

煮炸鹿茸加工过程中晚期糖基化终产物生成规律及动力学分析

宫瑞泽¹, 刘松鑫^{1,2}, 邵紫君^{1,2}, 夏蕴实^{1,2}, 张磊¹, 王玉方¹, 孙印石^{1*}, 刘畅^{1*}

1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: **目的** 研究煮炸鹿茸加工过程中晚期糖基化终产物的生成规律及动力学参数。**方法** 通过构建葡萄糖与赖氨酸模拟煮炸鹿茸加工过程美拉德 (Maillard) 反应体系, 分别采用紫外-可见分光光度法和 UPLC-MS/MS 法测定体系褐变指数和典型晚期糖基化终产物 (羧甲基赖氨酸和羧乙基赖氨酸) 含量变化, 探讨晚期糖基化终产物的生成规律和动力学参数。**结果** 鹿茸加工过程中煮炸时发生褐变反应, 生成羧甲基赖氨酸和羧乙基赖氨酸反应的活化能分别为 5.07、40.44、78.47 kJ/mol, 且均为零级反应; 烘烤时相应反应的活化能分别为 6.72、89.34、164.77 kJ/mol, 也均为零级反应。相对于生成羧甲基赖氨酸而言, 生成羧乙基赖氨酸所需能量更高, 反应更难发生。**结论** 烘烤过程温度变化对晚期糖基化终产物的动力学参数影响显著高于煮炸过程, 长时间较高温度的烘烤使鹿茸中产生了较多的晚期糖基化终产物, 这些结果为鹿茸加工过程中晚期糖基化终产物的阻断、抑制策略提供了理论基础, 对生产绿色安全的鹿茸及加强中药安全具有重要意义。

关键词: 鹿茸; 煮炸; 烘烤; 模拟体系; 晚期糖基化终产物; 生成规律; 动力学分析; 美拉德反应; UPLC-MS/MS; 羧甲基赖氨酸; 羧乙基赖氨酸; 褐变反应; 活化能; 零级反应

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)07-1852-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.021

Study on formation regularity and kinetics of advanced glycation end-products during processing of boiled *Cervi Cornu Pantotrichum*

GONG Rui-ze¹, LIU Song-xin^{1,2}, SHAO Zi-jun^{1,2}, XIA Yun-shi^{1,2}, ZHANG Lei¹, WANG Yu-fang¹,
SUN Yin-shi¹, LIU Chang¹

1. Institute of Special Animals and Plants Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To study the formation regularity and kinetic parameters of advanced glycation end-products during the processing of boiled *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP). **Methods** UV-visible spectrophotometry and UPLC-MS/MS method were used to determine the change of browning index and content of typical advanced glycation end-products, *N*^ε-(carboxymethyl) lysine and *N*^ε-(carboxyethyl) lysine, of the processing system of simulated boiled CCP. The formation regularity and kinetic parameters of advanced glycation end-products during the processing of boiled CCP were discussed by constructing glucose and lysine to simulate the Maillard reaction system of CCP processing. **Results** The activation energy of browning reaction, *N*^ε-(carboxymethyl) lysine and *N*^ε-(carboxyethyl) lysine reaction during processing of boiled CCP were 5.07, 40.44 and 78.47 kJ/mol, respectively, and all of them were zero-order kinetics. The activation energies of the above reactions in the baking process were 6.72, 89.34 and 164.77 kJ/mol, respectively, and all of them were zero-order kinetics. Compared to the formation of *N*^ε-(carboxymethyl) lysine, the formation of *N*^ε-(carboxyethyl) lysine required higher activation energy and was more difficult to occur. **Conclusion** The temperature changed in the baking process has a significantly higher effect on the kinetic parameters of the advanced glycation end-products than in the boiling process. Long-term higher baking temperature resulted in more advanced glycation end-products produced in the boiled CCP. This study provides a solid theoretical basis for the blocking and inhibition strategies of advanced

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706604); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706605); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-ISAPS); 吉林省科技发展计划项目 (20180201076YY); 中国农业科学院特产研究所基本科研业务费 (1610342019010)

作者简介: 宫瑞泽 (1993—), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向为野生动植物保护与利用。E-mail: grz2017caas@163.com

***通信作者** 孙印石 (1980—), 男, 内蒙古兴安盟人, 研究员, 博士, 主要从事特种动植物贮藏与产品开发。E-mail: sunyinshi2015@163.com
刘畅 (1983—), 女, 吉林蛟河人, 副研究员, 博士, 主要从事特种动植物产品开发。E-mail: liuchang@caas.cn

glycation end-products in the processing of CCP, which is also a great significance for the production of green safety CCP and strengthening the safety of traditional Chinese medicine.

Key words: *Cervi Cornu Pantotrichum*; boiling process; baking process; simulation system; advanced glycation end-products; formation regularity; kinetic analysis; Maillard reaction; UPLC-MS/MS; *N*^ε-(carboxymethyl)lysine; *N*^ε-(carboxyethyl)lysine; browning reaction; activation energy; zero-order kinetics

鹿茸是鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 雄鹿未骨化密生茸毛的幼角, 具有“壮肾阳, 益精血, 强筋骨, 调冲任, 托疮毒”的功效^[1]。新鲜鹿茸由于含有大量血液, 富含氨基酸、蛋白质, 如不及时加工极易腐败变质。因此鹿茸加工技术将直接关系到鹿茸的品质和养鹿业的经济效益。目前主产区最常采用的仍然是热水煮炸法, 煮炸是一种传统的鹿茸产地初加工技术, 包括水煮、烘烤、风干等步骤, 重复多次直至干燥。煮炸能有效消除鹿茸中的病原微生物, 使茸头饱满有型、茸皮光鲜亮丽。

鹿茸热加工过程中美拉德反应 (Maillard reaction) 普遍发生, Maillard 反应又称羰氨反应, 是一类广泛存在于食品工业、药材加工炮制中的非酶褐变反应, 是氨基化合物和羰基化合物之间经缩合、聚合生成类黑精等褐色物质的反应^[2-4]。Maillard 反应产物结构复杂、种类繁多, 包括醛、酮、羟甲基糠醛等中间产物, 以及羧甲基赖氨酸 [*N*^ε-(carboxymethyl)lysine, CML]、羧乙基赖氨酸 [*N*^ε-(carboxyethyl)lysine, CEL] 等晚期糖基化终产物 (advanced glycation end product, AGEs), 其中 CML 和 CEL 是 AGEs 中较早被发现且含量较高的物质, 被公认为是 AGEs 最重要的指标性成分^[5-7]。现代研究表明, AGEs 会加速人体衰老并导致很多慢性退化性疾病的发生, 如尿毒症、糖尿病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病等^[8-12]。

本课题组前期报道了经热水煮炸加工干燥鹿茸中 CML 和 CEL 等 AGEs 含量, 其中 CML 等 AGEs 质量分数约为 145 mg/kg 蛋白质^[13-15], 但加工鹿茸中 AGEs 的生成规律和动力学参数等尚不明晰。鉴于鹿茸基质的复杂性, 以复杂体系研究鹿茸加工过程中 Maillard 反应产物 AGEs 的生成规律、动力学参数等可行性较差, 本实验选取有代表性的羰基化合物和氨基化合物葡萄糖 (Glc) 与赖氨酸 (Lys) 反应, 构建模拟鹿茸加工过程 Maillard 反应体系, 探讨 AGEs 的生成规律和动力学参数。本实验为鹿茸加工过程中 AGEs 的阻断、抑制策略提供了丰富的理论基础, 对生产绿色、安全鹿茸及加强中药安

全具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

XEVO TQ-MS 超高效液相色谱-质谱联用仪, 美国 Waters 公司; BioTek Epoch2 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; AF1-20 安瓿熔封机, 长沙楚泰制药机械设备有限公司; EX125D2H 电子天平, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; GZX-9140 MBE 数显鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; HH-4A 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; Milli-Q Advantage A1 超纯水机, 美国密理博公司; 0.22 μm 有机系针头式过滤器, 天津市津腾实验设备有限公司。

1.2 材料

CML (批号 C180075)、CEL (批号 C178070), 质量分数均 ≥98%, 加拿大 TRC 公司; 乙腈、甲酸, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 葡萄糖、赖氨酸、甲酸钠、醋酸钠、醋酸, 分析纯, 北京化工厂; 超纯水, 电阻率 ≥18.25 MΩ, 由实验室超纯水机制备。

2 方法与结果

2.1 模拟煮炸鹿茸加工过程体系构建

传统的鹿茸煮炸加工需经过反复长时间的煮炸、烘烤和风干过程, 加工过程持续约 20 d。本实验在参考文献方法^[16]基础上, 构建了模拟煮炸鹿茸加工体系, 采用传统煮炸鹿茸加工工艺参数 (表 1), 分别用 pH 5~9 的醋酸盐缓冲溶液配制底物摩尔浓度配比为 4:1~1:4 的葡萄糖和赖氨酸反应液, 将反应液加入安瓿瓶中熔封, 分别于 80~100 °C 水浴煮炸, 65~85 °C 烘烤, 100~140 min 烘烤, 烘烤后的样品置于室温下模拟风干过程, 按表 1 下水时间、次数等参数加工, 前 4 次下水每天进行 1 次, 后 2 次下水隔天进行 1 次, 每加工 1 步各取样 1 次, 每个梯度做 3 个平行, 样品放入 -80 °C 条件下储存备用。模拟煮炸鹿茸加工体系单因素试验因素及水平见表 2。

2.2 模拟煮炸鹿茸加工体系褐变指数变化

颜色变化是 Maillard 反应最典型、最直观的特征, 褐变指数是评价 Maillard 反应程度的主要特征

表 1 传统煮炸鹿茸加工工艺参数

Table 1 Processing parameters of traditional boiled *Cervi Cornu Pantotrichum*

收茸后 天数	煮炸		烘烤	
	下水次数	每次下水时间/s	温度/℃	时间/min
第 1 天	3	30、50、30	67~70	120
第 2 天	2	30、50	67~70	120
第 3 天	2	30、50	67~70	120
第 4 天	3	30、40、50	67~70	120

第 4 天后隔天进行回水处理,下水次数、每次下水时间、烘烤温度、烘烤时间同第 4 天,共回水 2 次

The processing parameters of the fifth and the sixth processing performed the next day are as same as the fourth processing, including boiling frequencies, boiling times, baking temperature and baking time

表 2 影响模拟煮炸鹿茸加工体系单因素试验设计

Table 2 Single factor experimental design of factors affecting processing system of simulated boiled CCP

因素	水平	其他条件
底物配比 (Glc-Lys)	4 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 4	pH 7; 煮炸温度 100 ℃; 烘烤温度 75 ℃; 烘烤时间 120 min
pH 值	5、6、7、8、9	Glc-Lys 1 : 1; 煮炸温度 100 ℃; 烘烤温度 75 ℃; 烘烤时间 120 min
煮炸温度/℃	80、85、90、95、100	Glc-Lys 1 : 1; pH 7; 烘烤温度 75 ℃; 烘烤时间 120 min
烘烤温度/℃	65、70、75、80、85	Glc-Lys 1 : 1; pH 7; 煮炸温度 100 ℃; 烘烤时间 120 min
烘烤时间/min	100、110、120、130、140	Glc-Lys 1 : 1; pH 7; 煮炸温度 100 ℃; 烘烤温度 75 ℃



图 1 葡萄糖-赖氨酸模拟煮炸鹿茸加工过程中 Maillard 反应变化

Fig. 1 Glucose-lysine simulates Maillard reaction color changes during boiled CCP processing

值和烘烤温度改变对模拟煮炸鹿茸加工过程体系褐变程度影响最大。

根据文献报道,不同部位鹿茸中氨基酸与还原糖含量存在显著差异^[15,19-21],不同 Lys 与 Glc 配比模拟不同部位鹿茸中氨基酸与还原糖差异。结果发现,随加工时间变化同底物配比体系褐变程度不同,当 Glc-Lys 为 1 : 1 时,体系褐变程度最大;当 Glc-Lys 为 4 : 1 和 2 : 1 时,体系 Glc 充足, Lys 不足成为限制 Maillard 反应的重要因素,高浓度 Glc 和低浓度 Lys 导致二者有效碰撞较少, Maillard 反应减

和重要指标,呈色物质在阿玛多利重排过程中产生,现多以 420 nm 处的吸光度反映体系褐变程度^[17-18]。参考文献方法^[17-18],将模拟煮炸鹿茸加工过程体系样品于 420 nm 处测定吸光度,比较体系 Maillard 反应褐变指数。模拟煮炸鹿茸加工过程中 Maillard 反应颜色变化如图 1 所示,由图可知随着鹿茸加工过程中煮炸、烘烤次数的增加,体系颜色逐渐加深, Maillard 反应不断进行, Maillard 反应副产物和类黑精不断积累。

模拟体系底物配比、pH 值、煮炸温度、烘烤温度和烘烤时间对褐变指数的影响见图 2。由图 2 可知,模拟体系底物配比、pH 值、煮炸温度、烘烤温度和烘烤时间均能对褐变指数产生影响,其中 pH

弱,褐变程度减弱;当 Glc-Lys 为 1 : 2 和 1 : 4 时,高浓度 Lys 和低浓度 Glc 同样导致二者有效碰撞较少,褐变程度减弱。

不同 pH 值条件下, Maillard 反应驱向不同,现代研究表明, Maillard 反应在较高 pH 值下更容易发生,当 pH>3 时,随着 pH 值的增加,反应越剧烈^[22-23]。如图 2 所示,不同 pH 值对体系褐变程度影响较大且随着 pH 值的增大,体系褐变程度逐渐增大。体系 pH 值为 9 时,褐变程度显著高于 pH 值为 7、8 的体系;体系 pH 值为 7、8 时,褐变程度显著高于 pH 值为 5、6 的体系。

温度是影响加工鹿茸中 Maillard 反应最直接的因素,温度越高,褐变速率越快。一般来说,温度每提高 10 ℃, Maillard 速率大约提高 3~5 倍,生成 Maillard 反应产物的种类和总量也迅速增加^[23-24]。鹿茸煮炸加工过程涉及短时间的沸水煮炸和较长时间的高温烘烤,不同加工温度的控制势必会影响 Maillard 反应进程造成褐变程度不同。如图 2 所示,随着体系煮温度的升高,褐变程度逐渐增大,当煮炸温度为 100 ℃时,体系褐变程度最大,但短时间的高温煮炸未使体系褐变指数骤升;烘烤温度对体

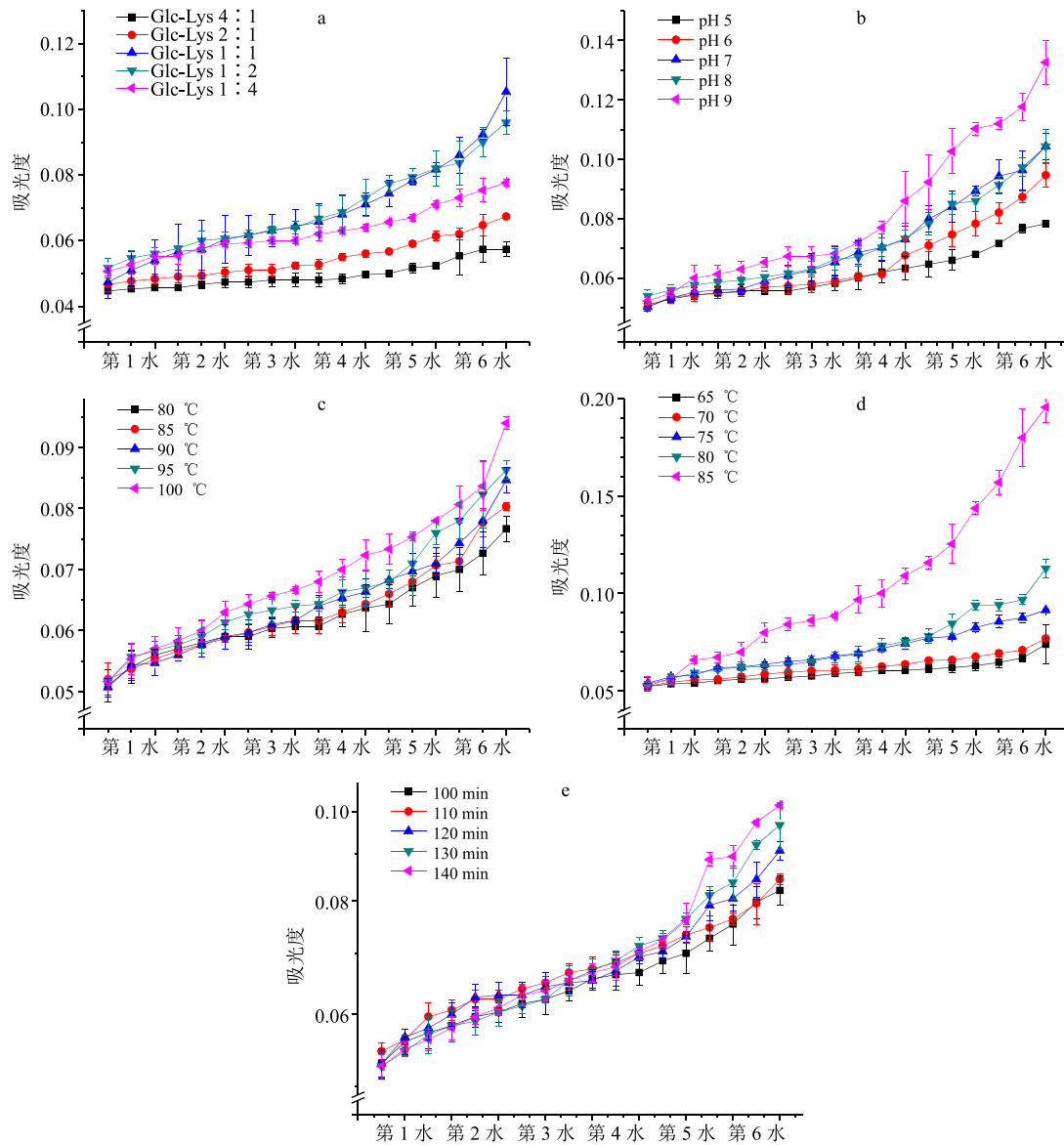


图 2 模拟体系底物配比 (a)、pH 值 (b)、煮炸温度 (c)、烘烤温度 (d) 和烘烤时间 (e) 对褐变指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of substrate ratio (a), hydrogen ion concentration (b), boiling temperature (c), baking temperature (d) and baking time (e) of simulated system on browning index ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

系褐变程度影响较大, 长时间的高温烘烤使模拟体系褐变指数骤升 (拐点)。

热加工时间对 Maillard 反应的影响也较大。如图 2 所示, 随着体系烘烤时间的延长, 体系褐变程度逐渐增大。当烘烤时间为 140 min 时, 体系褐变程度最大。

2.3 模拟煮炸鹿茸加工体系 CML 和 CEL 的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取 CML 和 CEL 对照品各 5.0 mg 置于 25 mL 量瓶中, 用超纯水溶解、定容, 混匀, 配成质量浓度为 160 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。

2.3.2 供试品溶液的制备 模拟煮炸鹿茸加工体系

样品和色谱乙腈按体积比 1 : 4 稀释, 后用 0.22 μm 有机系滤膜滤过, 作为供试品溶液, 待上机分析。

2.3.3 色谱质谱条件

(1) 液相条件: 色谱柱为 Waters Cortecs HILIC 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 3 μL ; 流动相 A 为 0.4% 甲酸乙腈溶液, B 为 50 mmol/L 甲酸铵水溶液, 梯度洗脱条件: 0~3 min, 80%~60% A; 3~3.5 min, 60%~50% A; 3.5~4.5 min, 50% A; 4.5~5 min, 50%~80% A; 5~7 min, 80% A。

(2) 质谱条件: 电离方式为正离子模式 (ESI^{+}); 扫描方式为多反应监测 (MRM), 参数见表 3; 毛

表 3 UPLC-MS 多反应监测模式 (MRM) 参数
Table 3 UPLC-MS settings for multiple reaction monitoring (MRM)

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电 压/V	碰撞能 量/eV	驻留时 间/ms
CML	205	130	18	12	36
	205	84	18	22	36
CEL	219	130	20	14	36
	219	84	20	18	36

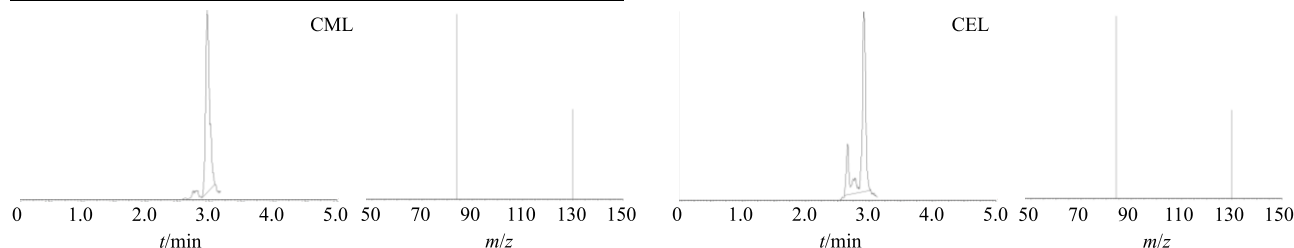


图 3 模拟煮炸鹿茸加工体系 CML 和 CEL 总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of CML and CEL of simulated boiled CCP processing system

每个质量浓度平行进样 3 次。以 CML 和 CEL 质量浓度为横坐标 (X), 峰面积的平均值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程。将“2.3.1”项下的对照品储备液用 80%乙腈溶液逐级稀释后, 按信噪比 (S/N) 为 3 的对照品溶液质量浓度为检测限 (LOD), 以 S/N 为 10 的对照品溶液质量浓度为定量限 (LOQ)。CML 和 CEL 的回归方程、线性范围、检出限和定量限结果见表 4。

(2) 精密度试验: 精密吸取同一质量浓度 (51.2 ng/mL) 的混合对照品溶液 3 μ L, 按“2.3.3”项下色谱条件进行分析, 连续进样 9 次, 测定 CML 和 CEL 峰面积及 RSD。结果表明, CML 和 CEL 的 RSD 分别为 1.88% 和 2.13%, 表明仪器精密度良好。

(3) 重复性试验: 精密吸取同一模拟煮炸鹿茸加工体系样品 6 份, 按“2.3.2”项下制得供试品溶液, 精密吸取 6 份供试品溶液各 3 μ L, 按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 测定 CML 和 CEL 峰面积, 通过回归方程计算模拟煮炸鹿茸加工体系样品中 CML 和 CEL 含量及 RSD。结果表明, CML 和 CEL 质量浓度的 RSD 分别为 1.84% 和 2.83%, 表明本实

细管电压 3.0 kV; 离子源温度 150 $^{\circ}$ C; 脱溶剂温度 450 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量 1 000 L/h; 碰撞气体流量 0.19 mL/min。模拟煮炸鹿茸加工体系样品色谱图及选择离子强度见图 3。

2.3.4 方法学考察

(1) 线性范围、检出限和定量限: 精密吸取“2.3.1”项下的混合对照品储备液, 加 80%乙腈溶液分别稀释 2、5、10、25、50、100 倍, 按“2.3.3”项下的色谱条件进样分析 CML 和 CEL 的峰面积,

验重复性良好。

(4) 稳定性试验: 精密吸取“2.3.2”项下制备的同一模拟煮炸鹿茸加工体系样品供试品溶液 3 μ L, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 测定 CML 和 CEL 峰面积, 考察仪器稳定性。结果表明, CML 和 CEL 峰面积的 RSD 分别为 1.80% 和 2.39%, 表明 UPLC-MS/MS 在 24 h 内稳定性良好。

(5) 加样回收率试验: 精密称取已知 CML 和 CEL 含量的模拟煮炸鹿茸加工体系样品 9 份, 分成低、中、高 3 组, 每组 3 个平行, 按照低、中、高水平加入适量的 CML 和 CEL 对照品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 测定峰面积, 计算 CML 和 CEL 含量及回收率。结果表明, CML 和 CEL 的回收率分别为 99.83% 和 98.34%, $RSD < 5\%$, 表明加样回收率良好。

2.4 模拟煮炸鹿茸加工体系 AGEs 含量变化

2.4.1 底物对比对 CML 和 CEL 生成量的影响

羰基化合物和氨基化合物是 Maillard 反应的底物, 其

表 4 CML 和 CEL 的回归方程、线性范围、相关系数、LOD 和 LOQ

Table 4 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, LOD and LOQ for CML and CEL

成分	回归方程	r^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
CML	$Y=36.732\ 8 X-5.172\ 27$	0.997 9	1.024~51.20	0.33	1.10
CEL	$Y=65.265\ 7 X-5.408\ 14$	0.995 8	0.512~51.20	0.16	0.54

结构、种类和浓度的不同会影响 Maillard 反应速率, 导致产物产生差异。根据文献报道, 不同部位鹿茸中氨基酸与还原糖含量存在显著差异^[15,19-20], Lys 与 Glc 不同配比同样会影响 Maillard 反应产物 AGEs 含量。本实验采用不同 Lys 与 Glc 配比模拟不同部位鹿茸中氨基酸与还原糖差异, 选取 Glc-Lys 比例分别为 4:1、2:1、1:1、1:2、1:4, 考察随加工时间变化不同底物配比体系对 CML 和 CEL 形成的影响, 结果见图 4。由图 4 可知, 模拟体系 Glc-Lys 比例为 4:1、2:1、1:1、1:2、1:4 时, 体系反应终点生成的 CML 质量浓度分别为 657.75、520.38、1 288.73、162.58、181.43 ng/mL, CEL 质量浓度分别为 44.78、62.58、303.23、45.45、47.95 ng/mL, 不同底物配比体系中生成 CML 的量显著高于 CEL 的量 ($P<0.01$)。结果表明, 当 Glc-Lys 比例为 1:1 时, 模拟体系产生的 CML 和 CEL 含量最多; 当 Glc-Lys 比例为 4:1、2:1 时, 模拟体系 Glc 充足, Lys 不足成为限制 Maillard 反应的主要因素, 高浓度 Glc 和低浓度 Lys 导致二者的有效碰撞较少, 产生的 CML 和 CEL 含量较低; 当 Glc-Lys 比例为 1:2 和 1:4 时, 同样高浓度 Lys 和低浓度

Glc 也导致二者的有效碰撞较少, 产生的 CML 和 CEL 含量较低。不同底物配比模拟体系数据可以用于评估不同部位煮炸鹿茸中 AGEs 含量。

2.4.2 pH 值对 CML 和 CEL 生成量的影响 不同 pH 值条件下, Maillard 反应趋向不同: 在中间阶段, 当 $\text{pH} \leq 7$ 时, 戊糖生成的产物主要是糠醛, 己糖主要生成羟甲基糠醛; 当 $\text{pH} > 7$ 且温度较低时, 主要生成还原酮和脱氢还原酮类; 当 $\text{pH} > 7$ 且温度较高时, 阿玛多利产物裂解产生包括 1-羟基-2-丙酮、丙酮醛、二乙酰基等物质, 后续发生反应形成醛类和 α -氨基酮类等。现代研究表明, Maillard 反应在较高 pH 值下更容易发生, 当 $\text{pH} > 3$ 时, 随着 pH 值的增加, 反应越剧烈^[23,25]。本实验选取 pH 值分别为 5、6、7、8、9, 考察随加工时间变化不同 pH 值体系对 CML 和 CEL 含量的影响, 结果见图 5。由图 5 可知, 模拟体系 pH 值为 5、6、7、8 和 9 时, 体系反应终点生成的 CML 质量浓度分别为 398.48、501.63、1 125.85、1 288.73、1 610.30 ng/mL, CEL 质量浓度分别为 0、34.58、303.23、446.65、1 297.95 ng/mL。结果表明, 随着模拟体系 pH 值的增大, 模拟体系生成 CML 和 CEL 含量逐渐增多。当体系 pH

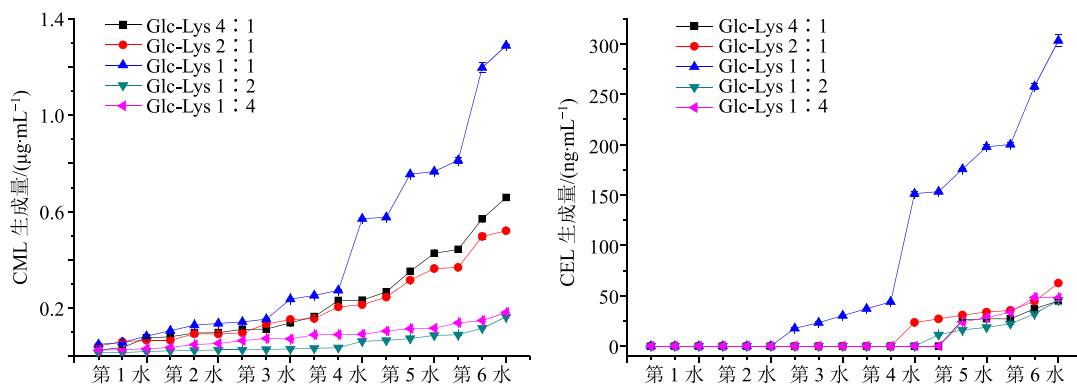


图 4 模拟体系底物比对 CML 和 CEL 生成量变化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of substrate ratio of simulated system on CML and CEL content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

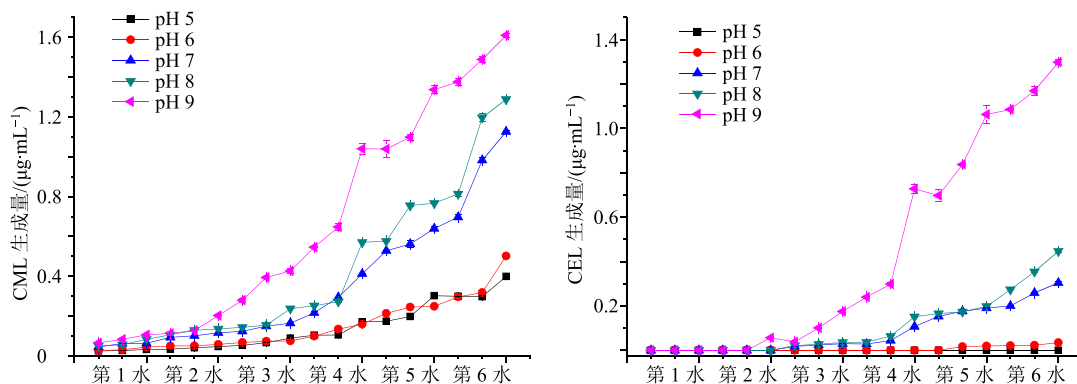


图 5 模拟体系 pH 值对 CML 和 CEL 生成量变化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of hydrogen ion concentration of simulated system on CML and CEL content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

值为 7、8 时,体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 pH 值为 5、6 体系的 2 倍;当体系 pH 值为 9 时,体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 pH 值为 7、8 体系的 2 倍,是 pH 值为 5、6 体系的 4 倍。在实际煮炸鹿茸加工过程中可以考虑通过改变体系 pH 值控制 Maillard 反应减少 AGEs 的产生。

2.4.3 煮炸温度对 CML 和 CEL 生成量的影响 Maillard 反应在任何温度下均能普遍发生,加工温度是影响加工鹿茸中 Maillard 反应最直接的因素,温度越高,褐变速率越快。一般来说,温度每提高 10 °C, Maillard 反应速率大约提高 3~5 倍,生成 Maillard 反应产物的种类和总量也迅速增加^[23]。沸水煮炸是鹿茸煮炸加工过程中较短时间的高温处理过程,不同加工温度的控制势必会造成 AGEs 含量的不同,本实验选取煮炸温度分别为 80、85、90、95、100 °C,考察随加工时间变化不同煮炸温度体系对 CML 和 CEL 含量的影响,结果见图 6。由图 6 可知,模拟体系煮炸温度为 80、85、90、95、100 °C 时,体系反应终点生成的 CML 质量分数分别为 563.90、675.20、747.38、903.90、1 288.73 ng/mL,

CEL 质量分数分别为 106.25、163.45、174.43、258.53、303.23 ng/mL。结果表明,随着模拟体系煮炸温度的升高,体系生成的 CML 和 CEL 含量逐渐增多,当煮炸温度为 100 °C 时,体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 80、85 °C 体系的 2~3 倍,但短时间的高温煮炸未使体系 CML 和 CEL 含量骤升。在实际煮炸鹿茸加工过程中可以考虑通过降低煮炸温度作为控制 Maillard 反应减少 AGEs 产生的举措。

2.4.4 烘烤温度对 CML 和 CEL 生成量的影响 如前所述,加工温度是影响加工鹿茸中 Maillard 反应最直接的因素,鹿茸煮炸加工过程中长时间的高温烘烤势必会造成 AGEs 含量变化,本实验选取烘烤温度分别为 65、70、75、80、85 °C,考察随加工时间变化不同烘烤温度体系对 CML 和 CEL 含量的影响,结果见图 7。由图 7 可知,模拟体系烘烤温度分别为 65、70、75、80、85 °C 时,体系反应终点生成的 CML 质量分数分别为 422.40、628.73、1 288.73、1 555.35、1 613.55 ng/mL, CEL 质量分数分别为 61.15、140.20、303.23、421.35、517.13 ng/mL。结果表明,随着模拟体系烘烤温度的升高,

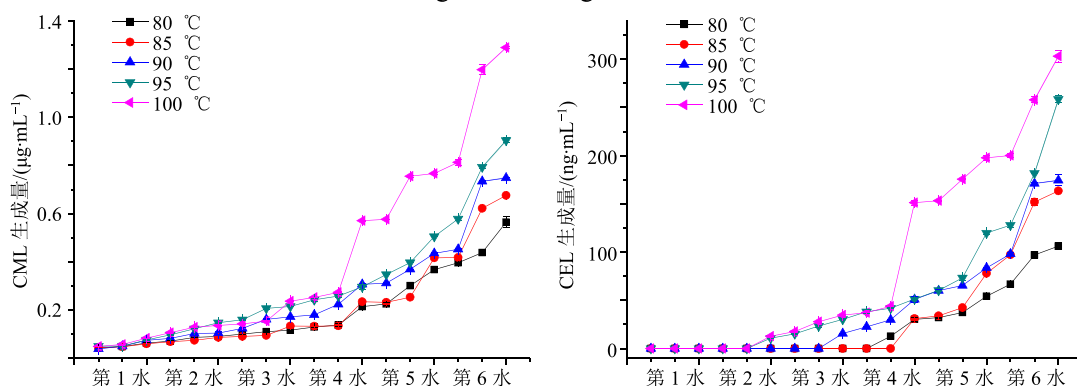


图 6 模拟体系煮炸温度对 CML 和 CEL 生成量变化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

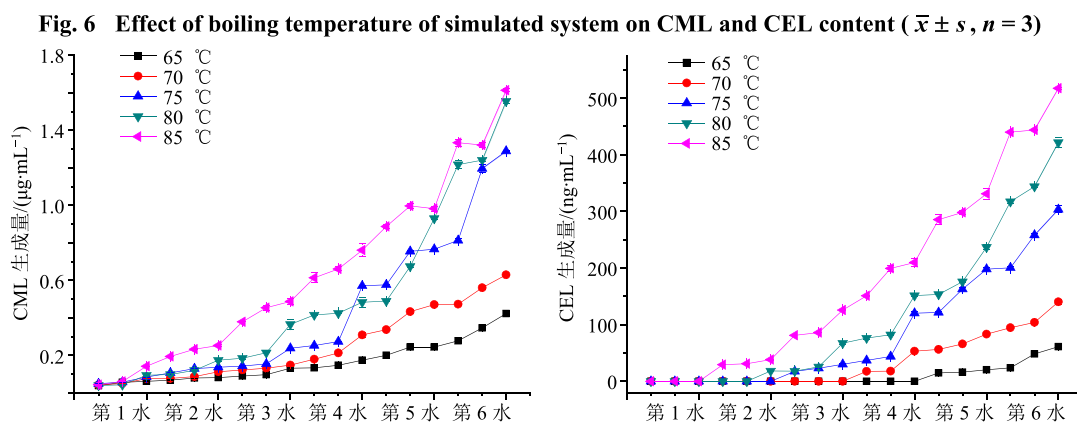


图 7 模拟体系烘烤温度对 CML 和 CEL 生成量变化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of boiling temperature of simulated system on CML and CEL content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of baking temperature of simulated system on CML and CEL content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

体系生成 CML 和 CEL 含量逐渐增多。当烘烤温度为 75、80 °C 时,模拟体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 65、70 °C 体系的 2~4 倍;当烘烤温度为 85 °C 时,模拟体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 65、70 °C 体系的 3~5 倍。此外,长时间高温烘烤使模拟体系 CML 和 CEL 含量骤升(拐点)。在实际煮炸鹿茸加工过程中可以考虑通过降低烘烤温度作为控制 Maillard 反应减少 AGEs 产生的一条重要举措。

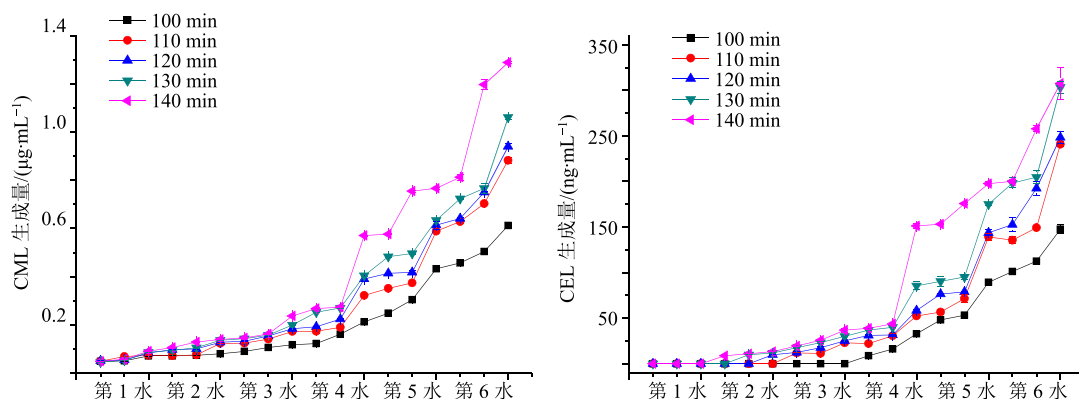


图 8 模拟体系烘烤时间对 CML 和 CEL 生成量变化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of baking time of simulated system on CML and CEL content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时,体系反应终点生成的 CML 质量分数分别为 611.75、882.23、940.35、1 061.10、1 288.73 ng/mL, CEL 质量分数分别为 147.65、240.90、248.25、303.23、307.65 ng/mL。结果表明,随着模拟体系烘烤时间的延长,体系生成 CML 和 CEL 的含量逐渐增多。当烘烤时间为 110、120、130 min 时,体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 100 min 体系的 2 倍且差异不显著 ($P>0.05$);当烘烤时间为 140 min 时,体系反应终点产生的 CML 和 CEL 含量大致为 100 min 体系的 3 倍。由此可见,在一定范围内烘烤时间对鹿茸中 AGEs 含量影响不明显,可以适当通过延长鹿茸加工过程中的烘烤时间来改善降低烘烤温度而影响的干燥度。

2.5 煮炸鹿茸加工过程中 AGEs 生成动力学分析

2.5.1 动力学模型拟合及活化能计算 模拟煮炸鹿茸加工体系中褐变指数、CML 和 CEL 含量的变化规律参考文献方法^[26-28]用 Matlab 7.0 以零级动力学模型(公式 1)和一级动力学模型(公式 2)2 种动力学模型进行线性拟合,公式如下所示。

$$C_t = C_0 + k_0 t \quad (1)$$

$$C_t = C_0 \exp(k_1 t) \quad (2)$$

C_t 代表褐变、CML 和 CEL 在任意时间的值或含量, C_0 为褐

2.4.5 烘烤时间对 CML 和 CEL 生成量的影响 热加工时间对 Maillard 反应的影响也较大,将还原糖和氨基酸模拟 Maillard 反应体系在 100 °C 加热,通过监测 420 nm 吸光度的变化发现,随着加热时间的增加吸光度与加热时间呈正相关。本实验选取烘烤时间分别为 100、110、120、130、140 min,考察随加工时间变化不同烘烤时间体系对 CML 和 CEL 含量的影响,结果见图 8。由图 8 可知,模拟体系烘烤时间分别为 100、110、120、130、140 min

变、CML 和 CEL 的起始值或含量, t 为每天加工次数, k_0 和 k_1 为反应速率

模拟煮炸鹿茸加工过程体系中褐变反应,生成 CML、CEL 反应活化能参考文献方法^[29]采用阿伦尼乌斯公式的变形公式(3)计算。由公式可知,实验测得的速率常数对数($\ln k$)与开氏温度倒数($1/T$)呈直线关系,由直线斜率($-E_a/R$)可求得活化能 E_a ,实验结果用 Athena Visual Studio 14.2 进行处理,求解活化能(E_a)。

$$\ln k = -E_a/(RT) + \ln A \quad (3)$$

k 代表反应速率常数; E_a 代表活化能(kJ/mol); R 代表摩尔气体常数,为 8.314 J/(mol·K); T 代表开尔文温度(K); A 代表指前因子或频率因子

2.5.2 煮炸温度对体系褐变、CML 和 CEL 形成动力学分析 煮炸温度对模拟鹿茸加工体系中褐变(k_1)、CML(k_2)和 CEL(k_3)生成的动力学参数影响见表 5。煮炸温度为 80、85、90、95、100 °C 时,褐变程度、CML 和 CEL 生成量与反应时间均呈线性关系,符合零级动力学模型,拟合系数为 0.76~0.96。褐变速率, CML 和 CEL 生成速率随煮炸温度的升高逐渐升高,其中 CML 的生成速率显著高于 CEL 的生成速率($P<0.05$)。模拟鹿茸加工

表 5 煮炸温度影响模拟煮炸鹿茸加工体系动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of boiling temperature on kinetic parameters of simulated boiled CCP processing system ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

煮炸温度/℃	反应速率/d ⁻¹		
	褐变	CML	CEL
80	0.041±0.002	79.995±1.160	16.967±0.710
85	0.042±0.001	96.952±0.370	24.637±0.300
90	0.052±0.009	111.646±0.360	28.133±0.220
95	0.051±0.004	128.246±0.770	35.145±0.220
100	0.058±0.002	204.852±0.600	52.893±0.970
E_a /(kJ·mol ⁻¹)	5.07	40.44	78.47

体系发生褐变的活化能为 5.07 kJ/mol, 所需能量较低, 极容易发生; 反应生成 CML 和 CEL 的活化能分别为 40.44、78.47 kJ/mol, 表明生成 CEL 所需能量较高, 因此生成 CEL 的反应比生成 CML 反应更难发生。

2.5.3 烘烤温度对体系褐变、CML 和 CEL 形成动力学分析 烘烤温度对模拟鹿茸加工体系中 k_1 、 k_2 和 k_3 的动力学参数影响见表 6。烘烤温度为 65、70、75、80、85 ℃时, 褐变程度, CML 和 CEL 生成量与反应时间也符合零级动力学模型, 拟合系数为 0.81~0.98。褐变速率, CML 和 CEL 生成速率随烘烤温度的升高逐渐升高。模拟鹿茸加工体系发生褐变的活化能为 6.72 kJ/mol, 极容易发生; 反应生成 CML 和 CEL 的活化能分别为 89.34、164.77 kJ/mol, CEL 同样较难生成。

通过比较发现, 烘烤过程温度变化对模拟鹿茸加工体系 k_1 、 k_2 、 k_3 和活化能的影响显著高于煮炸过程, 以 k_2 为例温度每提高 5 ℃, 烘烤过程反应速率的增加量显著高于煮炸过程。但烘烤过程中 k_1 、

表 6 烘烤温度影响模拟煮炸鹿茸加工体系动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of baking temperature on kinetic parameters of simulated boiled CCP processing system ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

煮炸温度/℃	反应速率/d ⁻¹		
	褐变	CML	CEL
65	0.022±0.006	57.370±0.910	7.895±0.850
70	0.034±0.002	102.363±0.660	22.948±0.460
75	0.061±0.006	204.852±0.600	51.634±0.640
80	0.087±0.004	238.137±1.470	69.381±0.630
85	0.128±0.012	259.443±0.590	91.663±0.570
E_a /(kJ·mol ⁻¹)	6.72	89.34	164.77

k_2 和 k_3 的活化能显著高于煮炸过程, 这可能归因于尽管烘烤过程 Maillard 反应褐变、生成 CML 和 CEL 需要更多的活化能, 反应更难发生, 但烘烤过程为持续长时间较高温度加工的过程, 鹿茸在烘烤加工过程中发生 Maillard 反应生成了较多的 CML 和 CEL, 这与前文生成规律结果相吻合。

3 讨论

3.1 模拟煮炸鹿茸加工体系 CML 和 CEL 分析

CML 和 CEL 为强极性化合物, 在大多数反相色谱柱中难以保留, Schettgen 等^[30]研究表明, 在流动相中添加三氟乙酸能显著增强 C₁₈ 填料对 CML 和 CEL 的保留, 且有改善峰型的效果。但三氟乙酸等难挥发酸会降低质谱的灵敏度和使用寿命, 因此在实际操作中尽量避免使用。HILIC 色谱柱采用亲和色谱的分离原理, 相对于其他色谱柱能最大限度地保留和分离高极性化合物。本实验前期比较了 Waters BEH C₁₈、HSS T₃、HILIC 和 Cortecs HILIC 四种色谱柱对 CML 和 CEL 的分离效果, 结果发现, 在相同溶剂系统下 CML 和 CEL 在 BEH C₁₈、HSS T₃ 色谱柱中基本没有保留, HILIC 色谱柱分离度和峰型较差, Cortecs HILIC 具有较好的峰对称性和更少的杂峰。此外, 通过在流动相中添加甲酸和甲酸铵能明显改善 CML 和 CEL 的拖尾现象。

3.2 煮炸鹿茸加工过程中 AGEs 生成规律

通过构建模拟鹿茸加工过程 Maillard 反应体系, 探讨底物配比、pH 值、煮炸温度、烘烤温度和烘烤时间对鹿茸中 AGEs 含量和生成规律的影响发现, 鹿茸中 Glc 和 Lys 配比, 体系 pH 值, 加工过程中的煮炸温度、烘烤温度和烘烤时间均在一定程度上影响其 AGEs 含量。其中, pH 值和烘烤温度对 AGEs 生成影响最大, 可以考虑通过降低体系 pH 值, 降低煮炸和烘烤温度, 适当延长烘烤时间来降低煮炸鹿茸中 AGEs 含量。

3.3 煮炸鹿茸加工过程 AGEs 生成动力学表征

通过构建模拟鹿茸加工过程 Maillard 反应体系, 结合实验测得数据对煮炸鹿茸加工过程褐变和 AGEs 生成动力学进行表征。动力学分析表明, 烘烤过程较煮炸过程发生褐变、生成 CML 和 CEL 需要更多的活化能, 长时间的较高温度烘烤使煮炸鹿茸中产生了较多的 AGEs。研究鹿茸中 AGEs 生成规律、表征其动力学参数为改变加工工艺降低煮炸鹿茸中 AGEs 含量提供了依据, 为生产绿色、安全的鹿茸提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Eichner K, Cinerdorus M. Early indication of the Maillard reaction by analysis of reaction intermediates and volatile decomposition products [J]. *Prog Food Nutr Sci*, 1981, 8(1): 82090-82097.
- [3] 宫瑞泽, 霍晓慧, 张 磊, 等. 美拉德反应对中药品质的影响及调控研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 243-251.
- [4] 王 淳, 宋志前, 宁张弛, 等. 黄精炮制二氯甲烷组分 Maillard 反应产物及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 604-610.
- [5] Goldberg T, Cai W, Peppas M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods [J]. *J Am Diet Assoc*, 2004, 104(8): 1287-1291.
- [6] Troise A D, Fiore A, Wiltafsky M, et al. Quantification of *N*^ε-(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine), *N*^ε-(carboxymethyl)-L-lysine (CML), *N*^ε-(carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and total lysine through stable isotope dilution assay and tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 188(1): 357-364.
- [7] Hulla G L J, Ames J M, Cuskelly G J. *N*^ε-(carboxymethyl) lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet [J]. *Food Chem*, 2012, 131(1): 170-174.
- [8] Reynaert N L, Gopal P, Rutten E P A, et al. Advanced glycation end products and their receptor in age-related, non-communicable chronic inflammatory diseases: Overview of clinical evidence and potential contributions to disease [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2016, 81(Pt B): 403-418.
- [9] De Vos L C, Lefrandt J D, Dullaart R P, et al. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 254(2016): 305-313.
- [10] Drenth H, Zuidema S U, Krijnen W P, et al. Advanced glycation end-products are associated with the presence and severity of paratonia in early stage Alzheimer disease [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2017, 18(7): 636-637.
- [11] Henle T. AGEs in foods: Do they play a role in uremia? [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(84): 145-147.
- [12] Helen V, Marcia Rashelle P. Glycoxidation: The menace of diabetes and aging [J]. *Mt Sinai J Med*, 2003, 70(4): 232-241.
- [13] Gong R Z, Wang Y H, Wang Y F, et al. Simultaneous determination of *N*^ε-(carboxymethyl) lysine and *N*^ε-(carboxyethyl) lysine in different sections of antler velvet after various processing methods by UPLC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3316-3329.
- [14] Gong R Z, Wang Y H, Gao K, et al. Quantification of furosine (*N*^ε-(2-furoylmethyl)-L-lysine) in different parts of velvet antler with various processing methods and factors affecting its formation [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1255-1269.
- [15] 宫瑞泽, 王燕华, 赵 卉, 等. 鹿茸加工过程中 5-羟甲基糠醛的产生及影响因素探讨 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3270-3278.
- [16] 李和平, 王春生. 生态养鹿 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [17] 王 晨, 李 普, 卢永翎, 等. 豆乳加工中晚期糖基化终产物的调控 [J]. 食品科学, 2017, 38(13): 47-52.
- [18] 滕 静, 李仲禧, 胡晓倩, 等. 柚皮素对 3 种美拉德化学反应模型中挥发物形成、褐变强度及抗氧化能力的影响 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 9-18.
- [19] 王燕华, 张秀莲, 赵 卉, 等. 不同加工方式对鹿茸中粗蛋白与水解氨基酸量的影响研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3085-3091.
- [20] 宫瑞泽, 王燕华, 祁玉丽, 等. 不同加工方式对鹿茸中水溶性多糖含量及单糖组成的影响 [J]. 色谱, 2019, 37(2): 194-200.
- [21] 刘松鑫, 宫瑞泽, 王泽帅, 等. 不同形态梅花鹿鹿茸的化学成分对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 67-75.
- [22] 汪东风. 食品化学 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [23] 龚巧玲, 张建友, 刘书来, 等. 食品中的美拉德反应及其影响 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 330-334.
- [24] Gu F, Jin M K, Hayat K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system [J]. *Food Chem*, 2009, 117(1): 48-54.
- [25] 邵澜媛, 周建伟, 刘东红. 食品中美拉德反应机理及动力学模型的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 103-112.
- [26] 张玉玉, 张 兴, 章慧莺, 等. 3 种单糖模拟体系中 5-羟甲基糠醛的形成动力学分析 [J]. 食品科学, 2014, 35(17): 41-47.
- [27] 孙 颖, 张莉莉, 张玉玉, 等. 6 种糖-酶解液模型体系中 5-羟甲基糠醛的形成动力学分析 [J]. 食品科学, 2018, 39(23): 82-88.
- [28] 张玉玉, 张 兴, 章慧莺, 等. 双糖体系中 5-羟甲基糠醛的形成动力学分析 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 93-100.
- [29] 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.
- [30] Schettgen T, Tings A, Brodowsky C, et al. Simultaneous determination of the advanced glycation end product *N*^ε-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387(8): 2783-2791.