACR成环后丢失一个 $[-CHOH-CH_2-]$ 基团所得<sup>[31]</sup>,因此推测该色谱峰为

PIN-ACR-1 (PIN 与 ACR 的一加合物)。

由图 4A 可知, 在草豆蔻提取物中存在 CAR、ALP 与 PIN, 并且当添加草豆蔻煮制猪肉时, 在肉汤和猪肉中也检测到这 3 种化合物(图 5B~D)。在瘦肉中检测到了 CAR、

ALP 与 PIN 捕获 ACR 形成的加合物 ALP-ACR、CAR-ACR-1 和 PIN-ACR-1, 说明草豆蔻是通过 3 种物质协同作用, 捕获 ACR 形成产物的路径有效抑制了煮肉过程中产生的 ACR。

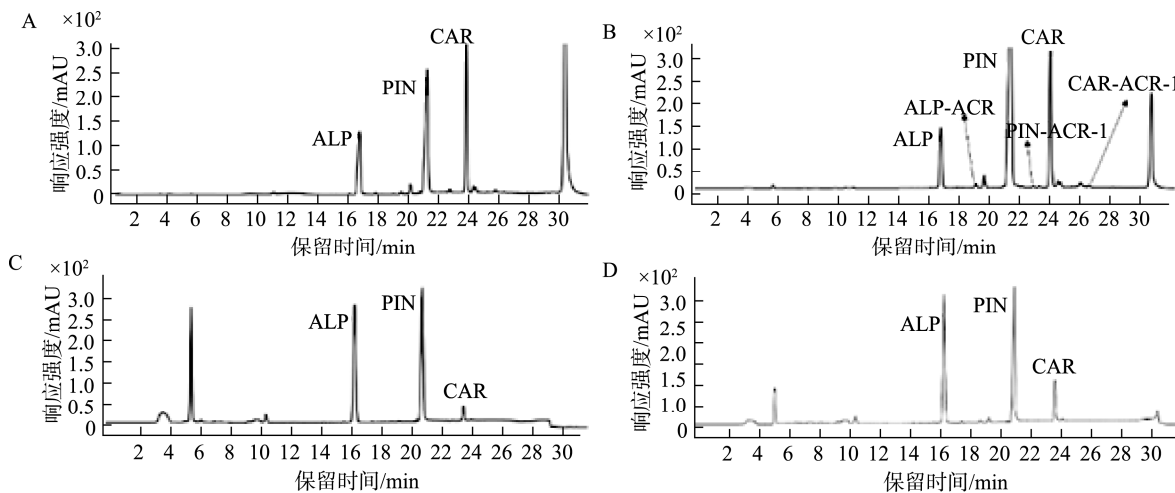


图 4 草豆蔻提取液(A)、瘦肉(B)、肉汤(C)、肥肉(D)的液相色谱图

Fig.4 Liquid chromatograms of the extract from *Alpinia katsumadai* Hayata (A), lean pork (B), pork broth (C) and fat pork (D)

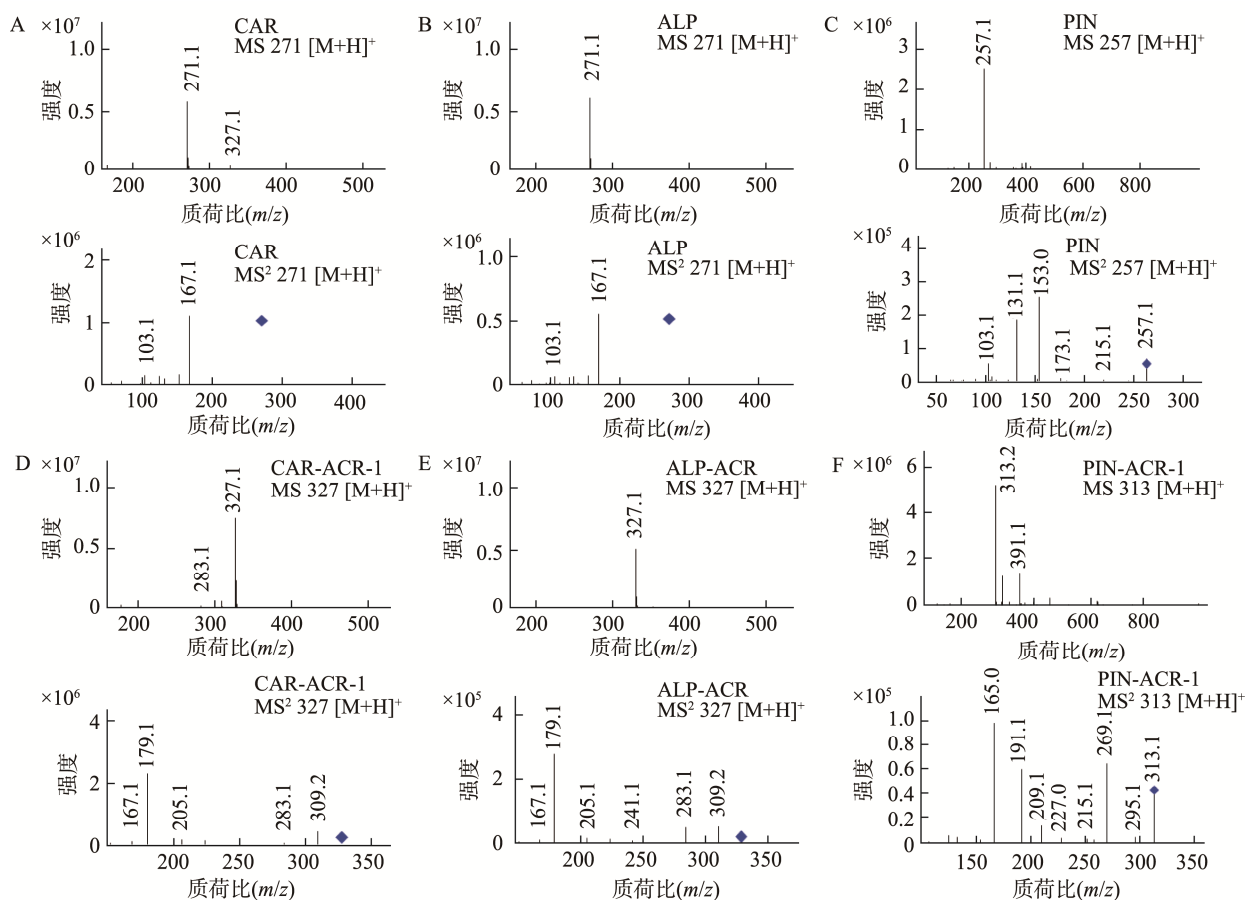


图 5 草豆蔻中 CAR (A)、ALP (B)、PIN (C)及其与 ACR 加合物 CAR-ACR-1 (D)、ALP-ACR (E)、PIN-ACR-1 (F) 的 ESI-MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 图  
 Fig.5 ESI-MS<sup>1</sup> and MS<sup>2</sup> chromatograms of CAR (A), ALP (B), PIN (C) in *Alpinia katsumadai* Hayata and their adducts CAR-ACR-1 (D), ALP-ACR (E), PIN-ACR-1 (F)

### 3 结 论

本研究基于 Chou-Talalay 法则, 在模拟食品高温加工条件 (100°C、2 h、pH 7.0) 下, 对香辛料中不同多酚化合物复配后抑制 ACR 的联用效果进行评估。结果表明, CAR+ALP、CAR+PIN、CAR+姜黄素、CAR+芦丁、CAR+山奈酚两两组合在高温条件下具有清除 ACR 的协同作用, 而槲皮素和高良姜素与 CAR 联用存在拮抗作用。针对具有协同效应的组合, 选用了香辛料载体草豆蔻, 在其规定添加范围内, 可以有效抑制煮肉过程中形成的 ACR, 抑制率达到 50.3%。其可能的作用机制之一为草豆蔻中 3 种多酚 ACR、ALP 和 PIN 分别捕获 ACR, 形成了各自的加合产物。研究表明香辛料不仅可以作为日常膳食的调味品, 其含有的多种多酚复配联用可以起到协同抑制 ACR 的效果, 可作为耐高温 ACR 抑制剂应用于肉类加工食品中。

### 参考文献

- DEJARNETT N, CONKLIN DJ, RIGGS DW, *et al.* Acrolein exposure is associated with increased cardiovascular disease risk [J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(4): 1–11.
- FEROE AG, ATTANASIO R, SCINICARIELLO F. Acrolein metabolites, diabetes and insulin resistance [J]. *Environ Res*, 2016, 148: 1–6.
- TSOU HH, HSU WC, FUH JL, *et al.* Alterations in acrolein metabolism contribute to Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(2): 571–580.
- MEDINA NR, DURÁN RG, DAMP M, *et al.* Glucose autoxidation produce acrolein from lipid peroxidation *in vitro* [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 337(1): 183–185.
- LEE CH, CHEN KT, LIN JA, *et al.* Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 93: 271–280.
- FERREIRA DC, NICOLLI KP, SOUZA-SILVA ÉA, *et al.* Carbonyl compounds in different stages of vinification and exposure risk assessment through merlot wine consumption [J]. *Food Addit Contam A*, 2018, 35(12): 2315–2331.
- GOSETTI F, CHIUMINATTO U, MAZZUCCO E, *et al.* Simultaneous determination of thirteen polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve aldehydes in cooked food by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(37): 6308–6318.
- LANE RH, SMATHERS JL. Monitoring aldehyde production during frying by reversed-phase liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 1991, 74(6): 957–960.
- STEVENS JF, MAIER CS. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(1): 7–25.
- HERNANDEZ-CASTILLO C, TERMINI J, SHUCK S. DNA adducts as biomarkers to predict, prevent, and diagnose disease-application of analytical chemistry to clinical investigations [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(2): 286–307.
- RIETJENS IMCM, DUSSORT P, GUNTHER H, *et al.* Exposure assessment of process-related contaminants in food by biomarker monitoring [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(1): 15–40.
- ZAMORA R, AGUILAR I, GRANVOGL M, *et al.* Toxicologically relevant aldehydes produced during the frying process are trapped by food phenolics [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(27): 5583–5589.
- WANG W, QI Y, ROCCA JR, *et al.* Scavenging of toxic acrolein by resveratrol and hesperetin and identification of adducts [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(43): 9488–9495.
- ZHU Q, ZHENG ZP, CHENG KW, *et al.* Natural polyphenols as direct trapping agents of lipid peroxidation-derived acrolein and 4-hydroxy-trans-2-nonenal [J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(10): 1721–1727.
- HUANG Q, ZHU Y, LV L, *et al.* Translating *in vitro* acrolein-trapping capacities of tea polyphenol and soy genistein to *in vivo* situation is mediated by the bioavailability and biotransformation of individual polyphenols [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(1): 1900274.
- JIANG X, LV H, LU Y, *et al.* Trapping of acrolein by curcumin and the synergistic inhibition effect of curcumin combined with quercetin [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(1): 294–301.
- 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.
- 谢鹏, 秦华珍, 谭喜梅, 等. 草豆蔻化学成分和药理作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(3): 60–63.
- XIE P, QIN HZ, TAN XM, *et al.* Research progress on chemical constituents of *Alpinia katsumadai* Hayata and their pharmacological activities [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(3): 60–63.
- 石雪萍, 余芳. RP-HPLC 测定小茴香中槲皮素和山奈酚含量[J]. *中国调味品*, 2015, 40(5): 93–96.
- SHI XP, YU F. Determination of quercetin and kaempferol in *Foeniculum vulgare* Mill. by RP-HPLC [J]. *China Cond*, 2015, 40(5): 93–96.
- 刘万里. 山奈中黄酮类化合物的超声强化提取及稳定性研究[J]. *中国调味品*, 2016, 41(10): 58–63, 69.
- LIU WL. Ultrasonic extraction and stability of flavonoids from *Kaempferia galanga* L. [J]. *China Cond*, 2016, 41(10): 58–63, 69.
- 刘梦菲, 屠寒, 江汉美, 等. 丁香中黄酮含量的测定及其水解条件优化的正交试验[J]. *中国药师*, 2018, 21(9): 1565–1569.
- LIU MF, TU H, JIANG HM, *et al.* Determination of flavonoids in clove and optimization of hydrolysis conditions by orthogonal test [J]. *China Pharm*, 2018, 21(9): 1565–1569.
- 汪光华, 唐树平, 彭名军, 等. 高良姜中 4 种黄酮化合物的体外抗氧化能力及抑菌活性研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 168–172.
- WANG GH, TANG SP, PENG MJ, *et al.* Study on the antioxidant and antimicrobial activities of 4 kinds of flavonol compounds from *Alpinia officinarum* Hance rhizome *in vitro* [J]. *Food Mach*, 2017, 33(5): 168–172.

- [23] LU Y, LIU J, TONG AQ, *et al.* Interconversion and acrolein-trapping capacity of cardamomin/alpinetin and their metabolites *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69: 11926–11936.
- [24] ZHANG D, JIANG X, XIAO L, *et al.* Mechanistic studies of inhibition on acrolein by myricetin [J]. *Food Chem*, 2020, 323: 126788.
- [25] 吴晓, 卢文丽, 方肇勤, 等. 中药成分联用抑制肝癌细胞增殖及机制研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2022, 36(3): 97–104.
- WU X, LU WL, FANG ZQ, *et al.* Research progress on inhibition of hepatoma cells proliferation by combination of traditional Chinese medicine ingredients and its mechanism [J]. *Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med*, 2022, 36(3): 97–104.
- [26] 黄俊源, 罗志锋, 苏艺, 等. 发酵巴戟天中多糖、寡糖与蒽醌复配的抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(10): 3303–3310.
- HUANG JY, LUO ZF, SU Y, *et al.* Study on antioxidant activity of the compound of polysaccharide, oligosaccharide and anthraquinone in fermented *Morinda officinalis* How [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(10): 3303–3310.
- [27] CHOU TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58: 621–681.
- [28] 卢永翎, 章鼎敏, 肖留榜, 等. 杨梅素-丙烯醛加合物抗氧化及捕获丙烯醛活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(23): 1–7.
- LU YL, ZHANG DM, XIAO LB, *et al.* Antioxidant and acrolein trapping capacity of myricetin-acrolein adducts [J]. *Food Sci*, 2020, 41(23): 1–7.
- [29] LU Y, LIU J, TONG JQ, *et al.* Dual effects of cardamomin/alpinetin and their acrolein adducts on scavenging acrolein and the anti-bacterial activity from *Alpinia katsumadai* Hayata as a spice in roasted meat [J]. *Food Funct*, 2022, 13: 7088–7097.
- [30] 童安琪, 刘娟, 段焱, 等. 香辛料中山姜素和小豆蔻的定量分析及其抑制肉松中丙烯醛活性[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 35(5): 316–455.
- TONG ANQ, LIU J, DUAN Y, *et al.* Quantitative analysis of cardamomin and alpinetin in spices and their inhibitory activity on acrolein in meat floss processing [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 35(5): 316–455.
- [31] DONG F, WANG SP, YANG AL, *et al.* Systematic screening and characterization of cardamomin metabolites using UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS after oral administration to rats [J]. *Arab J Chem*, 2020, 13(12): 8768–8782.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

### 作者简介



冯小兰, 副教授, 主要研究方向为营养与食品卫生学。  
E-mail: junzilan1123@126.com



卢永翎, 高级实验师, 主要研究方向为功能性食品及食品化学。  
E-mail: lyldh@126.com