

甲醇体系中美拉德反应产物抗氧化活性的研究

章银良, 章馨元, 张陆燕, 卢慢慢, 时国庆

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:为考察美拉德反应产物(MRPs)在甲醇溶剂中的抗氧化活性,采用甘氨酸-葡萄糖模拟体系,以DPPH自由基清除率作为MRPs抗氧化活性指标,通过与纯水体系中MRPs抗氧化活性的对比,确定最佳甲醇体积分数;在此甲醇体积分数下考察了反应温度、时间、pH和反应物浓度4个因素对MRPs抗氧化性的影响,并通过均匀试验得到最佳工艺条件.结果表明:以甲醇水溶液为溶剂的甘氨酸-葡萄糖模拟体系中,在40%甲醇体积分数下MRPs对DPPH自由基清除率最高,抗氧化活性最优.其最佳工艺条件为:温度127℃,反应时间60min,反应初始pH=8.0,甘氨酸与葡萄糖质量比2.5:1.

关键词:美拉德反应产物;抗氧化活性;甲醇体系;均匀试验

中图分类号:TS201.2 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.04.005

Study on antioxidant activity of Maillard reaction products in the methanol solvent system

ZHANG Yin-liang, ZHANG Xin-yuan, ZHANG Lu-yan, LU Man-man, SHI Guo-qing
(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to investigate the antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) in the methanol solvent, the glycine-glucose simulation system was adopted, with DPPH free radical scavenging as antioxidant activity index of MRPs and pure water system of MRPs antioxidant activity as the contrast. The optimum concentration of methanol was investigated. Under this methanol concentration, the effect of reaction temperature, reaction time, pH and concentration of reactants on MRPs oxidation activity were studied, and optimum technological conditions were obtained by uniform test. The results showed that under the 40% methanol concentration as the solvent of glycine-glucose simulation system, the DPPH free radical scavenging rate of MRPs was the highest, the antioxidant activity was the optimal. The optimum technological conditions were as follows: temperature 127 °C, 60 min reaction time, initial pH = 8.0, the ratio of glycine and glucose 2.5 : 1.

Key words: Maillard reaction products (MRPs); antioxidant activity; methanol solvent system; uniform test

0 引言

美拉德反应 MR(Maillard reaction) 是羰基化合

物(如还原糖、脂质,以及由此而来的醛、酮、多酚、抗坏血酸、类固醇等)与氨基化合物(氨基酸、肽类、蛋白质等)发生的一系列复杂的非酶促褐变反应,

收稿日期:2014-06-23

基金项目:河南省科技攻关项目(122102110055)

作者简介:章银良(1963—),男,浙江省上虞市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为食品品质控制与质量安全.

也被称为羰氨反应. 美拉德反应的广泛性及复杂性决定了其产物 MRPs (Maillard reaction products) 种类繁多, 根据美拉德反应的历程可以看出, 其中间产物主要是一些还原酮及挥发性的含氮、含硫杂环化合物, 最终产物主要是类黑精, 这些物质具有一定的抗氧化活性. 1953 年 J. Hodge 等^[1] 首先报道了 MRPs 具有防止植物油氧化的效果, C. Franzke 等^[2] 也注意到 MRPs 具有抗氧化能力, 并研究了人造奶油中添加甘氨酸-葡萄糖反应产物的氧化稳定性. 1980 年代, H. Lingnert 等^[3-4] 研究发现, 氨基酸、肽及蛋白质经美拉德反应后, 抗氧化活性显著提高, 甚至可与常用的食品抗氧化剂 BHA 和 BHT 相媲美, 由此, MRPs 的抗氧化性能引起人们重视, 并逐渐成为研究热点^[5-11]. 在目前的相关文献报道中, 对美拉德反应的研究, 较多地集中在水溶液模拟体系中不同糖与氨基酸组合美拉德反应产物抗氧化活性的比较和工艺优化、实际体系中美拉德反应产物的抗氧化活性研究、各种加工技术对模拟体系美拉德反应产物抗氧化活性的影响等方面, 而对于非水体系 MRPs 抗氧化活性的研究极少. 本文拟以甲醇作为非水体系的溶剂, 考察 MRPs 在甲醇体系中抗氧化活性的变化, 为开发天然 MRPs 抗氧化剂提供依据和参考.

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

材料: L-甘氨酸, BR, 北京 Solarbio 试剂公司产; D-葡萄糖, AR, 天津市风船化学试剂科技有限公司产; 无水甲醇, AR, 天津市登科化学试剂有限公司产; DPPH (1,1-二苯基-2-苦肼基自由基), AR, 上海生工生物工程技术有限公司产.

设备: pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司产; JA1203 型电子天平, 上海越平科学仪器有限公司产; HH-1 智能型数显恒温油浴槽, 金坛市正基仪器有限公司产; UV-2102pc 型紫外-可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司产; ZKSY-600 型智能恒温水浴锅, 南京科尔仪器设备有限公司产.

1.2 实验方法^[10]

1.2.1 甲醇水溶液体积分数的确定 称量 3.75 g 甘氨酸和 1.25 g 葡萄糖(其质量比为 3:1)溶于 45 mL 的去离子水(参照组), 10%, 20%, 30%, 40% (体积比) 甲醇溶液中, 并分别用 4 mol/L 的 HCl 溶液和 6 mol/L 的 NaOH 溶液调整 pH 至 7.0, 然后用相对应的溶剂定容至 50 mL, 混合均匀. 称取 20 mL

的反应液转移至 250 mL 的圆底烧瓶中, 密封严实后, 置于 140 °C 下反应 1 h. 反应结束后快速置于冰水中冷却并进行相关测定, 剩余样品置于 -20 °C 冰箱中保存备用.

1.2.2 MRPs 抗氧化性的单因素试验 1) 温度组: 称量甘氨酸和葡萄糖各 0.625 g, 溶解于 20 mL 的 40% 甲醇中, 并分别用 4 mol/L 的 HCl 溶液和 6 mol/L 的 NaOH 溶液调整 pH 至 7.0, 然后用 40% 甲醇定容至 25 mL, 混合均匀. 将反应液转移至 250 mL 圆底烧瓶中, 密封严实后, 分别置于 60 °C, 80 °C, 100 °C, 120 °C, 140 °C, 160 °C, 180 °C 恒温油浴槽中反应 1 h. 反应结束后快速置于冰水中冷却并进行相关测定, 剩余样品置于 -20 °C 冰箱中保存备用.

2) 时间组: 称量甘氨酸和葡萄糖各 2.5 g, 溶解于 90 mL 的 40% 甲醇中, 并分别用 4 mol/L 的 HCl 溶液和 6 mol/L 的 NaOH 溶液调整 pH 至 7.0, 然后用 40% 甲醇定容至 100 mL, 混合均匀. 将反应液转移至 250 mL 圆底烧瓶中, 密封严实后, 置于 130 °C 恒温油浴槽中反应, 每隔 30 min 取 1 次约 10 mL 的样液, 所制备样品的反应时间分别为 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min 和 210 min. 余下同上.

3) pH 组: 称量甘氨酸和葡萄糖各 0.625 g, 溶解于 20 mL 的 40% 甲醇中, 并分别用 4 mol/L 的 HCl 溶液和 6 mol/L 的 NaOH 溶液调整 pH 至 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 和 11.0, 然后用 40% 甲醇定容至 25 mL, 混合均匀. 将反应液转移至 250 mL 圆底烧瓶中, 密封严实后, 置于 130 °C 恒温油浴槽中反应 1 h. 余下同上.

4) 比例组: 准确称量一定量的甘氨酸和葡萄糖, 使其质量比分别为 1:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 1:3, 1:2.5, 1:2 和 1:1.5, 溶解于 20 mL 的 40% 甲醇中, 并分别用 4 mol/L 的 HCl 溶液和 6 mol/L 的 NaOH 溶液调整 pH 至 7.0, 然后用 40% 甲醇定容至 25 mL, 混合均匀. 将反应液转移至 250 mL 圆底烧瓶中, 密封严实后, 置于 130 °C 恒温油浴槽中反应 1 h. 余下同上.

1.2.3 均匀试验 根据单因素试验结果, 采用 $U_7 * (7^4)$ ^[12] 均匀试验表, 因素水平见表 1.

1.2.4 DPPH 自由基清除能力的测定 MRPs 的抗氧化能力测定采用 G. Yen 等^[13] 提出的方法. 称取 0.004 9 g DPPH 溶于 100 mL 无水乙醇中, 配置成浓度为 0.12 mmol/L 的储备液, 避光保存. 将 1 mL

表1 $U_7 * (7^4)$ 均匀试验因素水平表

水平	温度 $X_1/^\circ\text{C}$	时间 X_2/min	pH 值 X_3	质量比(甘氨酸: 葡萄糖) X_4
1	180(7)	30(1)	9.0(5)	2:1(3)
2	160(6)	60(2)	6.0(2)	1:2(6)
3	140(5)	90(3)	11.0(7)	1:1(1)
4	120(4)	120(4)	8.0(4)	2.5:1(4)
5	100(3)	150(5)	5.0(1)	1:1.5(7)
6	80(2)	180(6)	10.0(6)	1.5:1(2)
7	60(1)	210(7)	7.0(3)	1:2.5(5)

经 50 倍稀释后的样品溶液和 4 mL DPPH 酒精溶液混合,剧烈摇晃使其均匀混合,在黑暗室温环境下放置 30 min,然后在 517 nm 条件下测定其吸光度,记为 A_s ;相同操作条件下,以 1 mL 40% 甲醇溶液代替稀释后的样品溶液,记录其在 517 nm 条件下的吸光度值,记为 A_c . DPPH 自由基清除能力由下式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

清除率越大,表明其抗氧化能力越强.

1.2.5 统计分析 均做 3 次平行试验,采用 Mathematics 软件进行处理,并用 SPSS 进行显著性分析(差异显著 $P < 0.05$).

2 结果与讨论

2.1 甲醇水溶液体系浓度的确定

图 1 为不同甲醇体积浓度的 MRP_s 对 DPPH 清除率的影响.从图 1 可以看出,在纯水体系中掺入少量的甲醇会对其 MRP_s 的 DPPH 自由基清除特性有一定影响,但变化并不是十分显著;其清除率随着甲醇浓度的增大而增加,即 MRP_s 的抗氧化活性会随之增强.因此,本实验选取 40% 的甲醇溶液作为体积浓度.超过 40% 体积浓度的整个体系属于不溶解状态,因而不考虑.

2.2 单因素试验

图 2—图 5 为不同反应温度,不同 pH,不同反

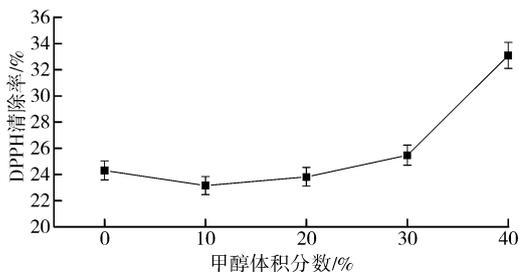


图1 不同甲醇体积分数下的 MRP_s 对 DPPH 清除率的影响

应时间和质量比条件下的 MRP_s 对 DPPH 清除率的影响.从图 2—图 5 可知,在 40% 甲醇水溶液中,甘氨酸-葡萄糖模拟体系中:温度组,MRP_s 的抗氧化能力在试验选定的温度范围内(出于实验温度控制和实际使用的考虑,不考虑 200 °C 以上),随着温度的升高而增大;pH 组,随着 pH 的不断增大,MRP_s 的抗氧化活性呈现先增大后逐渐降低的趋势,并在 pH = 9.0 时抗氧化活性达到最大,对 DPPH 自由基的清除率达到 37.16%;时间组,反应时间超过 30 min 的 MRP_s 即具有抗氧化活性,抗氧化能力随着加热时间的延长而逐渐增大并趋于平稳趋势,说明 MRP_s 中具有抗氧化活性的物质产生在反应进行的初始阶段,同时在后期的反应过程中,这些具有抗氧化活性的产物并不会继续反应或损失减少,而是维持在一定浓度.由图 5 可知,甘氨酸和葡萄糖糖的质量比为 1:2.5 条件下反应得到的 MRP_s 抗氧化活性最优.因此单因素试验各个取值分别为温度 180 °C, pH = 9.0, 时间 250 min, 质量比(甘氨酸:葡萄糖)1:2.5.

2.3 均匀试验

根据单因素试验结果,同时考察诸因素之间的交互影响,试验结果见表 2.

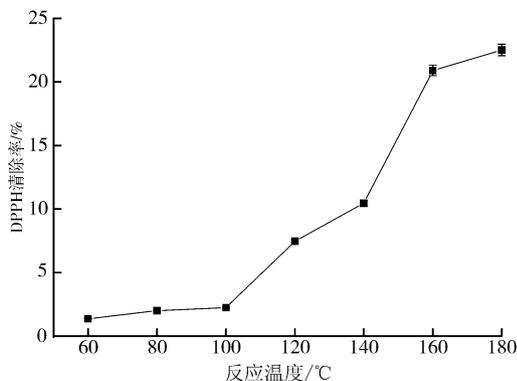


图2 不同反应温度的 MRP_s 对 DPPH 清除率的影响

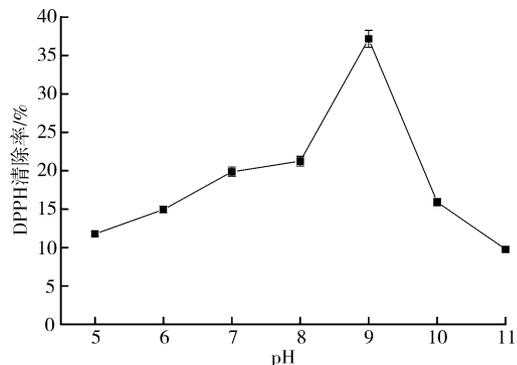


图3 不同 pH 的 MRP_s 对 DPPH 清除率的影响

采用 Mathematics 4.0 软件对均匀试验结果进行分析,结果见表3 和表4.

由表3 可以看出,温度和 pH 值对 MRPs 抗氧化活性具有显著影响,质量比与反应温度之间具有接

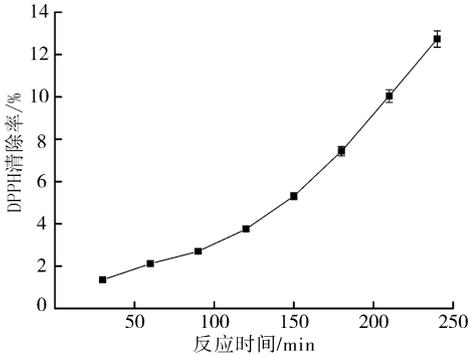


图4 不同反应时间的 MRPs 对 DPPH 清除率的影响

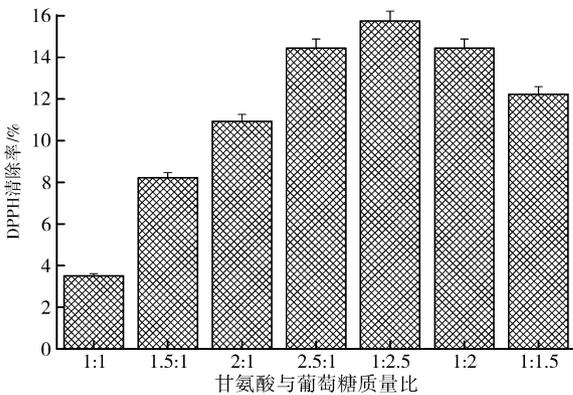


图5 不同反应物质量比的 MRPs 对 DPPH 清除率的影响

表2 均匀试验结果

试验号	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2/min	X_3	X_4	DPPH 清除率 $Y/\%$
1	180	30	9.0	2 : 1	46.07
2	160	60	6.0	1 : 2	51.79
3	140	90	11.0	1 : 1	6.23
4	120	120	8.0	2.5 : 1	43.41
5	100	150	5.0	1 : 1.5	3.78
6	80	180	10.0	1.5 : 1	7.97
7	60	210	7.0	1 : 2.5	1.02

表3 DPPH 自由基清除率回归参数表

方程形式	估计量	标准误	T 值	P 值
1	-175.522	11.115 3	-17.590 4	0.036 152 4
X_1	0.714 925	0.030 163 9	23.701 3	0.026 844 2
X_3	28.590 5	1.938 78	14.746 6	0.043 104 5
X_4	34.290 1	2.786 93	12.303 9	0.051 627 7
X_3^3	-0.157 614	0.009 124 24	-17.274 3	0.036 812 6
X_1X_4	-0.271 076	0.022 828	-11.874 7	0.053 485 1

表4 均匀试验方差分析表

方差项目	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	P 值
模型	5	3 135.1	627.021	292.977	0.044 325 2
误差	1	2.140 17	2.140 17		
总计	6	3 137.24			

近显著的交互影响;影响 MRPs 抗氧化活性的主次顺序依次为:温度 (X_1) > pH 值 (X_3) > 质量比 (X_4) > 时间 (X_2).

回归方程: $Y = -175.522 + 0.715 X_1 + 28.591 X_3 + 34.290 X_4 - 0.158 X_3^3 - 0.271 X_1X_4$. 决定系数 $R^2 = 0.999 32, P = 0.044 325 2$ (见表4), 所得到的回归方程可靠. 在测试条件范围内, 经过计算后得到最佳优化条件为: 温度 127 $^\circ\text{C}$, 反应时间 60 min, 反应初始 pH = 8.0, 甘氨酸与葡萄糖质量比 2.5 : 1. 此时 MRPs 抗氧化活性最强, 试验表明, 在此优化条件下 MRPs 对 DPPH 自由基的清除率为 59.97%, 大大高于均匀试验的 7 个结果.

3 结论

采用甘氨酸-葡萄糖模拟体系, 以 DPPH 自由基清除率作为 MRPs 的抗氧化活性指标, 通过与纯水体系中 MRPs 抗氧化活性的对比, 考察 MRPs 在甲醇溶剂中的抗氧化活性的变化. 结果表明: 在 40% 甲醇浓度下, MRPs 对 DPPH 自由基清除率最高, 抗氧化活性最强. 其最佳工艺条件为: 温度 127 $^\circ\text{C}$, 反应时间 60 min, 反应初始 pH = 8.0, 甘氨酸与葡萄糖质量比 2.5 : 1.

参考文献:

- [1] Hodge J, Rist C E. The amadori rearrangement under new conditions and its sign finance for non-enzymatic browning reactions[J]. J Am Chem Soc, 1953, 75:316.
- [2] Franzke C, Lwainsky H. Antioxidant capacity of melanoidin[J]. Dtsch Lebensm-Rundsch, 1954, 50:251.
- [3] Lingnert H, Eriksson C. Antioxidative Maillard reaction products(II): Products from sugars and peptides or protein hydrolysates [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1980, 4:173.
- [4] Lingnert H, Eriksson C. Antioxidative Maillard reaction products(I): Products from sugars and peptides or protein hydrolysates [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1980, 4:161.
- [5] Nakamura S, Kato A, Kobayashi I K. Enhanced antioxidant effect of ovalbumin due to covalent binding of poly-

(下转第 28 页)

- 西医学,1992,14(3):162.
- [4] Chomezynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical biochemistry*, 1987, 162(1):156.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998:888-898.
- [6] 蒋成淦. 酶免疫测定法[M]. 北京:人民卫生出版社,1984.
- [7] Cliquet F, MOiler T, Mutinelli F, et al. Standardization and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns[J]. *Vaccine*, 2003, 21:2986.
- [8] Cliquet F, McElhinney L M, Servat A, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats[J]. *J Viro Methods*, 2004, 117(1):1.
- [9] Benmansour A, Leblois H, Coulon P, et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein[J]. *J Virol*, 1991, 65(8):4198.
- [10] Perrin P, Versmisse P, Delagneau J F, et al. The influence of the type of immunosorbant on rabies antibody EIA; advantage of glycoprotein over whole virus[J]. *J Biol Stand*, 1986, 14:95.
- [11] 扈荣良, 张余峰, 刘晔, 等. 狂犬病动物抗体水平检测和监测[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(3):293.
- [12] 侯丹丹, 王云龙, 张怡青, 等. 麻疹病毒 N 蛋白原核表达纯化条件的优化[J]. *郑州轻工业学院学报:自然科学版*, 2013, 28(6):31.

(上接第 23 页)

- saccharides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40:2033.
- [6] Benjakul S, Lertittikul W, Bauer F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93:189.
- [7] Osada Y, Shibamoto T. Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems[J]. *Food Chemistry*, 2006, 98:522.
- [8] Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127:1023.
- [9] 章银良, 张陆燕, 周文权, 等. 不同温度对酪蛋白-木糖模式美拉德反应产物抗氧化的影响[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4):211.
- [10] 章银良, 周文权. 均匀试验优化酪蛋白-木糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2013, 34(1):27.
- [11] 孙涛, 陈春红, 朱云, 等. 基于与葡萄糖美拉德反应的低聚壳聚糖衍生物的抗氧化性能[J]. *食品科学*, 2011(3):14.
- [12] 章银良. 食品与生物试验设计与数据分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2010.
- [13] Yen G, Hsieh P. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products[J]. *J Sci Food Agric*, 1995, 67:415.