

半胱氨酸消减丙烯酰胺的机理及消减工艺在薯条中的应用

黄才欢, 李丹, 龙成艳, 郑洁, 龚启宙, 欧隽滢

Mechanism of Acrylamide Elimination by Cysteine and Its Application in Potato Chips

HUANG Caihuan, LI Dan, LONG Chengyan, ZHENG Jie, GONG Qizhou, and OU Juanying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010130>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

荸荠皮提取物对土豆脆片焙烤中丙烯酰胺抑制效果的影响

Effects of Extracts of *Eleocharis tuberosa* Peel on the Inhibition of Acrylamide in Potato Chips Baking

食品工业科技. 2018, 39(21): 1–4

色氨酸在Nafion-聚半胱氨酸修饰电极上的电化学行为及分析测定

Electrochemical behavior and determination of tryptophan at the nafion and L-cysteine modified electrode

食品工业科技. 2018, 39(12): 267–270,283

原花青素对Glu-Asn体系中丙烯酰胺的抑制作用研究

Effect of the procyanidins of acrylamide inhibition in glucose-asparagine model system

食品工业科技. 2017(11): 116–121

半胱氨酸处理对采后金针菇品质和抗氧化活性的影响

Effects of Cysteine Treatment on the Quality and Antioxidant Activity in Postharvest *Flammulina velutipes*

食品工业科技. 2021, 42(16): 303–310

缓解食品中丙烯酰胺和5-羟甲基糠醛形成的研究进展

Mitigation Strategies on Acrylamide and 5-Hydroxymethylfurfural in Foods

食品工业科技. 2020, 41(12): 324–333,347

食品中丙烯酰胺检测方法研究进展

Research Progress of Detection Methods of Acrylamide in Food Products

食品工业科技. 2020, 41(14): 329–336



关注微信公众号，获得更多资讯信息

黄才欢, 李丹, 龙成艳, 等. 半胱氨酸消减丙烯酰胺的机理及消减工艺在薯条中的应用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 287–295.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010130

HUANG Caihuan, LI Dan, LONG Chengyan, et al. Mechanism of Acrylamide Elimination by Cysteine and Its Application in Potato Chips[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 287–295. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010130

· 食品安全 ·

半胱氨酸消减丙烯酰胺的机理及消减 工艺在薯条中的应用

黄才欢¹, 李 丹¹, 龙成艳¹, 郑 洁¹, 龚启宙², 欧隽滢^{3,*}

(1.暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632;

2.中山洪力健康食品产业研究院有限公司, 广东中山 528430;

3.暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: L-半胱氨酸在模拟体系中可显著降低丙烯酰胺的含量, 并形成新物质。本研究旨在制备出高纯度的半胱氨酸-丙烯酰胺加合物, 阐明半胱氨酸消减丙烯酰胺的机理, 并探索该消减工艺在薯片加工中的应用。首先通过优化反应条件, 制备目标加合物, 使用反相柱层析法分离纯化出高纯度加合物, 综合运用质谱、核磁共振和紫外光谱等现代波谱分析技术解析加合物结构, 阐析半胱氨酸消减丙烯酰胺的机理; 以 Caco-2 细胞体外实验评估加合物的细胞毒性, 通过 UPLC-MS 检测不同浓度半胱氨酸溶液预处对薯片中丙烯酰胺的消减作用。结果表明: 半胱氨酸与丙烯酰胺的物料比为 1:3, 120 ℃ 反应 3 h, 可获得目标加合物最大生成量; 色谱分离可得到纯度达 95% 的加合物, 其紫外最大吸收波长为 196 nm, 相对分子量为 192.0641, 分子式为 $C_6H_9NO_3S$, 是由半胱氨酸的巯基与丙烯酰胺的烯基通过迈克尔加成反应形成; 加合物培养 Caco-2 细胞 24 和 48 h 后, 其细胞毒性明显低于丙烯酰胺; 在油炸前浸泡薯片的半胱氨酸溶液浓度为 3 和 5 g/L 时, 薯片中丙烯酰胺的消减率均高于 83%, 并检测出一定量的加合物。可见, 半胱氨酸可通过与丙烯酰胺形成加合物显著降低油炸薯片中的丙烯酰胺含量。

关键词: 丙烯酰胺, 半胱氨酸, 加合物, 消减作用, 细胞毒性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)22-0287-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010130

本文网刊:



Mechanism of Acrylamide Elimination by Cysteine and Its Application in Potato Chips

HUANG Caihuan¹, LI Dan¹, LONG Chengyan¹, ZHENG Jie¹, GONG Qizhou², OU Juanying^{3,*}

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Zhongshan Hongli Health Food Industry Research Institute Co., Ltd., Zhongshan 528430, China;

3. Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: L-cysteine can significantly reduce the content of acrylamide and form new substances. To clarify the reduction mechanism and apply it in potato chip processing, a high purity cysteine-acrylamide adduct was prepared. The target adduct was synthesized by optimizing the reaction conditions, followed by reversed-phase column chromatography for separation and purification. Its structure was identified by mass spectrometry, nuclear magnetic resonance and ultraviolet spectroscopy, and the reduction mechanism was correspondingly elucidated. The cytotoxicity of adducts was evaluated with Caco-2 cell line. Furthermore, potato chips were pretreated with cysteine solutions and the reduction of acrylamide was detected by UPLC-MS. The results showed that the adduct with 95% purity could be obtained when the optimum reaction

收稿日期: 2022-01-18

基金项目: 广东省自然科学基金 (2018A030313064); 广州市民生科技攻关计划项目 (201903010004); 中山火炬现代产业工程技术研究院创新中心项目 (2019CYY01002)。

作者简介: 黄才欢 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: thamy@jnu.edu.cn。

* 通信作者: 欧隽滢 (1992-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全, E-mail: ojy_26@163.com。

ratio of cysteine and acrylamide was 1:3 at 120 ℃ for 3 h. Its molecular formula was C₆H₉NO₃S, with relative molecular weight of 192.0641 and maximum UV absorption wavelength of 196 nm. It was formed by Michael addition reaction between the sulphydryl group of cysteine and the alkenyl group of acrylamide. Compared to acrylamide, the cytotoxicity of the adduct was significantly lower after 24 and 48 h treatment. Potato chips soaked in cysteine solutions of 3 and 5 g/L before frying obtained over 83% of acrylamide reduction rate. In addition, a certain amount of adduct was detected in such potato chips, indicating that cysteine could significantly reduce the acrylamide content in fried potato chips by forming acrylamide adduct.

Key words: acrylamide; cysteine; adduct; reductive effect; cytotoxicity

丙烯酰胺(acrylamide, AA)是一种公认的神经毒素和潜在的致癌物^[1],并表现出一定的具有生殖毒性^[2]和免疫毒性^[3]。自 2002 在薯片中检测出大量丙烯酰胺以来,咖啡、方便面、饼干和曲奇等食品中均被检出大量的丙烯酰胺^[4],其平均暴露量为 0.4~1.6 μg/kg/d,其中薯片占比最高,达到 23%^[5]。高温加工食品的安全性引起人们极大关注。

近年来,人们致力于减少丙烯酰胺形成的研究,发现丙烯酰胺主要形成途径是天冬酰胺与还原糖(或活泼碳基化合物)发生美拉德反应^[6],适当控制工艺条件、添加食品添加剂和配料两种措施均可减少制品中的丙烯酰胺。Liyanage 等^[7]通过浸泡、烫漂、发酵等方式降低原料中游离天冬氨酸和还原糖含量来减少丙烯酰胺的形成; Krishnakuma 等^[8]综述了通过控制加工温度、时间和水分活度等工艺条件抑制丙烯酰胺的形成;另外,氨基酸^[9]、酶制剂^[10]、多酚类^[11]和益生菌^[12]等物质均被用于控制丙烯酰胺的形成。氨基酸作为良好的亲核试剂,可与丙烯酰胺发生迈克尔加成反应,从而显著减少丙烯酰胺的含量。半胱氨酸是食品中常见的氨基酸,可用于面包、乳制品、肉制品和面糖制品中。我国 GB 2760-2014 食品添加剂使用标准中,L-半胱氨酸既可作为天然香料用于改善食品风味,又可作为面粉处理剂改善面团特性^[13]。美国、加拿大和日本等国家的食品法律法规允许把 L-半胱氨酸用作面包添加剂。L-半胱氨酸分子中同时含有氨基和巯基,具有较强的亲核能力和很强的抗氧化性。在高温条件下,往油中加入少量半胱氨酸能防止油脂氧化的发生^[14]。此外,L-半胱氨酸能通过迈克尔加成反应和美拉德反应与羟甲基糠醛(HMF)发生反应,从而降低高温加工食品中内源性危害物 HMF 的含量^[15]。Yoshioka 等^[9]研究了罐装牛奶咖啡中赖氨酸残基和半胱氨酸残基可显著降低制品中丙烯酰胺的含量,且在牛奶蛋白中检测出含赖氨酸丙烯酸和半胱氨酸丙烯酸的硫化物。过去十多年,大多数研究主要着眼于丙烯酰胺的消减,而对消减产物的报道不多。

前期研究表明,半胱氨酸与丙烯酰胺在 160 ℃反应 15 min 后,其对丙烯酰胺的消除率可达 94.6%,采用液相色谱-质谱联用仪可检测到由一分子半胱氨酸与一分子丙烯酰胺形成的物质信号(m/z 193, ESI⁺)^[16]。因半胱氨酸分子中的 α -NH₂ 和侧链上的

-SH 与丙烯酰胺均可发生加成反应,推测 L-半胱氨酸是通过亲核反应形成加合物来消减体系中的丙烯酰胺。基于对食品安全的考量,有必要明确新生成的加合物结构,并评价加合物会否产生新的食品安全隐患。本研究优化了半胱氨酸与丙烯酰胺加合物形成的反应条件,结合采用常压和高压柱层析法制备出高纯度的加合物,综合运用紫外、质谱与核磁共振等现代波谱技术解析加合物的结构,并采用体外细胞(Caco-2)实验初步评价其细胞毒性。以液相色谱-质谱联用的多反应监测模式(MRM)测定了市售和自制薯片(油炸前经不同浓度半胱氨酸溶液浸泡过)中丙烯酰胺、丙烯酰胺-半胱氨酸加合物的含量,探究采用 L-半胱氨酸控制高温加工食品中丙烯酰胺形成的可行性,为有效控制食品中内源性化学危害物提供一种新思考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

丙烯酰胺(Acrylamide, AA)(99%)、半胱氨酸(Cysteine, Cys)(99%) 北京百灵威科技有限公司;甲醇 色谱纯, 美国 Mallinckrodt Baker 公司;重水(D₂O) Cambridge Isotope Laboratories;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂;反相硅胶(A-HG) 日本东京 YMC 有限公司;鲜切薯片(A、B、C 3 个不同品牌) 兴安超市;0.45 μm 聚醚砜微孔滤膜、0.22 μm 尼龙微孔滤膜 天津津腾实验设备有限公司。

Welch 液相色谱柱 Ultimate XB-C₁₈(10×250 mm, 5 μm) 上海屹立利科学仪器有限公司;Waters 液相色谱柱 Atlantis T3(4.6×150 mm, 5 μm)、Waters Alliance e2695 液相色谱仪(配备 2998 PDA 检测器)

美国沃特世公司;磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司;精密电子天平 广州市艾安得仪器有限公司;三重四级杆液质联用仪(LC-MS8045, 配备电喷雾离子源) 日本岛津制作所;N-1300 型旋转蒸发仪 东京理化器械株式会社;Scientz-10N 型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技有限公司;X500R QTOF 型高分辨质谱仪 美国 SCIEX 公司;600 MHz Avance III 型核磁共振仪 瑞士布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 半胱氨酸对丙烯酰胺的消减反应 配制 5.0 mmol/L Cys 和 0.5 mmol/L AA 溶液,各取 2.0 mL

置于 10.0 mL 具塞不锈钢钢管中, 密封, 取 2.0 mL 纯水以及 2.0 mL 0.5 mmol/L AA 溶液作为空白对照组, 两组反应在 160 °C 恒温油浴下加热 20 min, 取出试管并在冰水浴中冷却; 反应液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 置于 1.5 mL 样品瓶, 备用, 每个样品三次平行。反应液中 AA 的含量测定方法采用 Yu 等^[16] 报道的液相色谱法, 制作标准曲线的 AA 浓度依次为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mmol/L。根据标准曲线计算出反应液中实验组(a_1)和空白对照组(a_2)剩余的 AA 浓度, 并计算反应中 AA 的消除率。

$$\text{AA消除率}(\%) = \frac{a_2 - a_1}{a_2} \times 100$$

式中: a_1 : 加入 Cys 后 AA 浓度平均值; a_2 : 空白对照组 AA 浓度平均值。

1.2.2 消除反应条件的优化

1.2.2.1 反应体系 pH 的选择 分别用 pH 为 6.0、7.0 和 8.0 磷酸盐缓冲溶液配制 AA 和 Cys 溶液(25.0 mmol/L)设置了 3 个不同 pH 的反应体系, 于 120 °C 油浴反应 3 h, 采用液相色谱法测定加合物含量。因加合物的生成量与其在液相谱图上的峰面积成正比, 为此以加合物峰面积大的反应体系进行后续实验。

1.2.2.2 反应温度的选择 把 pH7.0 的 AA 和 Cys 溶液分别置于温度为 90、120、150 与 180 °C 的油浴中反应 3 h, 生成物采用液相色谱法测定, 以加合物峰面积最大的反应温度进行后续实验。

1.2.2.3 反应时间的选择 把一定量 pH7.0 的 AA 和 Cys 溶液分别在 120 °C 油浴反应 1、2、3 和 4 h 后, 生成物采用液相色谱法测定, 选择加合物峰面积最大的反应时间进行后续实验。

1.2.2.4 物料比 把一定量 pH7.0 的 AA 和 Cys 溶液混合, 使其浓度比分别为 1:0.5、1:1、1:3 和 1:5, 120 °C 油浴反应 3 h, 采用液相色谱法测定加合物的含量, 比较不同物料比对丙烯酰胺-半胱氨酸加合物生成量的影响, 选出最佳物料比制备加合物。

1.2.3 液相色谱法检测加合物 参考 Jiang 等^[17] 的方法鉴定反应产物。色谱条件: 色谱柱为 Waters Atlantis T3, 4.6 mm×150 mm, 5 μm。HPLC 分析程序: 流动相 A 为色谱级甲醇, B 为 0.1% 乙酸水溶液; 分析条件: 流动相 $V_A:V_B=2:98$, 流速 0.4 mL/min, 进样体积 0.5 μL, 柱温 40 °C, 检测波长 205 nm, 根据加合物的保留时间进行定性; 并采用面积归一化计算加合物纯度。

1.2.4 加合物的制备与分离

1.2.4.1 半胱氨酸与丙烯酰胺加合物的制备 根据优化的结果选择合适的反应条件制备加合物, 采用减压浓缩法把反应液浓缩至约为 3.0 mL, 加入到 20.0 mL 甲醇, 抽滤; 再用 10.0 mL 甲醇洗涤固体样品, 抽滤, 把 2 次得到的滤液合并, 减压浓缩, 得浓缩

液和固体, 备用。以液相色谱法分别测定浓缩液和固体中加合物的量。

1.2.4.2 反相硅胶柱层析法分离加合物 参照邹照佳等^[18] 的方法, 采用常压柱层析法分离加合物, 固定相为 A-HG 反相硅胶。样品用 3.0 mL 5.0% 的甲醇水溶液溶解后湿法上样, 分别以 5.0%、10.0%、20.0%、40.0% 和 60.0% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱, 收集各洗脱组分, 用液相色谱法监测各组分中加合物的含量。

1.2.4.3 高效液相色谱法纯化加合物 采用半制备色谱柱 Ultimate XB-C₁₈ 柱(10 mm×250 mm, 5 μm) 在 Waters e2695 进一步纯化反相硅胶柱层析收集到的加合物。色谱条件: 流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=2:98$; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 210 nm; 进样量: 50.0 μL。按不同的保留时间收集到 4 个组分: 组分 A(11.8~13.0 min)、组分 B(13.4~14.7 min)、组分 C(14.8~16 min) 和组分 D(16.5~18.4 min), 并以液质联用法(LC-MS)测定这 4 个组分的分子量。

1.2.5 加合物的结构表征

1.2.5.1 分子量的确定 将 1.0 mg 纯化后的加合物溶于纯水中, 用液相色谱仪测定样品的纯度, 并得到加合物的紫外光谱图; LC-MS 法测其一级、二级质谱图; 高分辨质谱法(HRMS)测得其相对分子质量。LC-MS 条件: 色谱柱为 Atlantis T3, 4.6 mm×150 mm, 5 μm; 流动相 A 为色谱级甲醇, B 为 0.1% 乙酸水溶液; 分析条件: 流动相 $V_A:V_B=2:98$, 流速 0.4 mL/min, 进样体积 0.5 μL, 柱温 40 °C, 检测波长 205 nm; 离子源为电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 扫描范围为 m/z 50~500; 源温度为 300 °C, 去溶剂化温度为 250 °C, 毛细管电压为 4000 V, 扫描速率为 1000 Da/sec, 碰撞能量为 15 eV。

1.2.5.2 ¹H 和¹³C 核磁共振谱检测 取 15.0 mg 化合物溶于 0.55 mL 氯代甲醇中, 用核磁共振仪分别测定化合物的氢谱(¹H, 600M)、碳谱(¹³C, 200M)和 Dept-135 谱图。

1.2.6 加合物的细胞毒性实验 采用 MTT 法^[19] 分别测定 Cys、AA 及加合物对人肠道细胞 Caco-2 的细胞毒性。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 Caco-2 细胞, 把细胞密度调节到 5.0×10^5 个/mL 置于培养瓶中, 往 96 孔细胞培养板上加入 100.0 μL 细胞悬液, 细胞悬液共分 3 组, 分别以不同浓度的半胱氨酸、丙烯酰胺、加合物孵育细胞及空白对照组, 每个浓度设置 3 个复孔; 并设一组空白对照组(设三个复孔)。加样后, 参照 Zou 等^[20] 方法培养细胞, 置于培养箱分别培养 24 和 48 h, 用适量的 PBS 溶液冲去化合物并移除 PBS 溶液, 每孔加入含有 5.0 mg/mL MTT 的培养基 200.0 μL, 37 °C 再培养 4 h。终止培养后, 移除培养液, 加入 150.0 μL DMSO 溶液, 振荡 10 min, 在酶标仪上测定 570 nm 处光密度值(OD 值)。

$$\text{细胞生长率}(\%) = \frac{A_1}{A_2} \times 100$$

式中: A_1 为加药组 OD 值平均值; A_2 为对照组 OD 值平均值。

1.2.7 消减工艺在薯片加工中的应用 为了比较 Cys 对薯片中 AA 的消减作用, 分别测定了市售薯片及经不同浓度 Cys 溶液预处理的自制薯片中加合物和 AA 的含量。

1.2.7.1 薯片的制备 自制薯片参照郭鸿阳等^[21]的方法进行前处理, 将清洗干净的马铃薯去皮, 用刨刀切成 0.25 cm 厚的均匀薄片, 称取 4 份样品, 每份 150.0 g, 先用去离子水清洗薄片表面的淀粉, 再用含 Cys 的水溶液浸泡马铃薯片 60 min(浸泡液中 Cys 的浓度分别为 0、1.0、3.0 和 5.0 g/L, 对应编号为自制 1、2、3、4(自制 1 为空白对照, 即油炸前只用纯水浸泡的), 沥干水分后, 用 165 °C 的花生油炸 5.0 min, 沥去表面的油, 备用)。

1.2.7.2 薯片中丙烯酰胺和加合物的提取和含量测定 分别称取 4.0 g 薯片, 研碎, 索氏抽提法除油, 再分别用 20.0、10.0 和 10.0 mL 10.0% 甲醇水溶液在常温振荡提取 3 次, 合并提取液, 8000 r/min 离心, 收集上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 参考刘刚等^[22]的方法用岛津 HPLC-MS 仪器测定, 采用具有灵敏、准确和特异性强的 MRM 模式对其进行定量分析, 平行三次。

HPLC 色谱条件: 色谱柱(Waters Atlantis T3, 4.6×150 mm, 5 μm); 流动相 A: 色谱级甲醇, 流动相 B: 0.1% 乙酸水溶液; 初始比例 $V_A : V_B = 2 : 98$, 流速: 0.5 mL/min, 进样体积为 10.0 μL, 洗脱程序: 0~2 min, 2.0% B~100.0% B; 2~8 min, 100.0% B~100.0% B; 8~10 min, 100.0% B~2.0% B; 10~18 min, 2% B。质谱条件: ESI⁺, 采用多反应监测(MRM)模式; 源温度 300 °C, 去溶剂化温度 250 °C, 毛细管电压 4000 V, 扫描速率 1000 Da/sec, 碰撞能量为 7.0~23.0 eV, Dwell time 均为 100.0 ms。丙烯酰胺和加合物的定量离子

对和定性离子对如表 1 所示。AA 标准曲线的浓度依次为: 0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 μg/L; 目标加合物标准曲线的浓度为: 0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0、120.0 μg/L。

表 1 丙烯酰胺和加合物的定性定量离子对
Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair of AA and target adduct

待测物	前体离子	定量离子	定性离子
丙烯酰胺	72.10	55.05	44.05、27.10
目标加合物	193.10	130.10	161.05、104.10

1.3 数据处理

数据采用 Microsoft Excel 处理, 用平均数±标准差(mean±SD)表示, 方差分析和 Duncan's 显著性差异分析采用 SPSS22.0 软件处理, 每组实验重复三次。

2 结果与分析

2.1 半胱氨酸对丙烯酰胺的消减及加合物的发现

Cys 与 AA 在 160 °C 下反应 20 min 后, 由 HPLC 测量结果可知, 样品中 AA 含量明显降低, 其消减率为 $61.87\% \pm 4.3\%$, AA 定量标准曲线为 $y=82.947x - 1.8369, R^2=0.9998$ 。

另外, 在生成物的液相色谱图中发现除了 Cys 和 AA 的峰外, 还出现了 1 个新的峰, 其保留时间为 13.5~14.2 min(图 1); 通过 HPLC-MS(ESI⁺)检测可知, 新出现的峰含有 m/z 193 的组分; 由文献报道可知^[23~24], 当 Cys 与 AA 发生迈克尔加成反应, 可形成分子量为 192 的物质。

2.2 加合物制备条件的优化

在液相色谱图中以新生成物的峰面积为指标, 比较不同反应体系、反应温度、反应时间和物料比对加合物形成的影响。结果显示(图 2), 在 3 个体系中, pH7.0 体系中可检测到加合物的峰面积最大, 其次是 pH6.0 的弱酸性体系, 可见中性条件下更有利加合物的生成; 随着反应时间从 1 h 增加至 3 h, AA 逐渐减少, 加合物的峰面积也明显增大, 但 4 h

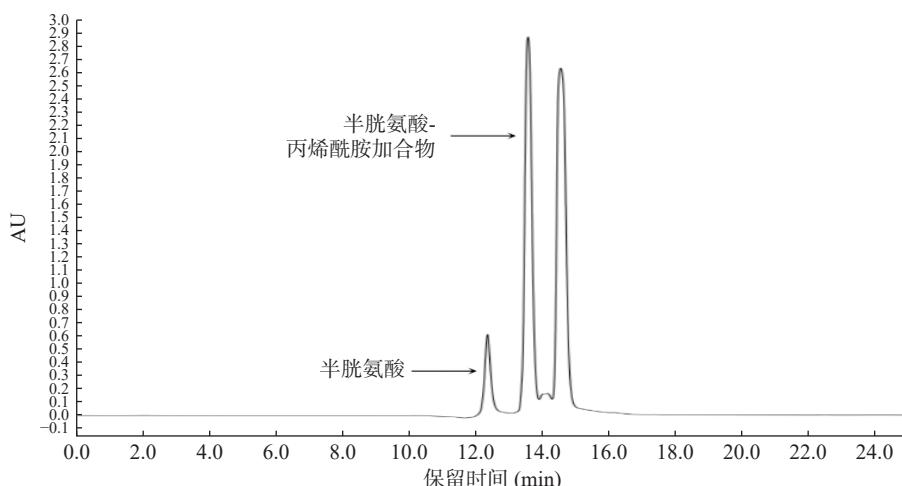


图 1 加合物的液相分离色谱图

Fig.1 Liquid separation chromatogram of adducts

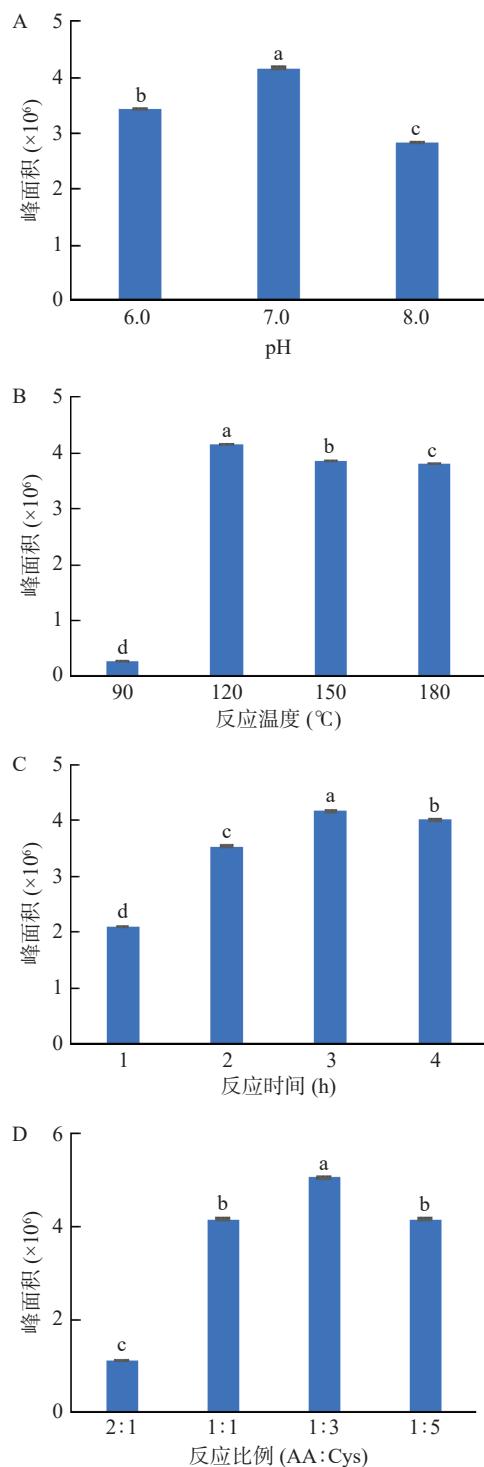


图 2 反应条件对加合物形成的影响

Fig.2 Effects of reaction conditions on adduct formation

注: 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$; 图 7 同。

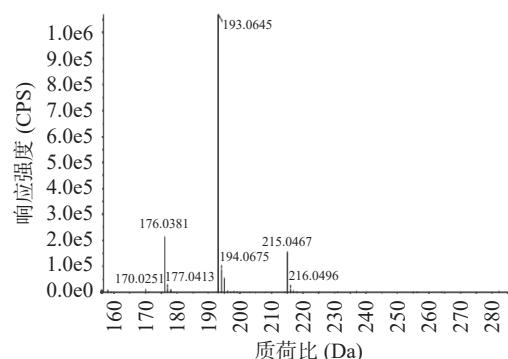
时, 加合物的峰面积却略少于 3 h 时; 比较反应温度对加合物峰面积的影响, 当反应温度为 120 ℃ 时, 加合物的峰面积最大, 150 和 180 ℃ 反应后, 其加合物的量均略低于 120 ℃ 下的反应; 当 AA 与 Cys 的物料比为 1:3 时, 目标加合物的峰面积最大(见图 2D)。综合考虑以上情况, 后续制备条件确定为 pH7.0、120 ℃、反应 3 h、物料比为 1:3。

2.3 加合物的纯化与结构表征

2.3.1 高效液相色谱法纯化目标加合物 经 HPLC

检测可知, 在用 10% 甲醇洗脱反相硅胶柱时, 收集的组分中加合物纯度可达 60%, 采用半制备色谱法进一步纯化后, 收集到的 4 个组分中, 组分 B 中目标加合物的纯度可达 95% 以上; 另外, 在组分 D 中也检测到另一质荷比为 193 的组分, 但其含量不高, 未能分离得到足够的量进行结构鉴定。

2.3.2 目标加合物的结构表征 采用冷冻干燥法得到的目标加合物是白色固体, 其紫外光谱的最大吸收波长为 196 nm, 可知其含有羰基; 其高分辨质谱(图 3)的分子离子峰为 193.0645 [M]⁺, 拟合得到的分子量为 193.0641, 分子式为 $C_6H_9NO_3S$, 其不饱和度为 2。

图 3 目标加合物的高分辨质谱图(ESI⁺模式)Fig.3 High resolution mass spectrometry of the target adduct (ESI⁺ mode)

加合物的¹H NMR 中(图 4A 和表 2): 在高场区有 3 个亚甲基信号($\delta_H=2.62, 2.86, 3.06$ 和 3.18 ppm), 1 个次甲基信号($\delta_H=3.95$ ppm); 因 H-4 和 H-5 相互偶合裂分, 均为 td 峰; H-2 与 H-3 发生偶合裂分, 形成 dd 峰, 由于其与酰胺基相连, 位于低场。¹³C NMR 和 DEPT 谱(图 4B~图 4C 和表 2)数据也证实了化合物中有 2 个羰基碳($\delta_C=177.23, 172.81$ ppm), 3 个亚甲基($\delta_C=32.08, 27.02$ 和 34.66 ppm), 1 个次甲基($\delta_C=53.54$ ppm); 其中亚甲基 $\delta_C=34.66$ ppm 和次甲基 $\delta_C=53.54$ ppm 是原半胱氨酸部分的基团, $\delta_C=177.23$ ppm 的羰基碳则是归属于酰胺基上; 结合二级质谱中碎片离子的分析结果(图 5, 表 2)和文献报道^[25~26], 该目标化合物的结构确定为: 2-氨基-3-(3-氨基-3-氧代-丙基)硫烷基-丙酸。

Zamora 等^[27]研究了氨基酸与丙烯酰胺反应的机制, 表明可通过迈克尔加成将氨基化合物添加到丙烯酰胺中, 从而产生相应的 3-(烷基氨基)丙酰胺。由此推测出其反应机理(图 6): 半胱氨酸的巯基具有强亲核性, 在一定条件下可与含 α, β -不饱和羰基化合物(丙烯酰胺)发生加成反应。

2.4 加合物的细胞毒性

AA 的潜在危害已为人们所熟知, 前期研究表明, Cys 可有效抑制或消除高温加工食品中的 AA^[28~29]; 由上述研究可知其消除机理是 Cys 与 AA 形成加合物, 但所形成加合物的安全性未知。

本研究采用 Caco-2 细胞对 Cys、AA 和加合物

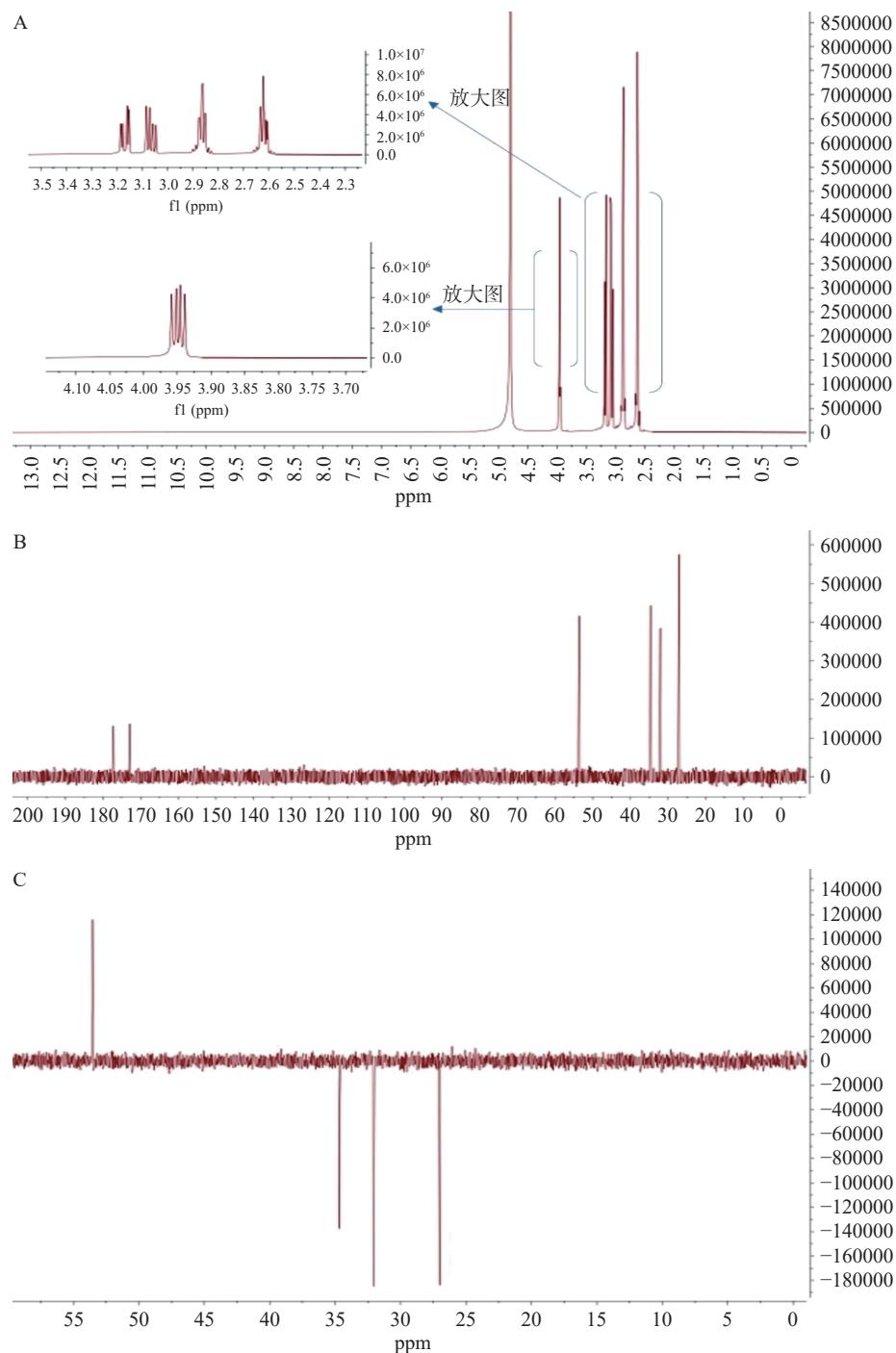


图 4 目标加合物的核磁谱图(氘代甲醇)

Fig.4 NMR spectra of the target adduct (deuterium methanol)

注: A: ¹H 谱; B: ¹³C 谱; C: Dept-135 谱。

表 2 加合物的核磁共振信息及其碎片结构

Table 2 NMR information and fragment structure of adduct

结构	碎片离子	序号	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multiplicity)	J's
		1	172.81		
		2	53.54	3.95 (dd)	4.19, 7.63
		3	34.66	3.06 (dd) 3.18 (d)	7.63, 14.87 4.19
		4	27.02	2.86 (td)	2.51, 6.93, 6.69
		5	32.08	2.62 (td)	1.99, 6.93, 7.15
		6	177.23		

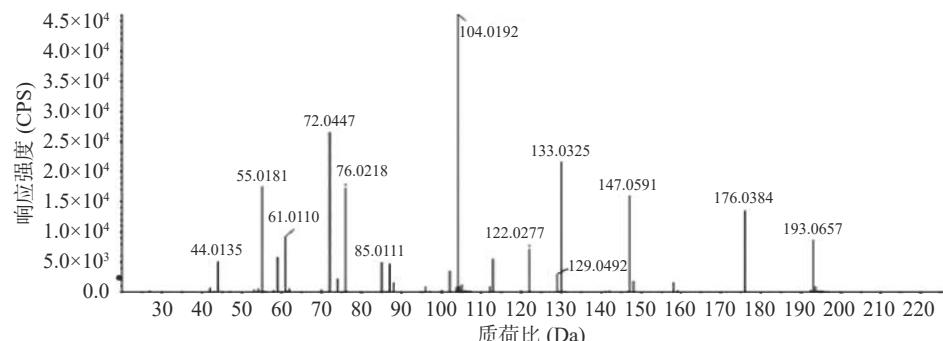
图 5 加合物高分辨二级质谱图(ESI⁺模式)Fig.5 Adduct high resolution secondary mass spectrometry (ESI⁺ Mode)

图 6 目标加合物的形成机理

Fig.6 Formation mechanism of target adduct

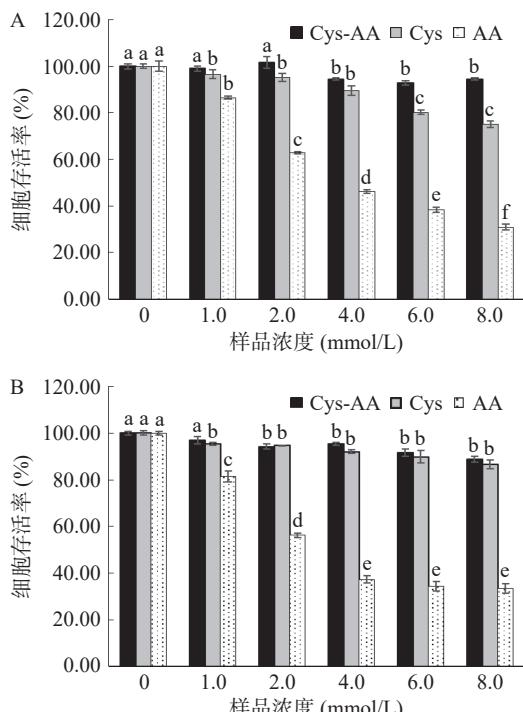


图 7 半胱氨酸、丙烯酰胺和加合物孵育 Caco-2 细胞 24 h(A)、48 h(B) 对细胞存活率的影响

Fig.7 Effects of cysteine, acrylamide and adduct on cell viability of Caco-2 cells incubated for 24 h (A) and 48 h (B)

的安全性进行探索(图 7)。孵育 24 h 后, AA 的 IC₅₀ 为 3.55 mmol/L; 48 h 后, 其 IC₅₀ 为 2.65 mmol/L; 半胱氨酸-丙烯酰胺加合物浓度在 8.0 mmol/L 时, 经 24 和 48 h 后孵育后, 细胞存活率均在 80% 以上, 其毒性明显低于 AA。由此可见, 加合物的形成可明显降低 AA 的细胞毒性。

2.5 消减工艺在薯片加工中的应用

Cys 是食品中的半限制氨基酸, 基于其对 AA 的高效消减作用, 且消减后可与 AA 生成加合物, 本研

究以纯化后的半胱氨酸-丙烯酰胺加合物为标准品, 采用 MRM 模式建立 AA 和加合物标准曲线, 分别测定了 3 种品牌的鲜切薯片和 4 种由 Cys 预处理的自制薯片中 AA 和加合物的含量。

AA 的标准曲线是 $Y=405467X+5042.57 (R^2=0.996)$, 加合物的标准曲线是 $Y=3e-09X+0.001 (R^2=0.997)$, 薯片中 AA 和加合物的含量如表 3 所示。自制薯片 1 的 AA 含量是 0.617 mg/kg, 未检出加合物; 自制薯片 2 中 AA 和加合物含量分别为 0.204 和 0.036 mg/kg, 其 AA 含量较薯片 1 降低了 67%; 当浸泡液中 Cys 浓度增加至 0.3% 时, 自制薯片 3 中未检出 AA, 加合物含量 0.043 mg/kg, 是自制薯片中含量最高的。推测当浸泡液中的 Cys 为 0.5% 时, 有效地抑制了美拉德反应, 使 AA 形成量降低, 进而减少了加合物的形成。市售的 3 个不同品牌薯片中 AA 含量在 0.472~0.523 mg/kg, 加合物未检出, 这可能是因为 Cys 在马铃薯中的含量极少, 致使薯片中未能检测出加合物。综上, Cys 预处理的薯片中 AA 含量明显低于未经预处理的, 且可测到一定量的加合物, 可见 Cys 可有效降低薯片中 AA 的含量, 消减的 AA 部分以丙烯酰胺-半胱氨酸加合物的形式存在。

表 3 不同预处理的薯片中丙烯酰胺和半胱氨酸-丙烯酰胺加合物的含量

Table 3 Contents of acrylamide and cysteine-acrylamide adducts in different potato chips

样品	半胱氨酸浓度(%)	丙烯酰胺含量(mg/kg)	加合物含量(mg/kg)
自制1	0	0.617	未检出
自制2	0.1	0.204	0.036
自制3	0.3	未检出	0.043
自制4	0.5	未检出	0.026
市售A	0	0.508	未检出
市售B	0	0.472	未检出
市售C	0	0.523	未检出

注: 丙烯酰胺和加合物的检测限均为 0.010 mg/kg。

3 结论

Cys 可有效消减 AA 的含量, 并形成加合物。通过优化制备条件, 得到纯度高达 95% 的半胱氨酸-丙

烯酰胺加合物,该加合物是由1分子Cys巯基与1分子AA烯基通过加成反应形成。加合物在Caco-2细胞上的细胞毒性明显低于AA。在油炸前用0.3% Cys溶液浸泡的马铃薯片,其AA含量明显降低,且可检出一定量的半胱氨酸-丙烯酰胺加合物。可见,在薯片加工中Cys可通过与AA发生加成反应形成加合物,从而实现消减丙烯酰胺的目的。虽然薯片中半胱氨酸-丙烯酰胺加合物的检出量明显低于AA的消减量,AA的其它消减途径有待更深入的探讨,但本研究的方法为高温加工食品中内源性污染物的风险控制提供了一个新的视角。

参考文献

- [1] RIFAI L, SALEH F A. A review on acrylamide in food: Occurrence, toxicity, and mitigation strategies[J]. *International Journal of Toxicology*, 2020, 39(2): 93–102.
- [2] KUMAR J, DAS S, TEOH S L. Dietary acrylamide and the risks of developing cancer: Facts to ponder[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5: 14.
- [3] HASHEM M M, ABO-EL-SOUD K, ABD EL-HAKIM Y M, et al. The impact of long-term oral exposure to low doses of acrylamide on the hematological indicators, immune functions, and splenic tissue architecture in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2022, 105: 108568.
- [4] MOUSAVI K A, FAKHRI Y, NEMATOLLAHI A, et al. The concentration of acrylamide in different food products: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression[J]. *Food Reviews International*, 2020; 1–19.
- [5] HIRVONEN T, JESTOI M, TAPANAINEN H, et al. Dietary acrylamide exposure among finnish adults and children: The potential effect of reduction measures[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011, 28(11): 1483–1491.
- [6] MOLLAKHALILY M N, KHORSHIDIAN N, NEMATOLLAHI A, et al. Acrylamide in bread: A review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(13): 15627–15645.
- [7] LIYANAGE D W, YEVTSHENKO D P, KONSCHUH M, et al. Processing strategies to decrease acrylamide formation, reducing sugars and free asparagine content in potato chips from three commercial cultivars[J]. *Food Control*, 2021, 119: 107452.
- [8] KRISHNAKUMAR T, VISVANATHAN R. Acrylamide in food products: A review[J]. *Journal of Food Processing & Technology*, 2014, 5(7): 1.
- [9] YOSHIOKA T, IZUMI Y, TAKAHASHI M, et al. Identification of acrylamide adducts generated during storage of canned milk coffee[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(12): 3859–3867.
- [10] MUNIR N, ZIA M A, SHARIF S, et al. L-asparaginase potential in acrylamide mitigation from foodstuff: A mini-review[J]. *Progress in Nutrition*, 2019, 21(3): 498–506.
- [11] MILDNER-SZKUDLARZ S, RÓŻAŃSKA M, PIECHOWSKA P, et al. Effects of polyphenols on volatile profile and acrylamide formation in a model wheat bread system[J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 125008.
- [12] KHORSHIDIAN N, YOUSEFI M, SHADNOUSH M, et al. Using probiotics for mitigation of acrylamide in food products: A mini review[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2020, 32: 67–75.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准 GB 2760-2014[S]. 北京: 中国出版社, 2015. [National Health and Family Planning Commission. National standard for food safety: Standard for use of food additives GB 2760-2014[S]. Beijing: China Publishing House, 2015.]
- [14] 汪多仁. 有机食品营养强化剂[M]. 上海: 科技文献出版社, 2008. [WANG D R. Organic food nutritional fortifier[M]. Shanghai: Science and Technology Literature Press, 2008.]
- [15] ZOU Y, HUANG C, PEI K, et al. Cysteine alone or in combination with glycine simultaneously reduced the contents of acrylamide and hydroxymethylfurfural[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 275–280.
- [16] YU M, OU S, LIUMENGZI D, et al. Effect of ten amino acids on elimination of acrylamide in a model reaction system[J]. *African Journal of Food Science*, 2013, 7(9): 329–333.
- [17] JIANG K, HUANG C, JIAO R, et al. Adducts formed during protein digestion decreased the toxicity of five carbonyl compounds against Caco-2 cells[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 363: 26–33.
- [18] 邹照佳, 郑洁, 黄才欢, 等. 丙烯醛-丙氨酸加合物制备与细胞毒性[J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 1–6. [ZHOU Z J, ZHENG J, HUANG C H, et al. Preparation and cytotoxicity of acrolein alanine adduct[J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 1–6.]
- [19] HU J, JIANG K, HUANG C, et al. Glycine and serine markedly eliminate methylglyoxal in the presence of formaldehyde via the formation of imidazole salts[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130952.
- [20] ZOU Z, YIN Z, OU J, et al. Identification of adducts formed between acrolein and alanine or serine in fried potato crisps and the cytotoxicity-lowering effect of acrolein in three cell lines[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361: 130164.
- [21] 郭鸿阳, 李瑞阳, 刘启辉, 等. L-半胱氨酸对油炸薯片中有害醛、AGEs的抑制作用及其品质的改善效果[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 60–68. [GUO H Y, LI R Y, LIU Q H, et al. Inhibitory effect of L-cysteine on harmful aldehydes and AGEs in fried potato chips and its quality improvement[J]. *Food Science*, 2022, 43(4): 60–68.]
- [22] 刘刚, 王毅, 王鑫, 等. 液相色谱串联质谱法测定加工食品中丙烯酰胺的含量[J]. *西华大学学报(自然科学版)*, 2021, 40(2): 97–102. [LIU G, WANG Y, WANG X, et al. Determination of acrylamide in processed food by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Xihua University(Natural Science Edition)*, 2021, 40(2): 97–102.]
- [23] KOBAYASHI A, GOMIKAWA S, YAMAZAKI A, et al. Elimination of acrylamide by moderate heat treatment below 120 °C

- with lysine and cysteine[J]. *Food Science and Technology Research*, 2014, 20(5): 979–985.
- [24] OU J, ZHENG J, HUANG J, et al. Interaction of acrylamide, acrolein, and 5-hydroxymethylfurfural with amino acids and DNA [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(18): 5039–5048.
- [25] LIM H H, SHIN H S. A new derivatization approach with d-cysteine for the sensitive and simple analysis of acrylamide in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1361: 117–124.
- [26] SCHWEND T, SCHABACKER J, WETTERAUER B, et al. Uptake of S-(3-amino-3-oxopropyl)-cysteine by Caco-2 cells[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2008, 63(11-12): 913–918.
- [27] ZAMORA R, DELGADO R M, HIDALGO F J. Model reactions of acrylamide with selected amino compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3): 1708–1713.
- [28] ADAMS A, HAMDANI S, LANCKER F V, et al. Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles[J]. *Food Research International*, 2010, 43(5): 1517–1522.
- [29] BENT G A, MARAGH P, DASGUPTA T, et al. Kinetic and density functional theory (DFT) studies of *in vitro* reactions of acrylamide with the thiols: Captopril, l-cysteine, and glutathione[J]. *Toxicology Research*, 2015, 4(1): 121–131.