DOI:10.12441/spyswjs.20241208001 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0128-11

柚皮素和EGCG抑制杂环胺PhIP生成的作用机理

于 帅[1] 罗清辰[1] 冯蒙蒙[2] 艾 欣[1] 李煜彬[1] 赵 亮[1*]

(1. 北京工商大学老年营养与健康教育部重点实验室,北京 100048; 2. 菏泽职业学院,山东 菏泽 274000)

摘要:【目的】明确柚皮素和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)在抑制烤肉中2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-*b*]吡啶(PhIP)形成中的关键作用,揭示两者通过调控前体物消耗和中间产物积累的分子机制,为食品加工中降低杂环胺风险提供科学依据。**【方法】**测定烤鸡胸肉中PhIP前体物的变化,建立了黄酮、丙酮醛(MGO)和苯丙氨酸(Phe)模型反应体系,并通过分析各关键物质反应动力学曲线变化,探究柚皮素和EGCG对杂环胺PhIP的抑制机理。**【结果】**柚皮素和EGCG能够抑制鸡胸肉在烤制过程中PhIP生成前体物肌酸和氨基酸的消耗,从而发挥其对PhIP的抑制作用。以MGO代替葡萄糖(glucose,Glc)建立模型反应体系,有利于减少反应体系中复杂产物的干扰,从而确定柚皮素和EGCG干预PhIP形成关键环节。加入柚皮素和EGCG能降低PhIP前体物苯乙醛及美拉德反应中间物MGO的生成量。由反应动力学模型参数的结果可知,EGCG和柚皮素与苯乙醛之间发生的消除反应速率最大,是两者抑制PhIP生成的关键反应。**【结论】**EGCG和柚皮素对PhIP的抑制作用机理是通过消除苯乙醛,降低反应体系中的苯乙醛生成量,从而抑制PhIP的生成。

关键词:杂环胺;表没食子儿茶素没食子酸酯;柚皮素;2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑[4,5-*b*]吡啶;抑制 机理;苯乙醛

Inhibition Mechanisms of Naringenin and EGCG Against the Formation of the Heterocyclic Amine PhIP

YU Shuai[1] *LUO Qingchen*[1] *FENG Mengmeng*[2] *AI Xin*[1] *LI Yubin*[1] *ZHAO Liang*[1*]

(1. Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Ministry of Education, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Heze Vocational College, Heze 274000, China)

Abstract: [**Objective**] This study clarifies the key roles of naringenin and epigallocatechin gallate (EGCG) in inhibiting 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP) formation in roasted meat and reveals the molecular mechanisms by which naringenin and EGCG regulate precursor consumption and intermediate accumulation, aiming to provide a scientific basis for reducing the risk of heterocyclic amines in food processing. [**Method**] The changes in precursors of PhIP in roasted chicken breast were determined, and a model reaction system of flavonoids, methylglyoxal (MGO), and phenylalanine (Phe) was established. The reaction kinetics curves of key substances were studied to decipher the inhibition mechanisms of naringenin and EGCG against the formation of PhIP. [**Result**] Naringenin and EGCG inhibited the consumption of creatine and amino acids, precursors of PhIP formation, thereby inhibiting the formation of PhIP in chicken breast during roasting. Replacing glucose (Glc) with MGO in the model reaction system helped to reduce the interference from complex reaction products, which facilitated the identification of the critical point at which naringenin and EGCG intervened in PhIP formation. Naringenin and EGCG reduced the production of the PhIP precursor phenylacetaldehyde and the Maillard reaction intermediate MGO. The reaction kinetic model data revealed that

基金项目:北京市自然科学基金项目(6242001)。

通信作者:赵亮(1990—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事功能食品开发与生物活性成分研究。E-mail: liangzhao@btbu.edu.cn

收稿日期:2024-12-08 **修回日期:**2025-02-20

the elimination reaction rates of EGCG and naringenin with phenylacetaldehyde were the highest, indicating that the elimination reaction was a key for the two compounds in inhibiting PhlP formation. [**Conclusion**] EGCG and naringenin inhibited the formation of PhlP by reducing the amount of phenylacetaldehyde in the reaction system through the elimination reaction.

Keywords: heterocyclic amine; EGCG; naringenin; PhIP; inhibition mechanism; phenylacetaldehyde

肉类是人们获取蛋白质的主要来源之一，但在高温热加工肉制品的过程中，会产生具有高度致癌性和致突变性的物质——杂环胺[1-3]。现有研究表明，加工肉是导致人类患癌症的原因之一[4]，食用熟肉与结肠癌、前列腺炎和乳腺癌发病之间存在相关性[5-6]。值得关注的是，尽管各种肉类的烹饪方式不同，但其中均检测出了PhIP。PhIP是食品加工和日常家庭烹饪中浓度最高的极性杂环胺之一，每克高温肉制品中PhIP可高达几十纳克[7]。国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer，IARC）于1993年将PhIP等杂环胺类物质定义为潜在致癌物（2B级）。因此，寻找有效抑制高温热加工肉制品中杂环胺产生的方法具有重要意义。研究发现，通过添加天然无毒的黄酮类化合物能够控制杂环胺的形成[8]，该方法在食品工业中具有推广应用前景。

Felton等[9]通过同位素标记证实Phe和肌酸酐是PhIP形成的前体物。Zöchling等[10]使用高效液相色谱仪（HPLC）和气相质谱联用仪（GC-MS）在模型反应体系以及烤肉中对Phe、肌酸酐等前体物以及苯乙醛等反应中间体进行检测，进一步证实了PhIP的生成途径。PhIP的形成主要分为2个阶段：第一阶段，Phe在高温下经Strecker降解生成苯乙醛，Glc可促进此过程；第二阶段，肌酸酐与苯乙醛缩合，经过一系列复杂反应最终生成PhIP，此阶段的具体反应过程尚不明确[11]。作者所在课题组前期研究表明，黄酮类化合物可以有效抑制杂环胺生成，其中EGCG与柚皮素的效果最为显著[12]。Cheng等[13-14]研究表明，黄酮类化合物会与苯乙醛形成加合物，阻断其与肌酸酐发生缩合反应，从而抑制PhIP的形成。此外，*α*-二羰基化合物如MGO是美拉德反应产生的活性羰基中间体，会促进Phe生成苯乙醛与肌酸酐反应[15]，最终生成PhIP。因此研究黄酮类化合物对*α*-二羰基化合物形成的影响，也是探讨其影响PhIP形成的重要途径。Zhao等[16]通过建立QSAR模型发现，黄酮类化合物对杂环胺形成的抑制效果与其疏水性、羟基数量和拓扑结构有关。黄酮类化合物可能通过直接清除苯乙醛阻断PhIP的形成，也可能与α-二羰基化合物相互作用影响PhIP的生成，但对这2种途径的相对贡献及其相互作用的理解有限。因此，研究黄酮类化合物对杂环胺形成过程中反应动力学的影响，探索黄酮类化合物如何通过这2种途径影响PhIP的形成，对揭示其阻断杂环胺的形成的机制至关重要。

作者通过构建黄酮、MGO和Phe机理模型反应体系，建立了反应动力学曲线，详细分析了柚皮素和EGCG与PhIP前体物之间的反应速率，确定EGCG和柚皮素在抑制PhIP生成过程中的关键作用点，从而深入探究柚皮素和EGCG对PhIP的抑制作用机理，以期降低烤肉中杂环胺的含量，为降低烤肉制品的致癌性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡胸肉：北京永辉超市；PhIP：纯度>99%，加拿大Toronto Research Chemicals公司；柚皮素：纯度>98%，北京百灵威科技有限公司；EGCG：纯度>98%，成都瑞芬思生物科技有限公司；肌酸酐、肌酸、甘氨酸（Gly）、苏氨酸（Thr）、异亮氨酸（Ile）、半胱氨酸（Cys）、脯氨酸（Pro）、丙氨酸（Ala）、蛋氨酸（Met）、缬氨酸（Val）、丝氨酸（Ser）、精氨酸（Arg）、谷氨酸（Glu）、亮氨酸（Leu）、色氨酸（Trp）、Phe、组氨酸（His）、赖氨酸（Lys）、酪氨酸（Tyr）：分析纯，北京博奥拓达科技有限公司；苯乙醛、MGO、邻苯二胺、2，4-二硝基氟苯：分析纯，上海麦克林生化科技股份有限公司；二甘醇、硼酸、乙酸钠、磷酸、*N*，*N*-二甲基甲酰胺：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；乙酸乙酯、乙腈、甲醇：色谱纯，美国Fisher Chemical公司；Oasis MCX固相萃取柱：美国Waters公司。

1.2 仪器与设备

分析天平：MS105DU型，瑞士Mettler Toledo公司；涡旋振荡器：VORTEX-5型，江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司；HPLC：LC-20AT型，日本岛津公司；GC-MS：Thermo TSQ8000Evo型，美

国赛默飞世尔科技公司；油浴锅：EYELAOSB-2100，上海爱朗仪器有限公司；离心机：3-18K 型，美国 Sigma 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 烤鸡胸肉的制作

将新鲜鸡胸肉洗净，吸干水分后绞碎。称取 40 g 肉糜，制成直径 6 cm、厚 1 cm 的圆形肉饼；另取 80 g 肉糜平均分成 2 份，分别加入 2 mL 0.025 mol/L 柚皮素二甲醇溶液和 2 mL 0.025 mol/L EGCG 二甘醇溶液，充分搅拌，制成 2 个直径 6 cm、厚 1 cm 的圆形肉饼。置于 4 ℃冰箱腌制 12 h，随后放入预热至 220 ℃的电烤箱中烤 20 min，10 min 时翻面。烤完后用温度计测量肉饼中心温度，保证一致。待冷却后，用粉碎机将肉饼粉碎，放置于−20 ℃储存。

1.3.2 杂环胺的提取与 UPLC-MS/MS 分析

称取 6 g 烤肉，加入 25 mL 1 mol/L NaOH 溶液和内标溶液，均质 10 min 后加入 15 g 硅藻土，搅拌使其充分混合，再加入 50 mL 乙酸乙酯，超声抽提 30 min，重复超声抽提 1 次，合并 2 次滤液，分层后取乙酸乙酯层，旋蒸浓缩至 10 mL。采用 Oasis MCX 固相萃取柱进行萃取，依次用 6 mL 0.1 mol/L 盐酸、6 mL 甲醇和 6 mL 甲醇−氨水溶液（甲醇和氨水的体积比 95∶5）洗脱杂环胺，用氮吹仪于 45 ℃吹干洗脱液，加入 1 mL 甲醇复溶，0.22 μm 尼龙针孔滤器过滤后进行 UPLC-MS/MS 分析[16]。色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C18（50 mm×2.1 mm×1.8 μm）；流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸溶液，流动相 B 为乙腈。梯度洗脱条件为：0~10 min，流动相 B 体积分数 10%~60%；10~12 min，流动相 B 体积分数 60%~90%；12~13 min，流动相 B 体积分数 90%~10%；13~15 min，流动相 B 体积分数 10%。流量 0.2 mL/min，进样量 1 μL，柱温 25 ℃。离子化方式为正离子模式，毛细管电压为 3.5 kV，碰撞能量为 28 eV，离子源温度为 120 ℃，脱溶剂温度为 350 ℃，干燥气流量为 10 L/min。

1.3.3 烤鸡胸肉中 PhIP 前体物的分析

1）游离氨基酸的分析：称取 5.0 g 鸡胸肉糜，加入 20 mL 去离子水，匀浆 10 min，5 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液，与 20 mL 体积分数 5% 的三氯乙酸水溶液充分混合，4 ℃静置 12 h 沉淀蛋白质。滤液用 5 mol/L KOH 溶液调节 pH 至 6.0，并用去离子水稀释至 50 mL。用氨基酸衍生法结合 HPLC 法进行游离氨基酸的测定[17]。将 0.5 mL 样品溶液移入 5 mL 棕色容量瓶内，随后依次加入 0.5 mL pH 为 9.0 的硼酸缓冲液和 0.5 mL 2，4-二硝基氟苯衍生化试剂。在 60 ℃的水浴中，于暗处反应 1 h。待反应液冷却至室温后，使用 pH 7.0 的磷酸缓冲液定容至刻度，并静置 15 min，过 0.45 μm 微孔滤膜后进行 HPLC 检测。色谱柱为 SHIMADZU-GL InertSustain C18（250 mm×4.6 mm×5 μm）；流动相 A 为含体积分数 1% *N*，*N*-二甲基甲酰胺的乙酸钠缓冲溶液（pH 6.8），流动相 B 为体积分数 50% 的乙腈水溶液。流量 1.2 mL/min，柱温 27 ℃，检测波长 360 nm。梯度洗脱程序为：0 min，流动相 B 体积分数 16%；4.0 min，流动相 B 体积分数 31%；9.5 min，流动相 B 体积分数 36%；17.0 min，流动相 B 体积分数 55%；28.0 min，流动相 B 体积分数 65%；34.0 min，流动相 B 体积分数 100%；36.0 min，流动相 B 体积分数 16%。

2）肌酸和肌酸酐的分析：称取 500 mg 鸡胸肉糜于 10 mL 试管中，加入 5 mL 0.5 mol/L $HC1O_4$ 溶液，匀浆 5 min。4 ℃下于 5 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，用 5 mol/L KOH 溶液调节至 pH 7.0，再次离心 10 min，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜后进行 HPLC 检测[18]。参照黎晓维等[19]的检测条件，色谱柱为 SHIMADZU-GL Inert ODS-SP（250 mm×4.6 mm×5 μm），流动相 A 为乙腈，流动相 B 为体积分数 0.2% 的 H_3PO_4 水溶液。采用体积分数 4% 的流动相 A 进行等度洗脱。检测波长为 210 nm，流量为 1 mL/min，柱温为 25 ℃，进样量为 20 μL。

1.3.4 化学模型体系的建立

1）PhIP 模型体系：参照文献[20]，准确称量 0.1 mmol Phe、0.1 mmol 肌酸酐和 0.05 mmol Glc 于哈希管中，加入 5 mL 含体积分数 14% 水的二甘醇溶液，振荡混匀后，175 ℃加热 30 min。样品组添加终浓度 10.0 mmol/L 的柚皮素或 EGCG，反应结束后，立即用冰水冷却，随后对体系中 PhIP 的质量浓度进行分析。

2）Phe-Glc 体系：向 5 mL 含 20 mmol/L Phe、10 mmol/L Glc 和含体积分数 14% 水的二甘醇体系中分别加入不同浓度的柚皮素或 EGCG（0、2.5、5.0、10.0 mmol/L），以不添加 Glc 的反应体系作为空白对照。175 ℃加热 1 h，反应结束后取出，放入冰水浴中冷却 10 min，测定反应液中苯乙醛的浓度。

3）Phe-MGO 体系：向 5 mL 含 20 mmol/L Phe、40 mmol/L MGO 和含体积分数 14% 水的二甘醇体系中分别加入不同浓度的柚皮素或 EGCG（0、2.5、

5.0、10.0 mmol/L），175 ℃加热1 h，反应结束后，冰水浴冷却10 min。测定反应液中苯乙醛的浓度。

1.3.5　反应动力学体系的建立

1）Phe-MGO体系：向5 mL含20 mmol/L Phe、40 mmol/L MGO和含体积分数14%水的二甘醇反应体系中加入10.0 mmol/L柚皮素或EGCG，175 ℃分别加热2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 min，反应结束后冰水浴冷却10 min。测定反应液中Phe、MGO和苯乙醛的浓度。

2）苯乙醛体系：向5 mL含20 mmol/L苯乙醛和含体积分数14%水的二甘醇反应体系中加入10.0 mmol/L柚皮素或EGCG，175 ℃分别加热0.5、1.0、1.5、2.0 h，反应结束后，冰水浴冷却10 min。测定反应液中苯乙醛的浓度。

1.3.6　反应动力学模型的构建

参考Knol等[20]建立的动力学模型，反应前体物Phe、MGO、黄酮以及反应产物苯乙醛的反应式为：

$$\text{Phe}+\text{MGO}\xrightarrow{k_1}\text{苯乙醛}$$

$$\text{MGO}+\text{黄酮}\xrightarrow{k_2}\text{产物1}$$

$$\text{苯乙醛}+\text{黄酮}\xrightarrow{k_3}\text{产物2}$$

相应的动力学方程见式（1）~（4）。

$$\frac{\mathrm{d}C_{\text{Phe}}}{\mathrm{d}t}=-k_1\times C_{\text{Phe}} \quad (1)$$

式中：

C_{Phe}——Phe的初始浓度，20 mmol/L；

k_1——Phe反应速率常数；

t——反应时间。

$$\frac{\mathrm{d}C_{\text{MGO}}}{\mathrm{d}t}=-k_1\times C_{\text{MGO}}-k_2\times C_{\text{MGO}} \quad (2)$$

式中：

k_2——MGO-黄酮反应速率常数；

k_1——Phe反应速率常数；

C_{MGO}——MGO的初始浓度，40 mmol/L；

t——反应时间。

$$\frac{\mathrm{d}C_1}{\mathrm{d}t}=-k_2\times C_1-k_3\times C_1 \quad (3)$$

式中：

C_1——黄酮的初始浓度，10 mmol/L；

k_2——MGO-黄酮反应速率常数；

k_3——苯乙醛-黄酮反应速率常数；

t——反应时间。

$$\frac{\mathrm{d}C_2}{\mathrm{d}t}=k_1\times C_{\text{Phe}}-k_3\times C_2 \quad (4)$$

式中：

k_1——Phe反应速率常数；

k_3——苯乙醛-黄酮反应速率常数；

C_2——苯乙醛的初始浓度，10 mmol/L；

C_{Phe}——Phe的初始浓度，20 mmol/L；

t——反应时间。

1.3.7　苯乙醛的分析

取0.5 mL反应液置于分液漏斗中，依次加入0.5 mL水和2 mL乙酸乙酯，振荡5 min，静置10 min，收集乙酸乙酯层。重复上述液液萃取步骤，合并乙酸乙酯层，过滤，进行GC-MS检测。色谱柱（30 m×0.32 mm×0.25 μm），上样量1 μL，样品进样温度280 ℃，采用30∶1的分流比进行操作。选用氦气作为载气，流量控制在1.1 mL/min。炉箱温度程序如下：初始温度40 ℃，保持1 min，随后以10 ℃/min的升温速率升至250 ℃，并在该温度下保持5 min。质谱检测条件如下：采用EI源作为电离源，离子源温度维持在280 ℃，四极杆温度设定为150 ℃。溶剂延迟时间5 min，MS检测扫描范围为50~500 AMU，采样频率5 Hz。

1.3.8　MGO的分析

参考吴泰钢等[21]的方法，取1 mL反应液，加入1 mL的1 g/L邻苯二胺溶液，用0.1 mol/L NAOH溶液调节pH为9.0，定容至5 mL，60 ℃水浴反应4 h，进行HPLC检测。色谱柱为SHIMADZU-GL Inert ODS-SP（250 mm×4.6 mm×5 μm），流动相A为体积分数0.1%乙酸水溶液，流动相B为甲醇。梯度洗脱程序如下：0~35 min，流动相B体积分数35%~70%；35~40 min，流动相B体积分数70%~35%；40~50 min，流动相B体积分数5%。检测波长314 nm，流量0.7 mL/min，柱温40 ℃，进样量20 μL。

1.3.9　Phe的分析

同1.3.3游离氨基酸分析方法。

1.3.10　数据处理与分析

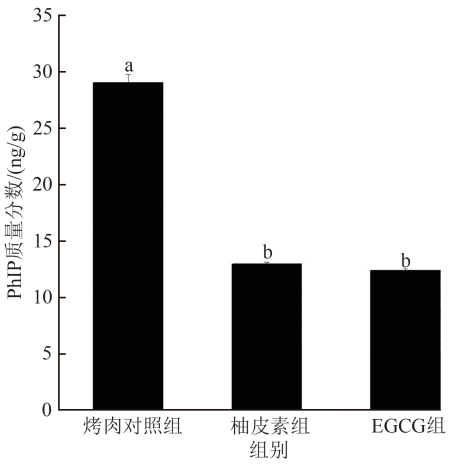
试验结果以平均值±标准偏差表示，采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析，多重比较采用Duncan法，$P<0.05$为差异显著。

2　结果与讨论

2.1　柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中PhIP质量分数的影响

图1显示，柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中PhIP的抑制率分别为（55.29±0.68）%和（57.29±1.37）%。秦川[8]研究发现，多种黄酮类化合物对烤牛肉中

的PhIP均具有明显抑制作用，其中染料木素、山柰酚和柚皮素的抑制效果较好（40%~60%），EGCG、槲皮素和根皮苷的抑制效果最佳（>60%）。Cheng等[22]研究表明，柚皮素和槲皮素对模拟体系中PhIP生成有明显抑制作用，其中柚皮素的抑制作用更强。Oguri等[23]发现EGCG和槲皮素对模拟体系中PhIP生成的抑制效果较好（>80%），而木犀草素的抑制效果一般（40%左右）。本研究结果显示，柚皮素和EGCG对PhIP的抑制效果无显著性差异，这与上述文献的结果一致，推测这可能是由于两者结构中均含有能够与苯乙醛反应的活性位点，如柚皮素的C-6和C-8位点以及EGCG的A环C-6或C-8位点，这些位点均能捕获活性羰基化合物[14-15]，从而有效抑制PhIP形成。



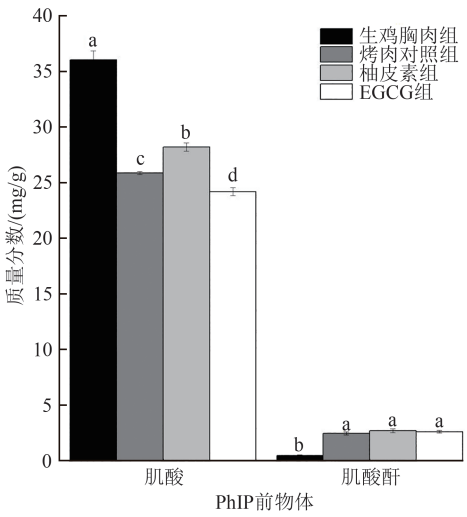
不同字母表示差异显著（P<0.05）。

图1 柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中PhIP质量分数的影响

Fig. 1 Effects of naringenin and EGCG on the PhIP mass fraction in roasted chicken breast

2.2 烤鸡胸肉中PhIP前体物质量分数的变化

柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中主要前体物如肌酸和肌酸酐质量分数的影响见图2。生鸡胸肉组的肌酸质量分数最高（36.04 mg/g），肌酸酐质量分数最低（0.46 mg/g）。烤制后，肌酸质量分数下降至25.86 mg/g，肌酸酐质量分数显著增加至2.48 mg/g，这可能是肌酸在烤制过程中通过分子内脱水环化形成了肌酸酐[24-25]。柚皮素和EGCG的添加显著影响烤鸡胸肉中肌酸和肌酸酐的质量分数。与烤肉对照组相比，柚皮素组的肌酸质量分数上升至28.21 mg/g，而EGCG组下降至24.19 mg/g，表明柚皮素在延缓肌酸的加热脱水环化方面优于EGCG。这可能是由于柚皮素在高温下的化学结构稳定性和抗氧化活性更强，能够更有效抵抗热分解，延缓肌酸向肌酸酐转化。然而，柚皮素和EGCG处理后的肌酸酐质量分数分别为2.69 mg/g和2.59 mg/g，与烤肉对照组无显著差异。这表明尽管它们可以在一定程度上影响肌酸转化，但在抑制肌酸酐形成方面效果并不显著，具体原因仍有待进一步探究。



相同PhIP前体物中不同字母表示差异显著（P<0.05）。

图2 柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中肌酸和肌酸酐质量分数的影响

Fig. 2 Effects of naringenin and EGCG on creatine and creatinine mass fraction in roasted chicken breast

生鸡胸肉和烤鸡胸肉中18种游离氨基酸质量分数见表1。生鸡胸肉中18种游离氨基酸的质量分数为4~400 μg/g，Trp和Arg质量分数最高，Cys质量分数最低。烤鸡胸肉中游离氨基酸的质量分数均显著降低，His降幅最大（84.58%），Cys降幅最小（41.08%）。这与高温下游离氨基酸自身降解（如脱羧基、脱氨基等）及其与还原糖发生美拉德反应有关。游离氨基酸与杂环胺形成的相关性比还原糖或肌酸酐与杂环胺形成的相关性更强[26]。柚皮素能够显著抑制鸡胸肉烤制过程中除Val、Ala和Cys外的游离氨基酸质量分数的降低，对Trp降低的抑制效果最好，降幅由原来的67.90%降至32.95%。然而，EGCG仅能够显著抑制Asp、Arg、Pro、Trp和His质量分数的降低。柚皮素和EGCG在抑制鸡胸肉烤制过程中游离氨基酸质量分数降低方面效果不同，这可能与它们的化学结构和抗氧化特性有关。这种差异可能源于它们在高温下对美拉德反应和氨基酸氧化降解的不同以及自由基清除能力的差异。游离氨基酸是杂环胺形成的重要前体物，

表1　柚皮素和EGCG对烤鸡胸肉中18种游离氨基酸质量分数变化的影响

Table 1　Effects of naringin and EGCG on mass fraction changes of 18 free amino acids in roasted chicken breast　单位：μg/g

氨基酸	生鸡胸肉组	烤肉对照组	柚皮素组	EGCG组
Asp	132.85±0.38^{a}	28.95±0.51^{d}	41.55±0.46^{b}	32.43±0.44^{c}
Glu	86.92±1.92^{a}	19.26±0.36^{c}	27.99±1.52^{b}	21.84±0.67^{c}
Ser	217.35±2.34^{a}	45.98±0.60^{c}	64.88±0.79^{b}	45.54±0.43^{c}
Arg	363.05±2.97^{a}	99.44±0.95^{d}	121.24±1.83^{b}	107.24±1.21^{c}
Gly	287.66±3.06^{a}	148.02±4.70^{c}	170.10±2.60^{b}	139.81±1.25^{d}
Thr	214.68±6.07^{a}	74.77±5.05^{c}	100.41±0.84^{b}	75.62±0.29^{c}
Pro	241.98±1.83^{a}	85.18±0.84^{d}	117.24±2.30^{b}	92.25±0.62^{c}
Ala	78.71±4.67^{a}	31.18±0.35^{bc}	38.65±0.99^{b}	27.22±0.29^{c}
Val	89.78±0.33^{a}	35.20±0.57^{b}	10.30±1.22^{c}	6.80±0.13^{d}
Met	75.71±0.40^{a}	22.97±0.30^{c}	30.10±0.28^{b}	23.12±0.32^{c}
Cys	4.43±0.08^{a}	2.61±0.09^{b}	2.82±0.23^{b}	2.32±0.19^{c}
Tle	208.80±1.77^{a}	60.46±1.09^{c}	93.78±2.29^{b}	66.13±0.85^{c}
Leu	145.14±0.99^{a}	37.99±0.51^{c}	52.95±2.02^{b}	38.85±0.41^{c}
Trp	389.98±3.81^{a}	125.17±2.42^{d}	261.50±4.64^{b}	199.84±3.87^{c}
Phe	172.56±1.11^{a}	50.58±0.28^{c}	64.66±0.50^{b}	46.75±0.41^{d}
His	112.36±2.24^{a}	17.32±0.92^{d}	30.31±0.26^{b}	24.45±0.84^{c}
Lys	21.81±0.43^{a}	5.96±0.36^{c}	7.27±0.05^{b}	5.09±0.33^{d}
Tyr	198.85±5.63^{a}	53.11±2.48^{c}	72.42±3.28^{b}	42.00±3.52^{d}

注：a~d表示不同处理组之间的游离氨基酸质量分数具有显著性差异（P<0.05）。

因此，柚皮素和EGCG均能通过有效减少鸡胸肉中游离氨基酸的消耗，从而抑制PhIP的生成。Phe是PhIP形成的关键前体物，其减少量与PhIP生成量密切相关。柚皮素可有效抑制鸡胸肉中Phe在烤制过程中的消耗，进而抑制PhIP生成。未来的研究需要进一步探索黄酮化合物在肉类加工中的具体作用机制，以优化其应用，改善肉制品的营养价值和感官品质。

2.3　柚皮素和EGCG对化学模型体系中PhIP形成的抑制机制

柚皮素和EGCG抑制PhIP生成的潜在作用机制见图3。首先，肌酸在加热条件下转化为肌酸酐；随后，Phe在加热条件下生成苯乙醛，此反应可由Glc降解产物MGO促进；最后，苯乙醛通过醛醇缩合反应与肌酸酐生成PhIP。柚皮素和EGCG通过干预上述反应的中间步骤来减少PhIP的形成，主要方式为：1）延缓肌酸向肌酸酐转化；2）与苯乙醛反应生成加合物，降低苯乙醛生成量；3）与MGO反应生成加合物，抑制苯乙醛形成。

2.3.1　柚皮素和EGCG对化学模型体系中PhIP形成的影响

肌酸与Phe是生成PhIP的重要前体物，Phe和肌酸加热后分别生成苯乙醛和肌酸酐，两者经醛醇缩合反应后脱水，再与Phe和肌酸酐反应生成PhIP[27]。如图4所示，在化学模型体系中，烤肉对照组的PhIP生成量为（65.69±2.38）μg/L，柚皮素组的PhIP生成量为（14.87±0.30）μg/L，EGCG组的PhIP生成量为（21.81±0.41）μg/L。柚皮素与EGCG对PhIP的生成均具有抑制作用，且柚皮素的效果更好，这可能与其能够与苯乙醛等杂环胺前体物形成复合物有关[14]。柚皮素的酚羟基和双键位点能与苯乙醛的醛基反应，减少其与氨基酸反应生成杂环胺的机会。相比之下，EGCG的作用机制可能主要依赖其抗氧化活性[15]，其与苯乙醛的结合效率不如与柚皮素的结合效率高。

2.3.2　柚皮素和EGCG对Phe-Glc模型反应体系生成苯乙醛的影响

如图5所示，Phe加热形成少量苯乙醛（0.11 mmol/L），当Glc终浓度为10 mmol/L时，苯乙醛的生成量增至1.50 mmol/L，说明Glc显著促进Phe生成苯乙醛。加入柚皮素处理后，随着柚皮素浓度的增加，苯乙醛的生成量先增大后减少。在柚皮素添加浓度为5 mmol/L时，苯乙醛生成量最大（1.78 mmol/L），促进率可达18.53%；在柚皮素添加浓度为10 mmol/L

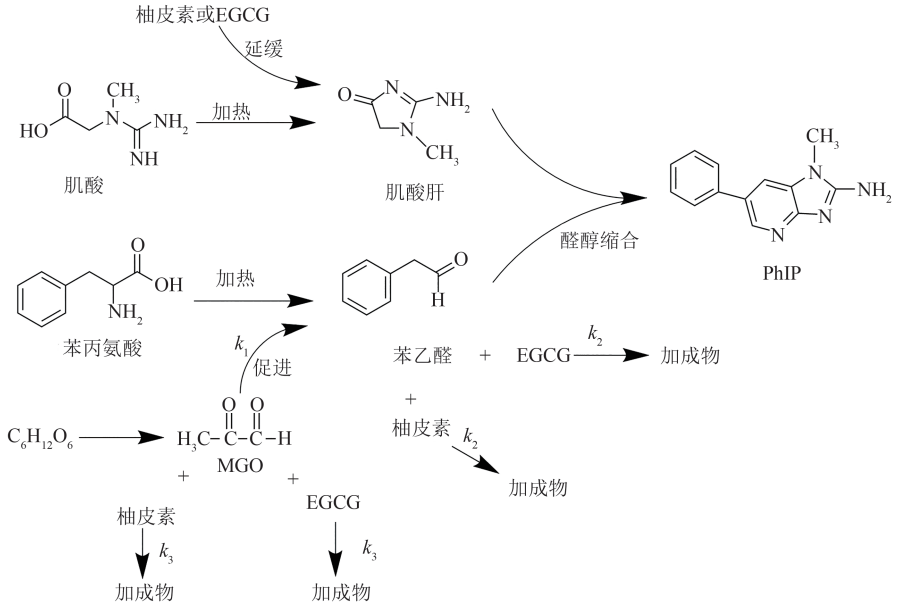
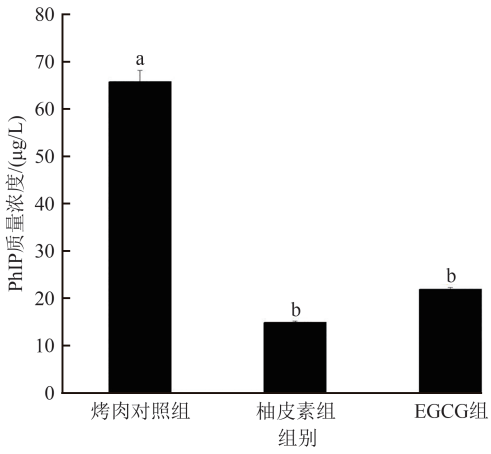


图 3 柚皮素和 EGCG 抑制 PhIP 生成的作用机制

Fig. 3 Inhibition mechanisms of naringenin and EGCG against PhIP formation



不同字母表示差异显著（P<0.05）。

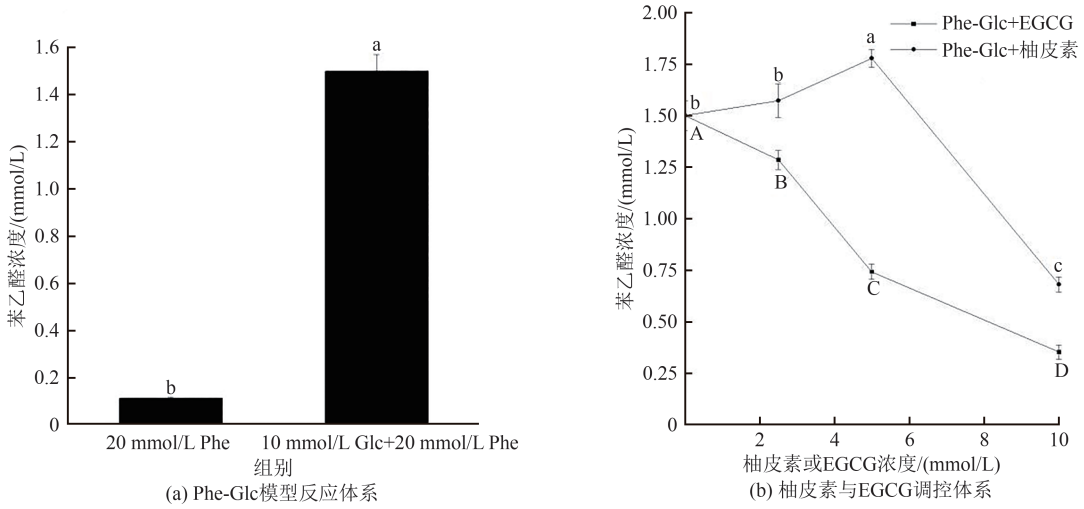
图 4 柚皮素和 EGCG 对化学模型体系中 PhIP 质量浓度的影响

Fig. 4 Effects of naringenin and EGCG on the PhIP mass concentration in chemical model systems

时，苯乙醛生成量最低，抑制率为 54.67%。加入 EGCG 处理后，随着 EGCG 浓度的增加，苯乙醛的生成量不断减少，在 EGCG 浓度为 10 mmol/L 时，抑制率为 76.47%。这些结果说明，柚皮素和 EGCG 可以通过抑制苯乙醛的生成进而抑制 PhIP 的生成。Oguri 等[23]研究也发现，EGCG 对化学模型体系中 PhIP 生成的抑制效果优于其他抗氧化剂，抑制率可达 80%。多酚抑制杂环胺前体物苯乙醛的生成主要依靠 2 种途径：一是与苯乙醛发生反应形成稳定的加合物，阻断其与肌酸酐反应生成杂环胺[24]；二是通过清除反应过程中的活性羰基化合物（如苯乙醛）来抑制杂环胺的形成。EGCG 抑制杂环胺前体物苯乙醛的生成效果优于柚皮素，这可能与其化学结构中的关键活性基团，如 A 环的间位二羟基、B 环 C-4’位的羟基以及 C 环上 C-4 位的共轭羰基结构密切相关[15]。

2.3.3 柚皮素和 EGCG 对 Phe-MGO 模型反应体系生成苯乙醛的影响

如图 6 所示，Phe 加热形成少量苯乙醛，当 MGO 终浓度为 40 mmol/L 时，苯乙醛的生成量为 3.41 mmol/L，增加了 30 倍。因此，MGO 对 Phe 形成苯乙醛有明显促进作用，可代替 Glc 建立反应体系。随着 EGCG 浓度的增加，苯乙醛的生成量逐渐降低最后趋于平缓。在 EGCG 浓度为 10 mmol/L 时，苯乙醛的生成量降低了 55.80%。相比之下，随着柚皮素浓度的增加，苯乙醛的生成量呈现先降低后微增的趋势。在柚皮素为 10 mmol/L 时，苯乙醛的生成量最低，抑制率为 53.46%。这可能是由于在低浓度时，柚皮素的抗氧化能力不足以完全清除活性羰基化合物，导致苯乙醛生成量短暂增加。随着柚皮素浓度的增加，其抗氧化效果显现，减少了苯乙醛的生成。但在高浓度下，由于饱和效应以及与其他反应物的复杂相互作用，使得柚皮素的抑制效果减弱，导致苯乙醛生成量回升。上述结果显示，EGCG 抑制苯乙醛生成的效果优于柚皮素，在 15 mmol/L 时尤为显著，其良好的自由基清除能力

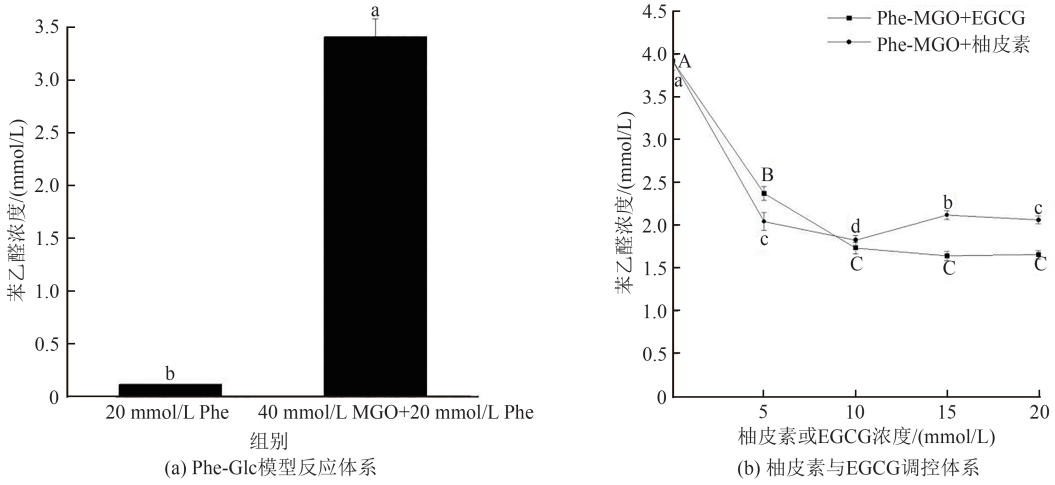


(a) Phe-Glc模型反应体系　(b) 柚皮素与EGCG调控体系

同一体系不同字母表示差异显著（P<0.05）。

图5　柚皮素和EGCG对Phe-Glc模型反应体系生成苯乙醛的影响

Fig. 5　Effects of naringenin and EGCG on phenylacetaldehyde formation in the phenylalanine-glucose (Phe-Glc) model reaction system



(a) Phe-Glc模型反应体系　(b) 柚皮素与EGCG调控体系

同一体系不同字母表示差异显著（P<0.05）。

图6　柚皮素和EGCG对Phe-MGO模型反应体系生成苯乙醛的影响。

Fig. 6　Effects of naringenin and EGCG on phenylacetaldehyde formation in the phenylalanine-methylglyoxal (Phe-MGO) model reaction system

以及与苯乙醛形成加合物的能力，使其能更有效阻断苯乙醛生成，进而抑制PhIP的形成。

2.4　反应动力学曲线

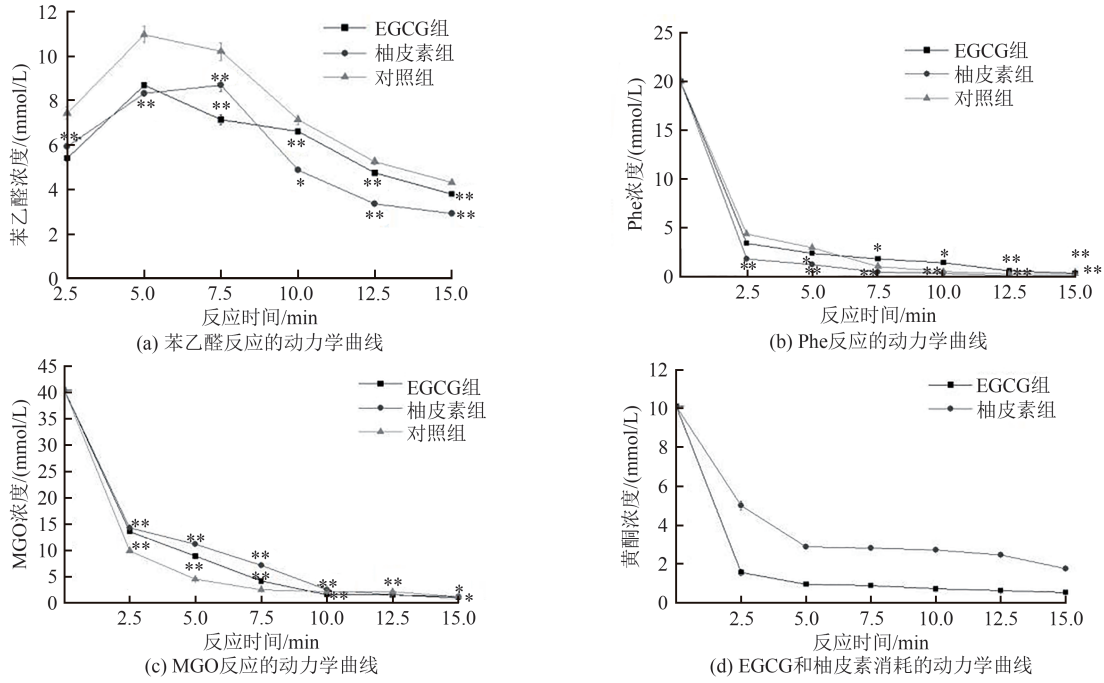
柚皮素和EGCG对Phe-MGO模型反应体系中的苯乙醛形成影响的动力学曲线见图7(a)。苯乙醛的生成量呈现先升高后降低的趋势，在前5.0 min急剧升高，这可能是由于Phe和MGO初始浓度较高，促使反应速率迅速加快。对照组和EGCG组在5.0 min时苯乙醛浓度最高，分别为10.98 mmol/L和8.70 mmol/L；柚皮素组在7.5 min时苯乙醛浓度最高，为8.71 mmol/L。随后，3组中苯乙醛浓度均开始降低，推测这可能是由于苯乙醛发生降解或参与其他化学反应。EGCG组和柚皮素组中苯乙醛的生成量都低于对照组，5.0 min时的抑制率分别为20.77%和24.04%。

模型反应体系中Phe的反应动力学曲线见图7(b)。Phe初始浓度为20 mmol/L，2.5 min内Phe的浓度急剧下降，随后下降速度变缓。这一变化趋势表明在反应初期Phe迅速转化为苯乙醛，随着反应的进行，转化速率减缓。在2.5 min时，对照

组 Phe 浓度高于 EGCG 组和柚皮素组；在 15.0 min 时，3 组的 Phe 浓度基本相同。由此可知，EGCG 和柚皮素在反应初期能够快速捕获苯乙醛，从而有效抑制 PhIP 的形成。

模型反应体系中 MGO 的反应动力学曲线见图 7（c）。随着反应时间的延长，MGO 浓度先急剧下降，然后缓慢下降，最后趋于平缓。在反应初期，MGO 作为反应的促进剂，加速了 Phe 向苯乙醛的转化，导致其快速消耗。在前 7.5 min，对照组中 MGO 的浓度低于 EGCG 组和柚皮素组，说明 EGCG 和柚皮素能够通过改变反应路径抑制 MGO 与 Phe 的反应，减缓 MGO 的消耗速度，从而抑制了苯乙醛的形成。

模型反应体系中 EGCG 和柚皮素消耗的动力学曲线见图 7（d）。随着反应时间的延长，EGCG 和柚皮素的浓度先急剧下降，然后缓慢下降并趋于稳定。反应过程中柚皮素的浓度始终高于 EGCG，这可能与 EGCG 和柚皮素的热稳定性有关，EGCG 分子结构中含有 6 个邻位酚羟基[25]，比柚皮素具有更多的活性部位/基团，在高温加热条件下更容易发生反应或者降解。同时，由于 EGCG 与苯乙醛更容易反应，从而降低体系中 PhIP 前体物游离苯乙醛的浓度，进一步减少 PhIP 的生成。



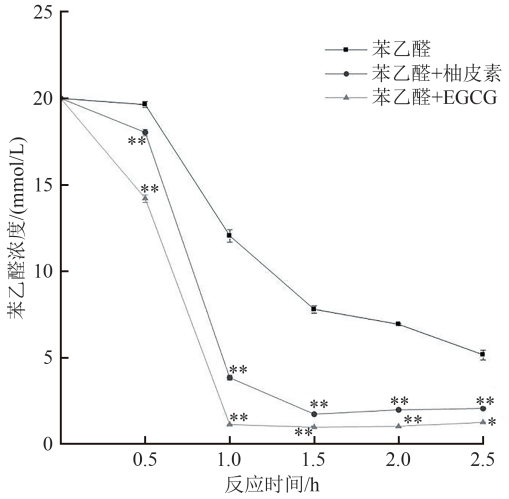
*—试验组各点和对照组数据之间差异显著（$P<0.05$）；**—试验组各点和对照组之间数据差异极显著（$P<0.01$）。

图 7　柚皮素和 EGCG 对 Phe-MGO 模型反应体系中各关键物质反应动力学曲线的影响

Fig. 7　Effects of naringenin and EGCG on the reaction kinetics curves of key substances in the Phe-MGO model reaction system

柚皮素和 EGCG 对苯乙醛模型反应体系中苯乙醛的动力学曲线见图 8。随着反应时间的延长，在 0.5 h 内对照组中苯乙醛浓度无明显变化，柚皮素组和 EGCG 的组中苯乙醛浓度下降速度较快，表明它们能有效抑制苯乙醛的生成。0.5 h 之后，3 组样品的苯乙醛浓度均急剧下降，随后下降速度减缓并在 1.5 h 后趋于平稳。柚皮素组和 EGCG 组的苯乙醛浓度明显低于对照组，其中 EGCG 处理组在 1.0 h 后达到最低，其对苯乙醛的消除作用大于柚皮素，阻断了进一步的反应，证实了这 2 种物质能够通过降低前体物质苯乙醛的浓度来减少 PhIP 的生成。

模型反应体系的反应动力学曲线表明，EGCG 与柚皮素比肌酸酐更易与苯乙醛缩合，从而减少了苯乙醛与肌酸酐的醇醛反应，最终抑制 PhIP 的生成。柚皮素与苯乙醛加合会形成 8-*C*-（*E*-phenylethenyl）naringenin 与 6-*C*-（*E*-phenylethenyl）naringenin 这 2 种物质[28]，EGCG 的 C-6 和 C-8 位点可以与苯乙醛形成加合产物[28]，两者均可通过降低苯乙醛浓度来降低 PhIP 的生成。Quelhas 等[29]发现，富含 EGCG 的绿茶提取液对煎炸牛肉饼中的 PhIP 有良好的抑制作用，最高可达 70%。综上，



*—试验组各点和苯乙醛组之间数据差异显著（P<0.05）；**—试验组各点和苯乙醛组之间数据差异极显著（P<0.01）。

图8　柚皮素和EGCG对苯乙醛模型反应体系中苯乙醛反应动力学曲线的影响

Fig. 8　Effects of naringenin and EGCG on the kinetics curves of phenylacetaldehyde reaction in the phenylacetaldehyde model reaction system

EGCG比柚皮素含有更多酚羟基，对苯乙醛有更强的加合能力[30]，从而可以降低食品体系中苯乙醛浓度，抑制PhIP的生成，且抑制效果优于柚皮素。

2.5　反应动力学模型参数的计算和分析

通过模型反应体系中Phe、MGO、黄酮（柚皮素和EGCG）和苯乙醛浓度的变化计算反应动力学模型参数，结果见表2。k_3的绝对值在3个参数中是最大的，由此可知模型反应体系中苯乙醛和黄酮之间的反应速率最大，对整个反应体系的影响最大。而黄酮与MGO之间的反应速率最小，EGCG和柚皮素抑制PhIP生成的机制在于它们能够抑制PhIP中间产物——苯乙醛的形成，进而阻止PhIP的形成。Cheng[22]研究结果表明，在模型体系中黄酮和苯乙醛能形成加合物，从而抑制PhIP的形成。

表2　反应动力学模型参数

Table 2　Reaction kinetics model parameters

组别	动力学模型参数		
	k_1	k_2	k_3
对照组	−0.312 7±0.000 6^{c}		
EGCG组	−0.331 5±0.001 4^{b}	0.062 7±0.000 8^{a}	−0.404 3±0.001 8^{a}
柚皮素组	−0.364 2±0.000 8^{a}	0.102 5±0.000 2^{b}	−0.370 2±0.001 4^{b}

注：同列不同字母表示差异显著（P<0.05）。

3　结论

作者通过建立模型反应体系，验证了MGO代替Glc作为促进PhIP前体物转化的可行性，通过研究反应前体物变化和建立机理反应动力学曲线，深入探讨了柚皮素和EGCG对PhIP生成的抑制作用。研究表明，柚皮素和EGCG不仅能有效延缓肌酸的加热脱水环化，还能通过抑制MGO诱导的Phe向苯乙醛转化，有效降低反应体系中苯乙醛的生成量，最终实现对PhIP的抑制作用。其中，EGCG和柚皮素对苯乙醛的消除作用是它们抑制PhIP生成的关键机制。这些发现不仅为杂环胺的控制提供了新的视角，也为未来在肉制品加工中应用这些天然抑制剂提供了科学依据。未来的研究将进一步探索黄酮类化合物与其他天然化合物在食品体系中对PhIP生成的协同抑制效果及作用机制，同时利用食品组学和生物技术等先进手段，深化对食品成分相互作用的理解，推动食品工业向更安全、更健康的方向发展。

参考文献

[1] OHGAKI H, HASEGAWA H, KATO T, et al. Carcinogenicity in mice and rats of heterocyclic amines in cooked foods[J]. Environmental Health Perspectives, 1986, 67: 129-134.

[2] PAIS P, SALMON C P, KNIZE M G, et al. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(3): 1098-1108.

[3] 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 M M, WANG J H, CHEN J, 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. (in Chinese)

[4] DOMINGO J L, NADAL M. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: a review of scientific news since the IARC decision[J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 105: 256-261.

[5] WILLETT W C. Diet and cancer: an evolving picture[J]. JAMA, 2005, 293(2): 233-234.

[6] ZHAO Z W, YIN Z F, PU Z S, et al. Association between consumption of red and processed meat and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2017, 15(4): 486-493.

[7] PUANGSOMBAT K, GADGIL P, HOUSER T A, et al.

Heterocyclic amine content in commercial ready to eat meat products[J]. Meat Science,2011,88(2):227-233.
[8] 秦川. 膳食类黄酮抑制烤牛肉饼中杂环胺PhIP的形成作用研究[D]. 无锡:江南大学,2014.
[9] FELTON J S, KNIZE M G, HATCH F T, et al. Heterocyclic amine formation and the impact of structure on their mutagenicity[J]. Cancer Letters,1999,143(2):127-134.
[10] ZÖCHLING S, MURKOVIC M. Formation of the heterocyclic aromatic amine PhIP: identification of precursors and intermediates[J]. Food Chemistry,2002,79(1):125-134.
[11] MURKOVIC M. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems[J]. Journal of Chromatography B,2004,802(1):3-10.
[12] 赵磊,张会敏,李煜彬,等. 15种黄酮类化合物对烤鸡胸肉中杂环胺含量的影响[J]. 食品科学,2019,40(23):19-25.
ZHAO L,ZHANG H M,LI Y B,et al. Effects of fifteen flavonoids on the contents of heterocyclic amines in roast chicken breast[J]. Food Science,2019,40(23):19-25.(in Chinese)
[13] CHENG K W,WONG C C,CHO C K,et al. Trapping of phenylacetaldehyde as a key mechanism responsible for naringenin's inhibitory activity in mutagenic 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine formation[J]. Chemical Research in Toxicology,2008,21(10):2026-2034.
[14] CHENG K W,WONG C C,CHAO J F,et al. Inhibition of mutagenic PhIP formation by epigallocatechin gallate *via* scavenging of phenylacetaldehyde [J]. Molecular Nutrition & Food Research,2009,53(6):716-725.
[15] HAN Z H,LIU B,NIU Z Y,et al. Role of α-dicarbonyl compounds in the inhibition effect of reducing sugars on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2017,65(46):10084-10092.
[16] ZHAO L,PAN F,LI Y B,et al. Structure characteristics of flavonoids for heterocyclic aromatic amines inhibition using quantitative structure-activity relationship modeling [J]. Journal of Food Biochemistry,2020,44(9):e13390.
[17] 唐涛. 氨基酸柱前衍生化HPLC方法发展及应用[D]. 南京:南京理工大学,2006.
[18] 张燕婉,龙村,丁陆陆. 高效液相色谱法测定肌肉组织中的磷酸肌酸[J]. 色谱,2001,19(3):251-252.
ZHANG Y W,LONG C,DING L L. Determination of phosphocreatine in muscular tissues by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography,2001,19(3):251-252.(in Chinese)
[19] 黎晓维,姜静,祝贺,等. 反相高效液相色谱法同时测定肌酸,肌酸酐及肌酸乙酯盐酸盐[J]. 分析试验室,2007,26(6):69-72.
LI X W, JIANG J, ZHU H, et al. Simultaneous determination of creatine, creatinine and creatine ethyl ester hydrochloride by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory,2007,26(6):69-72.(in Chinese)
[20] KNOL J J,VAN LOON W A M,LINSSEN J P H,et al. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2005,53(15):6133-6139.
[21] 吴泰钢,黄才欢,白卫滨,等. 反相-高效液相色谱法同时检测食品中4种α-二羰基化合物[J]. 食品工业科技,2015,36(6):58-61,65.
WU T G,HUANG C H,BAI W B,et al. Simultaneous determination of four α-dicarbonyls in food by RP-HPLC-DAD [J]. Science and Technology of Food Industry,2015,36(6):58-61,65.(in Chinese)
[22] CHENG K. Preventive potential and mechanism of dietary phenolics on the formation of mutagenic heterocyclic amines[D]. Hong Kong:Hong Kong University,2009.
[23] OGURI A, SUDA M, TOTSUKA Y, et al. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines [J]. Mutation Research,1998,402(1/2):237-245.
[24] 鄢嫣. 烤肉中杂环胺的形成规律的研究[D]. 无锡:江南大学,2015.
[25] UÇAR K, GÖKTAŞ Z. Biological activities of naringenin: a narrative review based on *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Nutrition Research,2023,119:43-55.
[26] 程轶群. 烧鸡加工杂环胺形成关键工序及减控机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2020.
[27] WANG Q,CHENG W W,ZHANG Y F,et al. A novel potent inhibitor of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) formation from Chinese chive: Identification, inhibitory effect and action mechanism[J]. Food Chemistry,2021,345:128753.
[28] SALAZAR R,ARÁMBULA-VILLA G,HIDALGO F J,et al. Structural characteristics that determine the inhibitory role of phenolic compounds on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) formation[J]. Food Chemistry,2014,151:480-486.
[29] QUELHAS I,PETISCA C,VIEGAS O,et al. Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef[J]. Food Chemistry,2010,122(1):98-104.
[30] 薛桂中,乔明武,黄现青,等. 烧烤肉制品加工中多环芳烃和杂环胺形成途径及其防控方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2022,48(2):293-301.
XUE G Z,QIAO M W,HUANG X Q,et al. Progress of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic amines generation and preventions in grilled meat[J]. Food and Fermentation Industries,2022,48(2):293-301.(in Chinese)

(责任编辑:李春丽)