

精氨酸—还原糖体系中1,2-二羰基化合物的形成和抑制研究

Study on the formation and elimination mechanism of 1,2-dicarbonyl compounds in arginine-reducing sugar system

卢永翎 肖留榜 夏秋琴 吕丽爽

LU Yong-ling XIAO Liu-bang XIA Qiu-qin LU Li-shuang

(南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

(Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097, China)

摘要:建立精氨酸—还原糖体系,考察影响该体系中1,2-二羰基化合物形成的因素,并探究形成过程中反应物与产物变化的动力学以及抑制剂染料木黄酮抑制1,2-二羰基化合物的动力学。对建立的精氨酸—还原糖模拟体系,采用气相色谱法评价温度、还原糖种类、pH和抑制剂染料木黄酮等各种因素对1,2-二羰基化合物形成的影响,并分析其变化规律,进而分析了反应体系中染料木黄酮介入前后反应物精氨酸、葡萄糖及产物1,2-二羰基化合物的含量变化规律。结果显示:影响1,2-二羰基化合物形成的最主要因素是时间;该体系中精氨酸和葡萄糖的浓度随着反应时间的延长而降低,且随着温度升高快速下降;1,2-二羰基化合物含量随着温度的升高和反应时间的延长而不断升高。时间和温度对丙酮醛(MGO)和乙二醛(GO)的产生有一定的影响,染料木黄酮通过降低反应体系中1,2-二羰基化合物的反应速率常数而抑制其产生。当染料木黄酮的添加量为50 mmol/L时,对1,2-二羰基化合物的抑制率最高,均>50%。LC-MS证实染料木黄酮在氨基酸体系中抑制1,2-二羰基化合物的机制是通过捕获MGO形成染料木黄酮-MGO加合产物,从而达到消除效果。

关键词:精氨酸—还原糖模拟体系;1,2-二羰基化合物;影响因素;抑制机制

Abstract: Purpose: it was planned to establish an arginine-reducing sugar system and investigate the factors affecting the formation of 1,2-dicarbonyl compounds in the system, then explore the dynamics of reactants, products. With genistein as an inhibitor, 1,2-dicarbonyl

compounds were inhibited in the reaction process. Methods: In arginine-reducing sugar system, using gas chromatography to evaluate temperature, the type of reducing sugar, pH and genistein effects on the 1,2-dicarbonyl compounds formation, the change regularity was analyzed. The analysis of genistein before and after decreased the arginine, glucose, and product 1,2-dicarbonyl compounds content, and the kinetics in this process was studied. Results: Time was the most important factors affecting the formation of 1,2-dicarbonyl compounds, and the dynamics data showed that arginine and glucose concentration was decreased with the extension of reaction time. 1,2-dicarbonyl compounds content increased with the temperature rising and reaction time extending in the system. Conclusion: Time and temperature had a certain impact on the 1,2-dicarbonyl compound and genistein, by lowering the reaction rate of 1,2-dicarbonyl compounds. When genistein amount reached 50 mmol/L, the highest inhibition rate, more than 50%, was detected in the 1,2-dicarbonyl compound. The LC-MS analyses confirmed that the mechanism of the inhibition of 1,2-dicarbonyl compounds in the amino acid system of the genistein was achieved by capturing MGO to form the genistein-MGO adduct, thereby achieving the elimination effect.

Keywords: Arginine-reducing sugar simulation system; 1,2-dicarbonyl compounds; influencing factor; inhibition mechanism

1,2-二羰基化合物,如丙酮醛(methylglyoxal, MGO)和乙二醛(glyoxal, GO),是糖基化反应过程中非酶褐变和蛋白质交联产生的活性中间产物。MGO和GO是食品加热(如蒸煮、油炸和焙烤等)和贮藏过程中形成的产物, MGO和GO不仅是颜色和芳香物质的重要前体物质,而且还会导致蛋白结构改变从而令食品营养品质的下降。研究表明,1,2-二羰基化合物可促使蛋白质发生交联反应,破坏蛋白质的结构和功能,抑制绒毛、腺体及上皮细胞中的蛋白质、DNA和

基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(编号:31571783)

作者简介:卢永翎,女,南京师范大学实验师,硕士。

通信作者:吕丽爽(1969—),女,南京师范大学教授,博士。

E-mail: lishuanglv@126.com

收稿日期:2018-04-29

RNA的合成,还可以引发人的糖尿病、阿茨海默症等症状^[1-4],因此,已经成为当前食品安全研究的热点^[5-7]。由此,寻求抑制1,2-二羰基化合物、控制蛋白糖基化反应成为亟需解决的问题。

国内外已有相关文献,如章宇^{[8]87-112}在研究食品中丙烯酰胺的形成过程时,运用天冬酰胺-葡萄糖模型来模拟食品中丙烯酰胺的形成过程,为模拟食品加工条件提供了参考依据;Sara等^[9]研究甘氨酸-葡萄糖模型在pH 6.8的条件下产生中间产物MGO、1-deoxy-2,3-hexodiulose和3-deoxy-2-hexosulose以及有机酸形成的动力学路径;Paul等^[10]在pH 7.4、37℃的生理条件下研究胍基与活性羰基化合物MGO、GO和3-DG反应的动力学及其机制;付全意^[11]通过阿伦尼乌斯方程研究Lys-葡萄糖模拟体系中羧甲基赖氨酸的形成动力学,并计算了该动力学下的各种参数和反应活化能。这些反应动力学的研究报道均为研究精氨酸(Arg)-葡萄糖模型产生MGO和GO的动力学提供了理论依据。

目前尚未有文献报道在高温条件下Arg-葡萄糖体系中MGO、GO产生及消除的变化过程,因此本研究将模拟食品高温加工条件,建立Arg-还原糖模型,通过对比还原糖种类、温度、时间、pH和抑制剂染料木黄酮等因素对体系中MGO和GO产生量的影响,确定主要影响因素;进而在不同的反应温度条件下添加染料木黄酮考察MGO和GO形成的动力学规律,探讨其对该体系中MGO和GO的抑制过程;计算相应动力学参数,分析在染料木黄酮介入前后的变化及其消除1,2-二羰基化合物的机制。本研究旨在为研究食品高温加工过程中发生的美拉德反应、体系中MGO和GO的形成过程,以及天然黄酮抑制MGO和GO的机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

精氨酸:分析纯,上海生物生工有限公司;

染料木黄酮:98%、HPLC级,南京广润生物试剂有限公司;

丙酮醛(40%水溶液)、乙二醛(40%水溶液)、邻苯二胺(DB):分析纯,美国Sigma-Aldrich公司;

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、2,3-丁二酮、葡萄糖:分析纯,上海国药化学试剂有限公司;

甲醇:色谱纯,上海国药集团化学试剂有限公司;

吡啶(99.5%)、六甲基硅烷(98%)、三甲基氯硅烷(99%):分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

乙酸乙酯:分析纯,南京化学试剂有限公司;

纯净水:杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 仪器与设备

液相色谱-质谱联用仪:Agilent Technologies 1290/6460 Triple Quad LC/MS、DAD G4212A型,美国安捷伦公司;

气相色谱系统:7820型,美国安捷伦公司;

高效液相色谱系统:20 AT型,美国安捷伦公司;

数显恒温水浴锅:HH-6型,金坛市富华仪器有限公司;

数显恒温油浴锅:HH-S型,金坛市富华仪器有限公司;

电子分析天平:FA2104N型,上海精密科学仪器有限公司;

数字式pH计:PHS-3C型,上海三信仪表厂;

超声波清洗器:KQ-300B型,昆山市超声仪器有限公司;

氮气吹干仪:HGC-12A型,上海乔跃电子科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MGO和GO含量分析 采用气相色谱法^[12],以DB为衍生化试剂,程序升温条件:初始柱温40℃保持1min,升温第一阶段4℃/min升至140℃保持1min,第二阶段50℃/min升至250℃保持1min;载气流量:H₂流量30mL/min,空气流量300mL/min,N₂流量25mL/min。

1.3.2 MGO和GO形成的单因素设计 MGO和GO的制备参考文献[13],其中还原糖及精氨酸的终浓度均为60mmol/L。

(1) 还原糖种类:在pH 7.4,反应温度121℃,未添加抑制剂的条件下,分别在0,5,15,30,60min考察不同种类还原糖(葡萄糖、果糖、核糖、半乳糖)对MGO和GO形成的影响。

(2) pH:在还原糖为葡萄糖,反应温度121℃,未添加抑制剂的条件下,分别在0,5,15,30,60min考察不同pH(6.5,7.4,9.2)对MGO和GO形成的影响。

(3) 温度:在还原糖为葡萄糖,pH 7.4,未添加抑制剂的条件下,分别在0,5,15,30,60min考察不同温度(100,121,135,150,180℃)对MGO和GO形成的影响。

(4) 抑制剂染料木黄酮:在还原糖为葡萄糖,pH 7.4,反应温度121℃的条件下,分别在0,5,15,30,60min考察抑制剂染料木黄酮(60mmol/L)对MGO和GO形成的影响。

抑制率按式(1)计算:

$$C = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C——抑制率,%;

W₁——对照组GO/MGO含量,mmol/L;

W₂——试验组GO/MGO含量,mmol/L。

1.3.3 Arg-葡萄糖模拟体系中MGO和GO形成的动力学模型研究

(1) 样品制备:在pH 7.4条件下,将终浓度均为60mmol/L精氨酸和葡萄糖混合液于100,121,135,150,180℃油浴中加热0,5,10,15,20,30,40,60min后分别取样于样品管中,于-20℃保存^{[8]115-118[14]}。

(2) 体系中反应物葡萄糖含量测定:采用三甲基氯硅烷衍生化,气相色谱方法^[15]测定葡萄糖含量。色谱柱HP-5(30m×0.32mm id,0.25μm);进样温度250℃,压力68947.57Pa,不分流;初始柱温100℃保持5min,程序升温第一阶段5℃/min升至150℃保持5min,第二阶段5℃/min升至240℃保持2min;FID检测器温度280℃。

载气流量: H_2 流量 30 mL/min, 空气流量 300 mL/min, N_2 流量 25 mL/min。

(3) 体系中反应物 Arg 含量测定: 使用 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)液相色谱法^[16]测定 Arg 含量, 流动相: 醋酸钠缓冲溶液-乙腈(75:15)。

(4) 体系中中间产物 MGO 和 GO 含量测定: 同 1.3.1。

(5) MGO/GO 形成的动力学模型参数计算: 阿伦尼乌斯速率常数公式(arrhenius equation for the rate constant)是用来表征温度对反应速率常数影响的关系式, 能反映反应速率对温度的依赖关系。从平衡常数与温度的关系以及平衡常数与反应速率常数的关系, 推断反应速率常数 k 与温度 T 的关系的指数形式为:

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}, \quad (2)$$

式中:

k ——反应速率常数;

A ——指数前因子或频率因子;

E_a ——活化能, kJ/mol;

R ——摩尔气体常数, 8.314/(mol·K);

T ——开尔文温度, K。

将式(2)积分可得:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A. \quad (3)$$

由此可知, $\ln k$ 与 E_a 为直线关系, 通过试验数据测得的反应速率常数 k , 对 k 取对数为 $\ln k$; $\ln k$ 对温度的倒数作图, 斜率为 $\frac{E_a}{R}$, 由此可以求得反应的活化能 E_a 。因此, 相应的动力学方程为:

$$\frac{dc(\text{MGO})}{dt} = k_1 \times c(\text{Arg}) \times c(\text{Glu}), \quad (4)$$

$$\frac{dc(\text{GO})}{dt} = k_2 \times c(\text{Arg}) \times c(\text{Glu}), \quad (5)$$

式中:

t ——反应时间, s;

$c(\text{Arg})$ ——Arg 的浓度, mmol/L;

$c(\text{Glu})$ ——葡萄糖的浓度, mmol/L;

$c(\text{MGO})$ ——MGO 的浓度, mmol/L;

$c(\text{GO})$ ——GO 的浓度, mmol/L;

k_1 ——葡萄糖在 Arg 作用下生成 MGO 的反应速率常数;

k_2 ——葡萄糖在 Arg 作用下生成 GO 的反应速率常数。

当 $t = 0$ 时, Arg 和葡萄糖的浓度为 60 mmol/L; $c(\text{MGO})$ 和 $c(\text{GO})$ 为 0 mmol/L。

1.3.4 染料木黄酮抑制 Arg-葡萄糖模拟体系 MGO 和 GO 形成的动力学研究

(1) 染料木黄酮抑制 MGO 和 GO 的量效关系: 在 pH 7.4, 终浓度均为 60 mmol/L 精氨酸和葡萄糖混合液中, 添加不同浓度染料木黄酮(0.005, 0.050, 0.500, 5.000, 50.000 mmol/L), 180 °C 反应 20 min, 根据 1.3.1 检测样品中的 MGO、GO 含量, 计算抑制率^{[8]115-116}。

(2) 染料木黄酮抑制 MGO 和 GO 的动力学研究: 在

pH 7.4, 终浓度均为 60 mmol/L 精氨酸和葡萄糖混合液中, 添加 50 mmol/L 染料木黄酮, 分别反应 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 min, 根据 1.3.1 检测样品中的 MGO、GO 含量, 计算抑制率^{[8]117-118}。

(3) 染料木黄酮抑制 MGO/GO 形成动力学模型的构建: 同 1.3.3(5)。

1.3.5 染料木黄酮消除 Arg-葡萄糖模拟体系中 1,2-二羰基化合物形成的机制研究

(1) 样品的制备: 将 1.3.4(2) 项下反应 5 min 的样品取出后解冻, 取 1 mL 于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 乙酸乙酯涡旋 10 min, 4 086 × g 离心 10 min 取出上清液, 萃取 2 次。浓缩至干, 用 70% 的甲醇复溶, 备用。

(2) 液相色谱条件: 色谱柱 kromasil 100-5 C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 260 nm, 流动相甲醇-水(60:40), 流速 0.6 mL/min, 进样量 10 μL , 柱温 30 °C。

(3) 质谱条件: 电喷雾负离子化(ESI⁻)检测, 扫描范围为 m/z 100 ~ 1 000; 喷雾电压 4 000 V, 雾化压力 310 264.07 Pa, 辅助气压 34 473.79 Pa, 毛细管温度 280 °C, 裂解电压 135 V。

1.3.6 统计分析方法 采用 Excel 2013 软件和 Minitab 16 软件统计分析数据。所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 Arg-还原糖模拟体系生成 MGO 和 GO 的影响因素分析

运用气相色谱法同时测定 Arg-还原糖体系中产生的中间产物 MGO 和 GO 的量, 通过色谱峰分别计算 MGO、GO 和丁二酮(内标)的峰面积之比, 代入标准曲线(MGO: $y = 1.4545x + 0.1311$, $R^2 = 0.9961$; GO: $y = 1.1877x + 0.1571$, $R^2 = 0.9971$)计算 MGO 和 GO 的含量。

2.1.1 糖种类对 Arg-还原糖体系 MGO 和 GO 生成的影响

由图 1 可知, 在 Arg-还原糖模拟体系中, 除核糖和半乳糖体系外, 均在反应 60 min 时 MGO 和 GO 浓度达到最高值, 且不同还原糖体系中 GO 的含量随着时间的延长而不断增加。而在核糖和半乳糖体系中 MGO 含量在反应 30 min 时达到最高值, 后有小幅下降; 而其他还原糖 MGO 产生

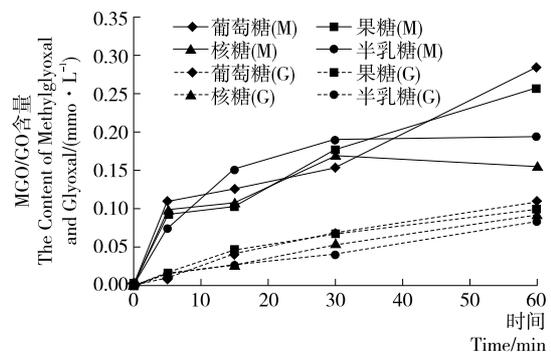


图 1 Arg-还原糖模型中还原糖对体系 MGO 和 GO 生成的影响

Figure 1 Effect of reducing sugar on the formation of MGO and GO content in Arg-reducing sugar models

量随着时间的延长持续增高。对比 MGO 和 GO 产生量可知, MGO 的量高于 GO 的, 且约为 GO 量的 3 倍。

2.1.2 pH 值对 Arg-葡萄糖体系 MGO 和 GO 生成的影响

由图 2 可知, 首先, MGO 和 GO 的生成量均在 pH 为 9.2 最高, 其次为 pH 7.4, 而 pH 6.5 时 MGO 和 GO 的量很少。由此可以看出 MGO 和 GO 更容易在碱性条件下产生。此外, Weenen 等^[17]研究也表明 MGO 是由脱氧葡萄糖醛酮通过逆醇醛缩合作用裂解产生, 而在 pH>7 时逆醇醛缩合和裂解作用加强^[18], 有利于形成 MGO, 因此在碱性条件下含量增加明显。

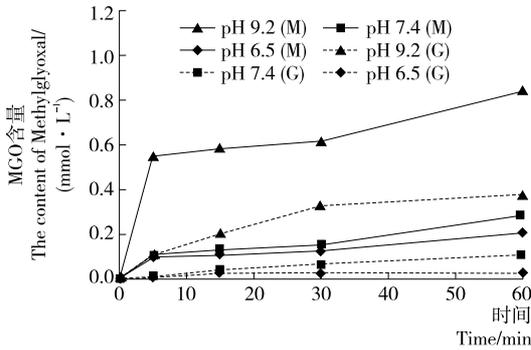


图 2 pH 对 Arg-葡萄糖模型体系 MGO 和 GO 生成的影响
Figure 2 Effect of pH on the formation of MGO and GO concentrations in Arg-glucose model

2.1.3 染料木黄酮抑制 Arg-葡萄糖体系 MGO 和 GO 生成的能力 由图 3 可知, 染料木黄酮在 180 °C 时可以有效地抑制 Arg 和葡萄糖反应生成 MGO 和 GO。当反应达到 60 min 时, 染料木黄酮对 MGO 和 GO 的抑制率均达到最高, 分别为 47.5% 和 56.8%。

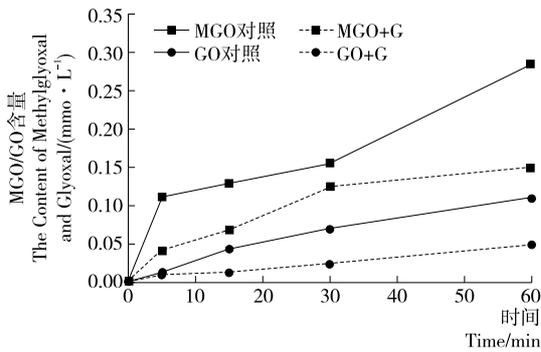


图 3 染料木黄酮抑制 Arg-葡萄糖体系生成的 MGO 和 GO
Figure 3 MGO and GO concentrations in the Arg-glucose-genistein model

2.1.4 影响 MGO 和 GO 形成因素及其交互作用分析 由表 1 可知, 体系中影响 MGO 和 GO 形成的最重要因素是时间, 影响 MGO 形成的第二大因素是 pH, 其次为温度; 而影响 GO 的第二大因素是温度, 随之是 pH。

反应时间是影响 MGO 和 GO 形成的最主要因素, 在反应早期阶段, MGO 和 GO 均会随着反应时间的延长快速增长; pH 对 MGO 的影响较为显著, 位列第二, 因为, 在碱性条

件下 MGO 的形成大幅增加, 远远高于 GO 的增加量, 故 pH 对 GO 形成的影响位列第三; 温度对 GO 和 MGO 的形成作用均较为显著, 随着反应温度的升高而使生成量增加。由此, 进一步探讨 MGO/GO 产生的动力学过程。

表 1 影响 Arg-还原糖体系 MGO/GO 形成的因素及交互作用

Table 1 Contribution of factors and interactions on the production of MGO & GO

项目	影响因素或交互影响因素所占比例/%	
	MGO	GO
时间	28.517	25.673
还原糖种类	6.654	6.814
pH 值	20.853	14.225
染料木黄酮	4.493	5.457
温度	13.518	20.550
时间×还原糖种类	2.356	1.831
时间×pH	5.227	6.770
时间×染料木黄酮	0.936	1.854
时间×温度	4.904	5.768
误差	12.542	11.058

2.2 Arg-葡萄糖模型中 MGO 和 GO 形成的动力学研究

2.2.1 Arg 浓度变化的动力学曲线 从图 4 中可以看出, Arg 浓度随着反应时间的延长而迅速降低; 且温度越高, Arg 浓度衰减越快, 特别是在反应 180 °C 时。在高温加热 10 min 之内, Arg 浓度下降到最低点。Arg 浓度的降低主要来自两个方面: ① Arg 与葡萄糖反应生成 Schiff base 等产物^[19]; ② Arg 参与交联反应, 与自身交联或是与中间产物 MGO、GO 交联形成新化合物^[20-24]。

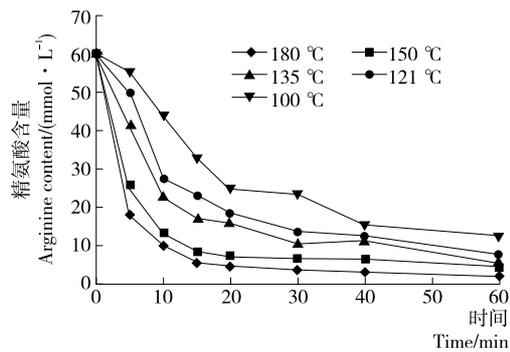


图 4 Arg-葡萄糖模拟体系中 Arg 的动力学变化曲线
Figure 4 The kinetics curve of Arg in Arg-glucose model

2.2.2 葡萄糖浓度变化的动力学曲线 由图 5 可知, 葡萄糖浓度随着反应时间的延长而降低, 30 min 后逐渐趋于平缓。而在同一时间点, 温度越高葡萄糖浓度越低; 反应物葡萄糖的变化趋势与 Arg 的变化趋势基本一致。葡萄糖浓度的降低也是源于两个原因: ① 葡萄糖自身受热氧化降解形成糖基化中间产物 MGO 或 GO^[25]; ② 葡萄糖与 Arg 生成 Schiff base 等产物。

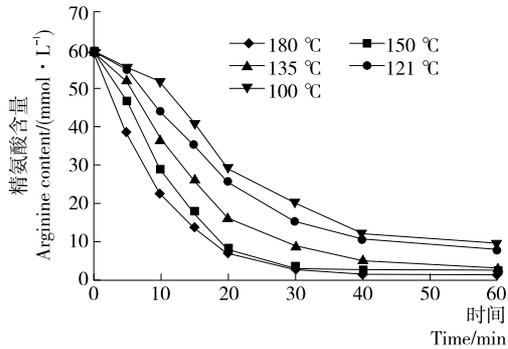


图 5 Arg-葡萄糖模拟体系中葡萄糖的动力学变化曲线
Figure 5 The kinetics curve of Glucose in Arg-glucose model

2.2.3 MGO/GO 生成量的动力学曲线 由图 6 可知,在 Arg-葡萄糖高温加热的体系中,MGO 的浓度随着反应时间的延长而不断增加;且反应温度越高,MGO 的生成量越多。GO 的浓度随着反应时间的延长呈现递增的趋势,且随着温度的升高,GO 生成量增加。其中与 MGO 生成量不同的是,在反应温度为 100 °C 时,GO 的生成量极少。

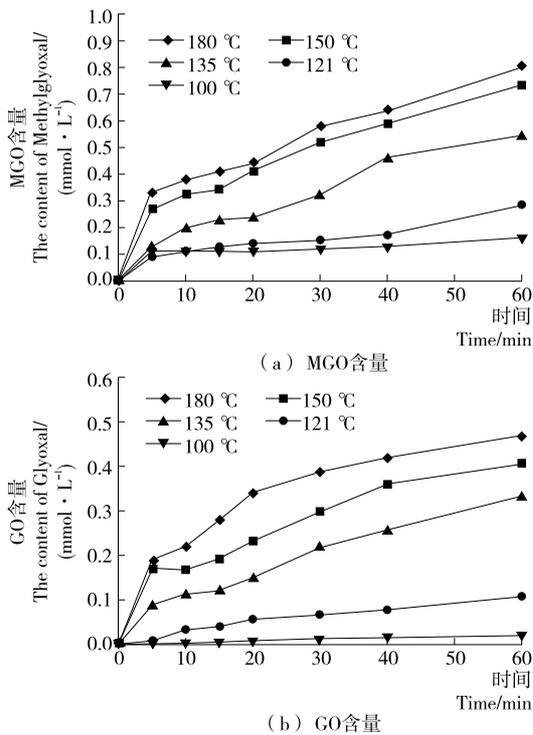


图 6 Arg-葡萄糖模拟体系中 MGO/GO 的动力学变化曲线
Figure 6 The kinetics curve of MGO/GO in Arg-glucose model system in Arg-glucose model

2.3 染料木黄酮抑制 Arg-葡萄糖模型体系中 MGO/GO 的动力学研究

2.3.1 染料木黄酮抑制 MGO/GO 的量效关系 根据温度、时间和抑制剂对 Arg-葡萄糖模型体系中 MGO 和 GO 的形成量影响结果,选取在 180 °C,反应 20 min 条件下,考察染料木黄酮对 Arg-葡萄糖模型体系中 MGO 和 GO 的抑制作用的量效关系,染料木黄酮的添加量设定为 0.005, 0.050,

0.500, 5.000, 50.000 mmol/L。由图 7 可知,在上述添加量,染料木黄酮对 Arg-葡萄糖中 MGO 的抑制率依次为 21.1%, 29.7%, 37.1%, 44.7%, 50.4%, 同时对 GO 的抑制率依次为 37.7%, 43.2%, 50.0%, 58.0%, 65.0%。表明随着抑制剂添加量的增加,抑制率增大,且各试验组存在显著性差异($P < 0.05$)。由此推测:染料木黄酮可能在源头抑制 MGO/GO 生成;抑或同等程度捕获 MGO/GO,从而呈现抑制率随着浓度增加而增长的良好相关性。另外,在 180 °C 反应 20 min 时,发现 Arg-葡萄糖模型中对 MGO 和 GO 的抑制率均在添加量水平为 50 mmol/L 时达到最大,因此,选用 50 mmol/L 为染料木黄酮的添加量。

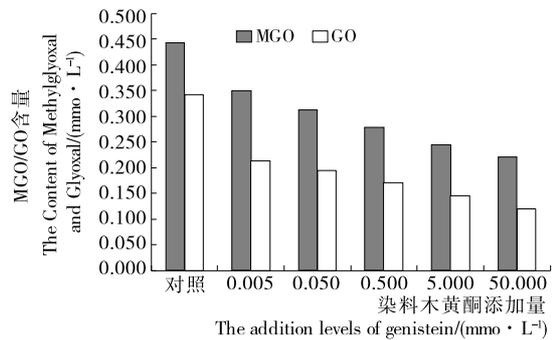


图 7 Arg-葡萄糖模型中 MGO/GO 生成量与染料木黄酮添加量的关系
Figure 7 Relationship between MGO/GO contents and addition levels of genistein in Arg-glucose model

2.3.2 染料木黄酮抑制 MGO/GO 的动力学研究 图 8 为对照组(对照)和抑制组(+G)中 MGO 和 GO 含量随着时间变化的曲线。结果表明,在 Arg-葡萄糖模型体系中,反应 5 min,染料木黄酮即抑制 MGO 和 GO 生成,且随着反应时间的延长,抑制效果呈现增强趋势。在反应达到 60 min 时,对 Arg-葡萄糖模型中 MGO 和 GO 的抑制率分别为 45.0% 和 51.1%。

2.3.3 染料木黄酮抑制 MGO/GO 的动力学参数对反应过程的影响 为了进一步研究 Arg-葡萄糖模拟体系中 MGO 和 GO 形成的动力学机制,根据上述动力学曲线图(图 4~

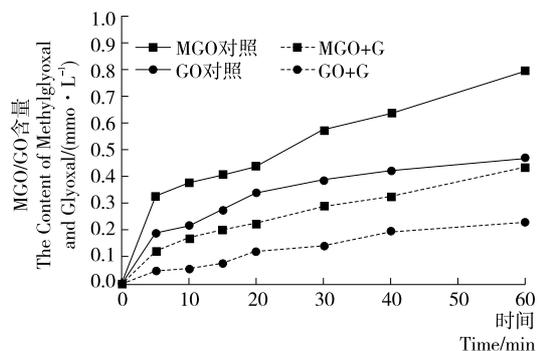


图 8 染料木黄酮抑制 Arg-葡萄糖模型体系中 MGO/GO 的形成动力学曲线
Figure 8 Inhibitory effect of genistein on the kinetic profiles of MGO/GO formation in Arg-glucose model

6), 计算不同温度(100, 121, 135, 150, 180 °C)下, 反应速率常数 k 以及表观活化能 E_a 。从表 2 可以看出, 在 Arg-葡萄糖模型中, 随着温度的升高, 反应速率常数逐渐提高, 表明该反应为吸热反应。在 Arg-葡萄糖模型中 MGO 的表观活化能显著低于 GO, 因此 MGO 的反应速率比 GO 高。表明体系中产生 MGO 反应更易于发生。同时, MGO 的反应速率常数均比 GO 的反应速率常数高, 也可以得出该结论。

另外, 对比对照组和抑制组发现, 抑制组的反应速率常数均低于对照组, 说明染料木黄酮可以抑制 Arg-葡萄糖模型中 MGO 和 GO 的形成。

表 2 染料木黄酮介入前后, MGO 和 GO 形成的动力学模型参数

Table 2 Parameter of kinetics models for the formation of MGO/GO before/after genistein involved in ($n=3$)

组别	温度/°C	反应速度常数/ $(\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	
		MGO	GO
抑制组	180	0.767 2 ± 0.012	0.401 6 ± 0.011
	100	0.010 0 ± 0.005	0.001 0 ± 0.013
	121	0.024 3 ± 0.002	0.008 7 ± 0.033
对照组	135	0.138 3 ± 0.053	0.084 1 ± 0.021
	150	0.457 9 ± 0.078	0.262 7 ± 0.040
	180	1.466 1 ± 0.045	0.931 8 ± 0.041
活化能	kJ/mol	10.732 0	14.281 9

2.4 染料木黄酮消除 Arg-葡萄糖体系中 1,2-二羰基化合物的机制研究

由上述结果可知染料木黄酮的介入能显著降低 Arg-葡萄糖体系中 MGO 的形成, 鉴于本实验室前期研究结果, 在模拟生理条件下(37 °C, pH 7.4), 染料木素与 MGO 易于形成加合产物^[26]。为验证在 Arg-葡萄糖体系中染料木素是否具有同样的效能, 本试验选取添加染料木黄酮于 Arg-葡萄糖体系中, 180 °C 反应 5 min, 采用 LC-MS 分析反应混合物中染料木黄酮的变化。如图 9 所示, 除了染料木素色谱峰(12.16 min)外, 出现新的色谱峰(6.43, 7.08 min)。如图 10 所示, ESI-MS(m/z)准分子峰 341 $[M-H]^-$, 分子量比染料木黄酮多了 72(MGO), 推测为染料木素-MGO 的加合产物。由此可知染料木黄酮消除 Arg-还原糖体系中 1,2-二羰基化合物的机制是通过捕获 Arg-葡萄糖体系中生成的 MGO 形成加合产物, 从而降低了体系中 MGO。

3 结论

本试验通过气相色谱法检测 Arg-还原糖模型体系产生的中间产物 MGO 和 GO, 考察还原糖的种类、时间、pH、温度和抑制剂染料木黄酮等对模拟体系生成 MGO 和 GO 的影响; 采用动力学模型研究高温加热条件下的 Arg-葡萄糖模型体系中 MGO 和 GO 形成以及染料木素抑制的动力学过程。综合分析各影响因素试验结果表明, 时间是影响 Arg-还原糖模型体系产生 MGO 和 GO 的最主要因素。在 Arg-葡

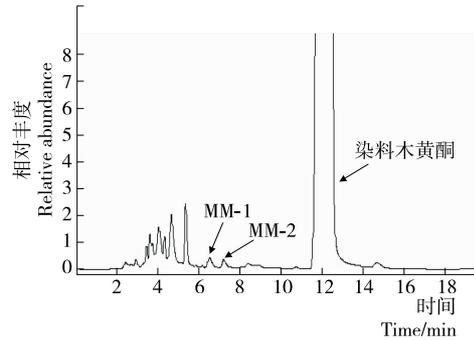
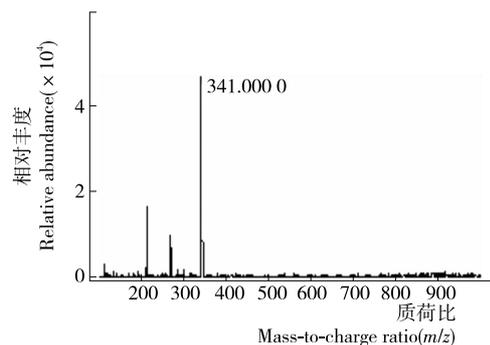
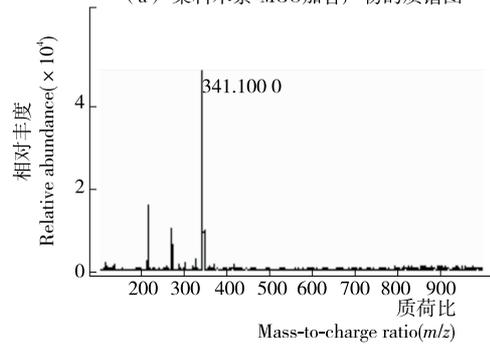


图 9 染料木黄酮消除 Arg-葡萄糖体系中 1,2-二羰基化合物的机制液相图

Figure 9 The liquid chromatogram of genistein on elimination of 1,2-dicarbonyl compounds in Arg-glucose model



(a) 染料木素-MGO加合产物的质谱图



(b) 染料木素-MGO加合产物的质谱图

图 10 染料木黄酮消除 Arg-还原糖体系中 1,2-二羰基化合物的机制质谱图

Figure 10 The mass spectrum of genistein on elimination of 1,2-dicarbonyl compounds in Arg-glucose model

萄糖模型中 MGO 的反应速率常数均大于 GO 的, 生成 MGO 的表观活化能均低于生成 GO 的活化能, 说明在此反应过程中更容易生成 MGO。染料木黄酮介入之后, 1,2-二羰基化合物产生的化学反应速率比介入之前明显降低, 说明染料木黄酮可以有效抑制 Arg-葡萄糖体系产生的 1,2-二羰基化合物。当染料木黄酮的添加量为 50 mmol/L 时抑制效果最佳。LC-MS 结果表明染料木黄酮消除 Arg-葡萄糖体系中的 1,2-二羰基化合物的机制是染料木黄酮通过捕获该体系中 MGO 形成加合产物而达到清除的效果。由于试验时间的限制, 本试验研究了 Arg-葡萄糖体系中糖基化中间产物 MGO 与 GO 的形成及抑制, 今后还将进一步研究该体系中

糖基化终末产物 AGEs 的形成及抑制的相关机制。

参考文献

- [1] GUGLIUCCI A. Glycation as the glucose link to diabetic complications [J]. The Journal of the American Osteopathic Association, 2000, 100: 621-634.
- [2] YIM H S, KANG S O, HAH Y C, et al. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270: 28 228-28 233.
- [3] KALAPOUS M P. Methylglyoxal in living organisms chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications[J]. Toxicology Letters, 1999, 110: 145-175.
- [4] BASKARAN S, BALASUBRAMANIAN K A. Toxicity of methylglyoxal towards rat enterocytes and colonocytes[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1990, 21: 165-174.
- [5] THORNALLEY P J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1 043: 111-117.
- [6] TALUKDAR D. Critical evaluation of toxic versus beneficial effects of methylglyoxal[J]. Biochemistry (Mosc), 2009, 74 (10): 1 059-1 069.
- [7] LAPOLLA A. Evaluation of glyoxal and methylglyoxal levels in uremic patients under peritoneal dialysis[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1 043: 217-224.
- [8] 章宇. 生物黄酮抑制食品中丙烯酰胺形成的机理及其构效关系研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [9] SARA I, MARTINUS A. A kinetic model for the glucose/glycine maillard reaction pathways[J]. Food Chemistry, 2005, 90: 257-269.
- [10] PAUL J T, ALEXANDER Y G, ONGIAN K A. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone under physiological conditions[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60: 55-56.
- [11] 付全意. 食品模拟体系糖化反应过程中羧甲基赖氨酸的形成和抑制[D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 96-108.
- [12] LI Xiao-ming, ZHENG Tie-song, SANG Seng-min, et al. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(50): 12 152-12 158.
- [13] CHEN Xiu-min, KITTS D D. Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds produced in different sugar-amino acid Maillard reaction model systems[J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2 775-2 782.
- [14] KNOL J J. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(15): 6 133-6 139.
- [15] 朱海华, 田春华, 竹磊, 等. 气相色谱法检测酵母多糖中的葡萄糖及甘露糖组分[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 275-281.
- [16] 王国振, 王焕, 陆欣. 高效液相色谱前衍生法测定板蓝根胶囊中精氨酸的含量[J]. 河北中医药学报, 2011, 26(2): 42-43.
- [17] WEENEN H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry[J]. Food Chemistry, 1998, 62 (4): 393-401.
- [18] STEINHART H. The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications. Von Harry Nursten [J]. Angewandte Chemie, 2010, 44(46): 7 503-7 504.
- [19] NEGLIA C I, COHEN H J, GARBER A R, et al. ¹³C NMR investigation of nonenzymatic glycosylation of protein: Model studies using RNase A[J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258(23): 14 279-14 283.
- [20] SCHWARZENBOLZ U, MENDE S, HENLE T. Model studies on protein glycation: influence of cysteine on the reactivity of arginine and lysine residues toward glyoxal[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1 126: 248-252.
- [21] AHMED M U. N ϵ -(carboxyethyl)-lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins[J]. Journal of Biochemistry, 1997, 324 (Pt 2): 565-570.
- [22] FRYE E B. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins; Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(30): 18 714-18 719.
- [23] WILKER S C. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins; comparison with pentosidine[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 290(2): 353-358.
- [24] HOFMANN T. 4-alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-ynyl] azamethylidene-1,3-imidazolidine a novel colored substructure in melanoidins formed by maillard reactions of bound arginine with glyoxal and furan-2-carboxaldehyde[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 3 896-3 901.
- [25] PAUL J T, ANNIKA L, HARJIT S M. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose[J]. Journal of Biochemistry, 1999, 344: 109-116.
- [26] LV Li-shuang, SHAO Xi, CHEN Hua-dong, et al. Genistein inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal[J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24 (4): 579.