

固相萃取-高效液相色谱法分析香辛料对 酱卤肉中 β -咔啉类杂环胺形成的影响

李进, 李凯凯, 高悦, 项贤统, 李春美

(华中农业大学食品科技学院, 华中农业大学环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要:建立了固相萃取-高效液相色谱分析卤肉中 β -咔啉类杂环胺含量的方法,并研究六种中国传统香辛料对卤鸡肉中 β -咔啉类杂环胺形成的影响。样品经二氯甲烷萃取,离心和混合阳离子萃取小柱净化后,采用荧光检测器检测杂环胺含量。结果表明,2种杂环胺在线性范围内线性关系良好,相关系数 $r>0.999$,检出限为 0.17~0.30 ng/g。杂环胺的加标回收率为 81.92%~93.37%,相对标准偏差(RSD)为 3.66%~7.49%。该方法操作简单,净化效果好,可满足实际样品分析的需求。在不添加香辛料的对照组中检测到 Harman 和 Norharman 两种杂环胺,6种香辛料对杂环胺抑制能力不同,5%添加剂量下,干姜、青花椒和桂皮抑制率最强达到 42%~60%,红花椒、陈皮和黑胡椒的抑制效果较弱。拟合了香辛料的抗氧化能力与抑制能力之间的相关性,结果表明香辛料的抑制能力与羟基自由基的清除能力相关,为研究抑制机理提供线索。

关键词: 固相萃取; 酱卤肉制品; β -咔啉类杂环胺; 香辛料

文章编号: 1673-9078(2019)03-234-240

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.035

Effect of Spices on the Formation of β -Carboline Heterocyclic Aromatic Amines in Sauce Braised Meat by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

LI Jin, LI Kai-kai, GAO Yue, XIANG Xian-tong, LI Chun-mei

(College of Food Science and Technology Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A method was established for the determination of β -Carboline heterocyclic aromatic amines (HAs) in sauce braised meat products by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. The sample was extracted with dichloromethane, purified by centrifugation and a MCX SPE column, and then detected by a fluorescence detector. The results showed that the correlation coefficients of both HAs were above 0.999 and the limits of detection were in the range from 0.17~0.30 ng/g. The recoveries of the two HAs spiked in chicken samples were 81.92%~93.37% with the relative standard deviations (RSD) between 3.66% and 7.49%. The method is simple, sensitive and effective, and can meet the requirements of actual sample analysis. Only Harman and Norharman were detected in the control group, and the inhibition ability of the six kinds of spices to heterocyclic amines were different. Under the additive amount of 5%, the inhibition rate of dried ginger, green prickly ash and cinnamon reached 42% to 60%, and that of red pepper, dried tangerine peel and black pepper was relatively weak. Furthermore, the scavenging ability of OH radical was related to the inhibitory ability of spices, which provided clues for studying the inhibitory mechanism in the future.

Key words: solid phase extraction (SPE); sauce braised meat; β -Carboline heterocyclic aromatic amines; spices

杂环胺(Heterocyclic aromatic amines, HAs)是一种

收稿日期: 2018-11-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31701712); 湖北省自然科学基金项目(2017CFB197); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2662018PY058; 2662016QD035)

作者简介: 李进(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 李春美(1973-), 女, 教授, 研究方向: 天然产物化学

出现在加工肉制品中具有强烈致癌、致突变毒性的多环芳香族化合物,常发现于富含蛋白质的肉制品中^[1]。从化学结构看,杂环胺类化合物可以分为2类:氨基咪唑氮杂芳烃和氨基咔啉。Harman 和 Norharman 是两种主要的 β -咔啉类杂环胺。动物实验表明,Harman 和 Norharman 会与小鼠大脑和肝脏的不同位点结合,从而影响动物的生理行为^[2,3]。同时,作为潜在的诱变

剂或辅助致突物, Harman 和 Norharman 会加强其他杂环胺的基因毒性^[4], 另外, Harman 和 Norharman 与人类一些疾病有关联, 比如帕金森症、癌症等^[5]。

如何控制肉制品加工过程中杂环胺的产生是研究人员迫切需要解决的问题。研究表明, 许多天然的或人工合成的抗氧化剂对抑制杂环胺形成有一定的抑制效果。如 Tai 等^[6]研究报道 0.01% 或者 0.05% 的低浓度 BHT 会促进杂环胺的形成, 而 0.10% 的高浓度 BHT 可抑制杂环胺的形成, 但对风味有不利的影 响。如何在 不影响风味 的同时还能显著降低杂环胺的含量显得尤为重要。近年来, 纯天然食品配料和添加剂抑制杂环胺形成的功效引起了食品科学家的广泛兴趣。Zeng 等^[7]报道在烤牛肉饼前添加花椒, 当花椒添加比例为 1.0% 时, 对 PhIP、IQx、MeIQx 和 4,8-DiMeIQx 的抑制效果最好, 抑制率分别高达 90%、100%、81% 和 89%。Puangsombat 等^[8]将五种不同提取条件的迷迭香提取物加到牛肉饼后再烹调, 结果表明不同提取条件的迷迭香对杂环胺的生成均有不同程度的抑制作用。

目前国内外关于杂环胺的研究多集中于煎烤、油炸之类的高温肉制品, 而对温度较低的酱卤肉制品中的杂环胺尚缺乏系统研究, 有研究报道, 在卤肉中发现大量氨基咪唑类杂环胺^[9], 我国香辛料种类较多, 注重传统香辛料的研究有助于开发符合我国饮食特色的杂环胺的抑制措施。由于肉制品的成分复杂, 杂环胺种类多、含量低, 因此关于杂环胺的检测方法一直是研究的重点和难点。目前, 杂环胺的提取方法普遍采用液-液萃取串联固相萃取法^[10], 该方法需要串联多种固相萃取小柱, 步骤繁琐, 且溶液在转移时易损失。本研究改善了固相萃取方法, 样品在碱性环境下用有机溶剂离心提取, 再串联混合型阳离子萃取小柱分离杂环胺, 简化提取步骤, 缩短操作时间, 对卤肉制品中 β -咪唑类杂环胺含量进行测定, 并研究多种香辛料对酱卤肉中杂环胺形成的影响及抗氧化能力的相关性, 为卤煮肉制品的安全生产提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

新鲜鸡胸肉、食盐、白砂糖、酱油、香辛料(干姜、青花椒、红花椒、桂皮、黑胡椒和陈皮)购于武汉市当地农贸市场。

杂环胺标品: 9H-吡啶并[4,3-b]吡啶(Norharman, CAS No. 244-63-3)、1-甲基-9H-吡啶并[3,4-b]吡啶(Harman, CAS No. 486-84-0)购于加拿大 Toronto Research Chemicals; 色谱纯甲醇、乙腈购于美国 Fisher

公司; 色谱纯冰醋酸购于国药集团; 其余硅藻土、醋酸胺、二氯甲烷、氨水、盐酸和氢氧化钠等皆为国产分析纯。

1.2 仪器和设备

电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 电子调温万用电炉, 天津泰斯特仪器有限公司; 磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; Oasis MCX 固相萃取柱(60 mg, 3 mL), 美国 Waters 公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Waters1525 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; TSK gel ODS-80TM 色谱柱(25 cm×4.6 mm, 5 μ m, 80 $\text{\AA}$), 日本 Tokyo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂的配制

准确称取 2 种 β -咪唑类杂环胺(Norharman、Harman)各 5.0 mg 分别溶于甲醇溶液, 并定容至 50 mL, 得到 100 μ g/mL 的杂环胺标准储备液, 再将 Norharman 和 Harman 杂环胺标准储备液稀释到 1、10、20、50、100、200、500 μ g/L 的混合标准工作液。采用高效液相色谱分析, 并据此结果建立标准曲线。

1.3.2 卤肉的制作

首先剔除鸡胸肉中的脂肪和筋膜, 然后用刀切成 4 cm×2 cm×1 cm 约 10 g 大小的肉块, 置于冰箱中备用。

对照组: 取切好的鸡胸肉 40.0 (± 0.5) g, 白砂糖 1.0 g, 食盐 1.0 g, 酱油 5 mL, 蒸馏水 200 mL 置于 500 mL 锥形瓶中, 盖上预先制作好的盖子, 并放在电炉上加热, 沸腾后煮制 1 h。将煮好后的样品冷却至室温, 并将肉取出称重, 将处理好的卤肉置于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏备用。实验组中分别添加三种添加量(1%, 3%, 5% 肉重)的香辛料(干姜、青花椒、红花椒、桂皮、黑胡椒和陈皮), 其他操作同对照组。

1.3.3 预处理方法

HAs 的提取和纯化参考 Gross^[11]等固相萃取方法并适当修改。称取 3.0 g 处理好的肉样于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 2 mol/L 的 NaOH 溶液和 10 mL 二氯甲烷, 涡旋混合 10 min 后, 于 10000 r/min 离心 10 min, 将二氯甲烷层转移至 50 mL 浓缩管中, 再重复操作两次, 收集提取液。

MCX 固相萃取小柱首先用 3 mL 二氯甲烷进行活化, 将收集的洗脱液全部通过小柱后, 再依次用 3 mL 0.1 mol/L HCl-甲醇(40:60, V/V)、2 mL 甲醇、2 mL 超纯水淋洗, 最后用 3 mL 氨水-甲醇(15:85, V/V)混合液

将柱中的杂环胺洗脱下来,接着在 50 °C 下氮气吹干,再加入 400 μ L 甲醇复溶,过 0.22 μ m 微孔滤膜后待 HPLC 分析。

1.3.4 检测条件

Waters 1525 高效液相色谱仪,配备 Waters 2475 荧光检测器。色谱柱:TSK gel ODS-80TM(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)。流动相 A: 0.05 mol/L 醋酸铵-醋酸缓冲液 (pH 3.5),流动相 B: 乙腈。流速为 1 mL/min。进样量 20 μ L。洗脱程序: 0~15 min, 95%~75% A; 15~25 min, 75%~55% A; 25~30 min, 55%~70% A; 30~35 min, 95% A。Norharman 和 Harman 可通过对荧光检测器编程来检测,激发波长(excitation wavelength)/发射波长(emission wavelength)程序: 300 nm/440 nm。

1.3.5 香辛料提取液制备

将 6 种香辛料用粉碎机粉碎后,分别称取 10.0 g 香辛料粉末置于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 10% 的乙醇溶液,在 80 °C 水浴条件下提取 30 min 后超声提取 5 min,再放入 80 °C 水浴条件下提取 30 min。将水提物在 4000 r/min 的条件下离心 5 min,再取其上清液,在 4 °C 下保存待用。

1.3.6 香辛料提取液对 DPPH·清除能力的测定

根据 Liu^[12]等人的方法适当修改,精密称取 9.7 mg DPPH 固体粉末,用无水乙醇充分溶解,定容至 100 mL,混匀,避光保存备用。各取 50 μ L 样品至酶标板中,然后分别加入等体积的 DPPH 自由基溶液,混合均匀后于避光条件下反应 30 min,采用全波长扫描仪于 517 nm 下测定各样品的吸光值 A_0 。同时以等体积的无水乙醇代替 DPPH 溶液作为空白组 A_2 ,以等体积的无水乙醇代替样品溶液作为对照组 A_1 ,平行测定三次,并按照公式来计算样品清除的能力:

$$\text{清除率}=[A_1-(A_0-A_2)]/A_1\times 100$$

1.3.7 香辛料提取液对 ABTS⁺清除能力的测定

采用 Wojdylo^[13]等人的方法,取 5 mL 的 7 mM ABTS 溶液与 88 μ L 的 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液混合均匀后,于室温条件下避光静置过夜,以形成 ABTS⁺的自由基储备液。使用前将该储备液用无水乙醇稀释成所需工作液,使其在 30 °C、734 nm 的波长下所测得的吸光值在 0.7 $\pm$ 0.02 范围内。分别取样品 10 μ L 于孔板中,各加入 200 μ L ABTS⁺溶液,振荡 30 s,于 20 °C 的条件下测定该反应在 734 nm 波长下 6 min 内吸光值 A_0 。同时设置试剂空白组 A_1 与样品空白组 A_2 。清除率按照公式进行计算:清除率=[$A_1-(A_0-A_2)$]/ $A_1\times 100$ 。

1.3.8 香辛料提取液对 HO·清除能力测定

参考吕英华^[14]等人的方法,取若干离心管,依次加入 1 mL 样品溶液,8.0 mmol/L 硫酸亚铁 0.3 mL,20 mmol/L 过氧化氢 0.25 mL,3.0 mmol/L 水杨酸 1 mL。将离心管于 37 °C 反应 30 min,流水冷却,各管分别加入 0.45 mL 蒸馏水,使体系终体积为 3 mL,2000 r/min 离心 10 min,取上清液于波长 510 nm 处比色测定吸光度 A_0 ,同时设置试剂空白组 A_1 与样品空白组 A_2 。清除率按照公式进行计算:

$$\text{清除率}=[A_1-(A_0-A_2)]/A_1\times 100。$$

1.3.9 香辛料提取液 T-AOC 测定

购买南京建成生物工程研究所的 T-AOC 测试盒,采用 FRAP 法测定总抗氧化能力,测定方法如下:

空白组: 5 μ L 蒸馏水+180 μ L FRAP 工作液

标准孔: 5 μ L 不同浓度的标准品溶液+180 μ L FRAP 工作液

测定孔: 5 μ L 样液+180 μ L FRAP 工作液

取适量 100 mM FeSO₄·7H₂O 溶液稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mM,绘制标准曲线,把样本测定的 OD 代入,求得香辛料提取液的总抗氧化能力。

1.3.10 数据统计分析

实验数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析,以平均值 $\pm$ 标准差表示,同时利用单因素方差分析组间数据,以 $p<0.05$ 判定为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理条件的选择

肉样的成分复杂,在 HPLC 分析之前需要进行必要的预处理,过去的研究中,研究者们多采用硅藻土填充层析柱,经有机试剂洗脱得到粗提液,再串联多种固相萃取小柱来分离杂环胺^[15,16]。柱层析法得到粗提液操作繁琐,需要用大量有机试剂洗脱杂环胺,存在洗脱不完全、硅藻土填充柱容易堵塞和操作困难等缺点,且在随后的固相微萃取的操作中,需要经过 PRS 柱(丙基磺酸柱)和 C18 柱多次萃取,实验耗时长,极易造成杂环胺的损失。本文根据在碱性条件下,杂环胺易溶于有机溶剂的原理,先采用离心得到粗提液。在固相微萃取步骤中,采用混合阳离子固相萃取小柱 Oasis MCX 进行净化和分离,能够同时提取不同极性的杂环胺,简化操作程序,显著缩短操作时间,且方法回收率高。对于杂环胺的提取溶剂,本实验考察了二氯甲烷和乙酸乙酯对杂环胺的提取效果,从操作过程来看,二氯甲烷和肉样混合非常均匀,由于二氯甲烷密度大,与肉样涡旋混合离心后分层明显,提取液澄清透明,在 MCX 小柱中流动速度较快;而乙酸乙

酯提取时溶剂位于上层,易悬浮油脂,在MCX小柱中流动速度慢。从色谱图来看(图1),离心-MCX法所得的两种杂环胺色谱图基线平稳,分离度高,响应值高,杂质对目标化合物的干扰较弱,满足定量要求。从回收率结果来看(图2),二氯甲烷提取2种杂环胺的回收率达到90%,高于乙酸乙酯提取回收率,综合比较采用二氯甲烷作为提取试剂。邵^[17]等人采用乙酸乙酯离心提取杂环胺,添加氨水和三乙胺营造碱性环境,粗提液在小柱中流动速度较慢,此外,邵等人认为二氯甲烷密度大,与肉样涡旋混合离心后分层效果差,并没有比较回收率,这与我们的研究结果不一致,正是利用二氯甲烷的密度大,油脂层和肉样在上层紧密吸附,便于分离且二氯甲烷层杂质干扰小,回收率的结果也验证了二氯甲烷的优越性。

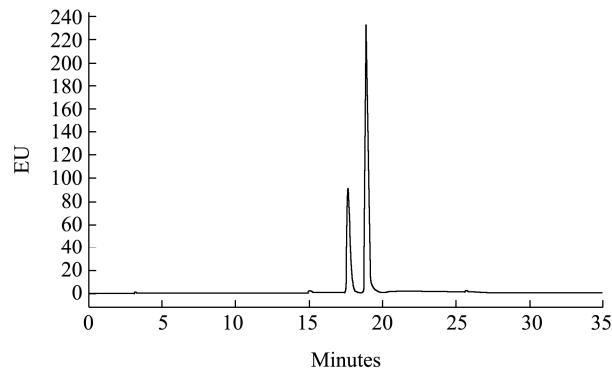


图1 β -咔啉类 HAs 标准溶液的色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of β -Carboline HAs standards

注: 峰1: Norharman, 峰2: Harman。

表1 2种 HAs 线性方程、相关系数及线性范围

Table 1 Two HAs standard curves

杂环胺	线性方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	LOD/(ng/g)	LOQ/(ng/g)
Norharman	$y=469097.19x+5275464.36$	0.9995	1~500	0.30	0.83
Harman	$y=1088689.18x+1266303.38$	0.9991	1~500	0.17	0.33

2.2.2 回收率和精密度

表2 空白肉样中2种杂环胺加标回收率和精密度

Table 2 Recoveries and precisions of 2 HAs in blank samples (n=3)

Compound	Add/($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/%	RSD/%
Norharman	10	81.92	3.81
	50	86.33	3.66
	100	93.37	7.49
Harman	10	83.63	5.43
	50	90.91	5.27
	100	90.65	7.05

选取生鸡肉于70℃水浴加热至蛋白变性,取出后绞碎制成肉糜,作为空白样品,分别添加Norharman、Harman为10、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 各3个水

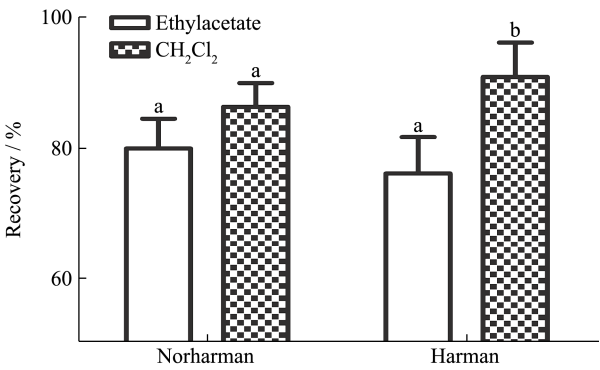


图2 不同提取溶剂对 β -咔啉类 HAs 回收率的影响

Fig.2 Effects of extraction solvents on recoveries of HAs

注: 不同字母表示组内显著性差异,显著水平 $p<0.05$ 。

2.2 方法学评价

2.2.1 标准曲线、检出限及定量限

分别测定浓度为1、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ 的Norharman和Harman混合标准工作液,以各组分的峰面积Y为纵坐标,质量浓度X($\mu\text{g/L}$)为横坐标绘制标准曲线。方法的检出限(LOD)定义为产生3倍信噪比($S/N=3$)的化合物的质量浓度,定量限(LOQ)定义为产生10倍信噪比($S/N=10$)的化合物的质量浓度。结果表明,结果如表1所示,Norharman和Harman在1~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系较好,而实际肉样中单种杂环胺化合物的含量一般在0~100 $\mu\text{g/kg}$ 之间,因此该方法的线性范围可满足实际样品的检测要求。

平的标准品,按1.3.3节和1.3.4节所述方法进行加标回收率测定,每个加标水平平行测定3次。结果如表2所示,两种杂环胺的回收率在81.92%~93.37%,相对标准偏差控制在7.5%以内,稳定性较高,精密度满足定量需求。

2.3 香辛料对酱卤鸡肉中杂环胺形成的影响

在本实验中,研究了6种中国传统香辛料对杂环胺形成的影响,结果表明,在不添加香辛料的对照组中检测到了Harman和Norharman,卤肉中Norharman和Harman的平均含量分别为21.43 ng/g和14.82 ng/g,有文献报道指出,酱油中含有大量的氨基酸,而氨基酸是杂环胺形成的重要前体物,糖可以促进杂环胺的生成,这可能是酱卤肉制品中 β -咔啉类杂环胺产生的

重要来源^[18]。

从图3可以看出,6种香辛料对卤肉中 β -咔啉类HAs具有不同的影响,干姜、青花椒和桂皮的抑制效果最佳,且随着添加量增加, β -咔啉类HAs含量越低。在5%添加量下,干姜实验组中Norharman和Harman含量分别降低62.34%和58.60%,这可能是因为干姜中抗氧化活性成分相对其他香辛料更加丰富,5%青花椒能够显著抑制卤肉中Norharman和Harman达42.04%和41.77%,桂皮的抑制效果与青花椒相当,5%桂皮添加剂量下,卤肉中 β -咔啉类杂环胺总量降低42.55%;陈皮和黑胡椒的抑制效果相对较弱,5%添加量下, β -咔啉类HAs含量分别降低32.40%和30.96%,3%红花椒表现出最强的抑制效果,抑制率达到27.71%。由于不同杂环胺的形成机制不同,不同的香辛料中抗氧化成分也有所区别^[19],因此对杂环胺的形成产生不同的影响。我们的结果与过去的研究成果相似,Yao等人^[20]研究了丁香、肉桂、生姜、红花椒和肉豆蔻对不同类型HAs含量的影响,结果表明,五种调味料均能显著降低Harman和Norharman的含量($p<0.05$)。然而Zeng等人^[21]采用超高效液相色谱和三重四级质谱联用技术,研究了六种香料对烤牛肉饼中17种HAs的影响,八角、茴香、孜然和黑胡椒均能促进HAs的形成,这与我们的结果有部分不同,这可能是因为烤肉的温度达到230℃,黑胡椒中的活性成分在高温状态下可能会发生,生成的新物质促进了 β -咔啉类HAs的产生。

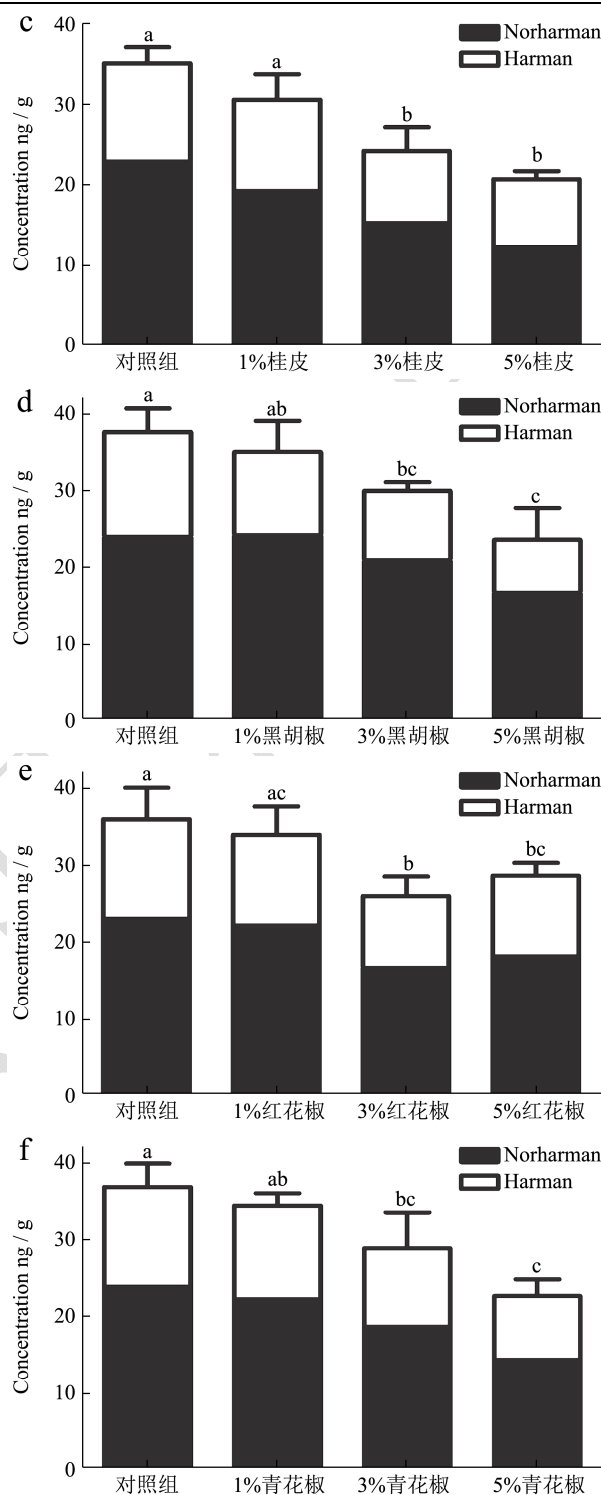
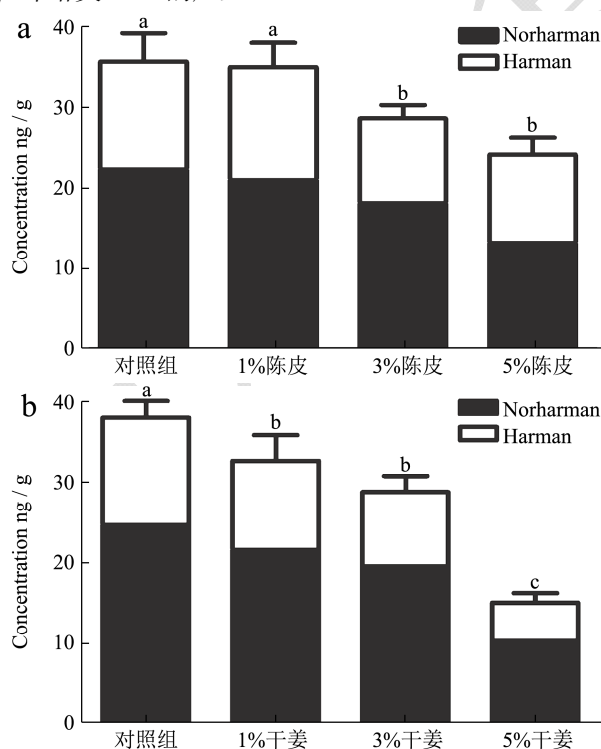


图3 6种香辛料对卤肉中 β -咔啉类杂环胺形成的影响

Fig.3 The effects of six spices on the β -carbolines HAs profiles of braised chicken

注: 不同字母表示组内显著性差异, 显著水平 $p<0.05$ 。

由于杂环胺形成机制非常复杂, 目前对香辛料抑制杂环胺形成的机理尚没有定论, 过去的研究也多停留在植物提取物对杂环胺的抑制效果上, 特别是对 β -咔啉类HAs的抑制机理少有研究。一般认为, 香辛料

中抗氧化成分通过清除杂环胺反应链中产生的自由基,或是通过结合中间产物,从而抑制杂环胺形成^[22]。本文测定了香辛料的多种抗氧化能力,并拟合了香辛料对 β -咔啉类 HAs 的抑制率与抗氧化能力的相关性(表3),分析结果表明,香辛料提取液对 $\text{HO}\cdot$ 的清除率与香辛料对 β -咔啉类 HAs 的抑制能力相关($R^2=0.752$),这与过去的研究有所不同^[23,24],这可能是过去的研究多集中在极性杂环胺,特别是 PhIP,而 β -咔啉类 HAs 的形成机制与极性杂环胺不同, β -咔啉类 HAs 的形成需要羰基化合物的参与,其可能

来源于美拉德反应或其他自由基链反应^[25]。此外,国内外多研究人工合成的 ABTS 和 DPPH 等自由基的清除,对于食品中常见的 $\text{HO}\cdot$ 与杂环胺抑制能力之间关系的研究鲜有报道,因此可推测,香辛料中活性成分可能是通过清除 $\text{HO}\cdot$ 来抑制 β -咔啉杂环胺的形成。香辛料中除了多酚化合物以外,还包括挥发性精油和其它成分(酰胺类、不饱和脂肪酸和生物碱类等),成分复杂,本文的结果可能是酚类物质与其它多种未知混合成分共同作用的结果,具体的抑制机制有待进一步系统性的研究。

表3 六种香辛料中的抗氧化能力

Table 3 Antioxidant capacity of 6 kind of spices (n=3)

抗氧化指标	干姜	红花椒	青花椒	陈皮	桂皮	黑胡椒	与杂环胺抑制能力的相关性(R^2)
T-AOC/mM	1.74±0.15	2.77±0.39	2.70±0.13	1.21±0.17	2.33±0.43	1.29±0.07	0.002
DPPH 清除率/%	6.14±0.17	9.15±0.43	34.08±1.01	5.72±0.32	38.37±2.87	19.52±0.63	0.019
ABTS 清除率/%	36.64±1.61	49.98±2.87	44.77±3.34	29.46±1.54	33.70±0.97	32.19±1.99	0.060
$\text{HO}\cdot$ 清除率/%	96.74±2.82	48.89±1.46	83.50±2.05	56.66±2.98	72.48±3.02	69.23±1.07	0.752

3 结论

本文应用 SPE-HPLC 检测卤肉中 β -咔啉类杂环胺的方法,以二氯甲烷作为洗脱剂,利用离心法和 Oasis MCX 小柱对杂环胺同时进行净化和富集,优化了样品预处理方法,本方法操作简单、方法稳定、准确度高。卤肉制品中检测到大量 β -咔啉类 HAs,六种香料对 β -咔啉类 HAs 具有不同的抑制效果,其中干姜,青花椒和桂皮的抑制作用最强,5%添加量下三种香辛料对 β -咔啉类 HAs 的抑制率达到40%以上。香辛料对 β -咔啉类 HAs 的抑制能力与 $\text{HO}\cdot$ 的清除能力相关,这为进一步的研究香料提取物对 HAs 形成的抑制机制提供线索,为未来控制食品加工中杂环胺类化合物的生成量、提升食品安全性提供新思路。

参考文献

- [1] Jinap S, Iqbal S Z, Selvam R M P. Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef (satay) [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 63(2): 919-926
- [2] Ergene E, Schoener E P. Effects of harman (1-methyl-beta-carboline) on neurons in the nucleus accumbens of the rat [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1993, 44(4): 951-957
- [3] Adell A, Biggs T A, Myers R D. Action of harman (1-methyl-beta-carboline) on the brain: Body temperature and *in vivo* efflux of 5-HT from hippocampus of the rat [J]. Neuropharmacology, 1996, 35(8): 1101-1107
- [4] Boeira J M, Viana A F, Picada J N, et al. Genotoxic and recombinogenic activities of the two β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2002, 500(1): 39-48
- [5] Cheng K W, Chen F, Wang M. Heterocyclic amines: chemistry and health [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 50(12): 1150-1170
- [6] Tai C Y, Lee K H, Chen B H. Effects of various additives on the formation of heterocyclic amines in fried fish fibre [J]. Food Chemistry, 2001, 75(3): 309-316
- [7] Zeng M, Wang J, Zhang M, et al. Inhibitory effects of Sichuan pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) and sanshoamide extract on heterocyclic amine formation in grilled ground beef patties [J]. Food Chemistry, 2018, 239: 111-118
- [8] Puangsombat K, Smith J S. Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): T40-T47
- [9] Bordas M, Moyano E, Puignou L, et al. Formation and stability of heterocyclic amines in a meat flavour model system: Effect of temperature, time and precursors [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 802(1): 11-17
- [10] Janoszka B, Błaszczyk U, Damasiewicz-Bodzek A, et al. Analysis of heterocyclic amines (HAs) in pan-fried pork meat and its gravy by liquid chromatography with diode array detection [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1188-1196

- [11] Gross G A, Gruter A. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products [J]. Journal of Chromatography A, 1992, 592(1-2): 271-278
- [12] Liu H, Qiu N, Ding H, et al. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses [J]. Food Research International, 2008, 41(4): 363-370
- [13] Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs [J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 940-949
- [14] 吕英华,苏平,那宇,等.桑椹色素体外抗氧化能力研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2007,33(1):102-107
LYU Ying-hua, SU Ping, NA Yu, et al. Study on antioxidant activities of mulberry pigment *in vitro* [J]. Journal of Zhejiang University(Agricultural and life science), 2007, 33(1): 102-107
- [15] 万可慧,彭增起,邵斌,等.高效液相色谱法测定牛肉干制品中 10 种杂环胺[J].色谱,2012,30(3):285-291
WAN Ke-hui, PENG Zeng-qi, SHAO Bin, et al. Determination of 10 heterocyclic aromatic amines in beef jerky by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(3): 285-291
- [16] 廖国周,张英君,徐幸莲,等.传统肉制品中杂环胺的 HPLC 测定[J].南京农业大学学报,2008,31(4):134-139
LIAO Guo-zhou, ZHANG Ying-jun, XU Xing-lian, et al. Detection of heterocyclic aromatic amines in traditional meat products by HPLC [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2008, 31(4): 134-139
- [17] 邵斌,彭增起,杨洪生,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定传统禽肉制品中的 9 种杂环胺类化合物[J].色谱,2011, 29(8):755-761
SHAO Bin, PENG Zeng-qi, YANG Hong-sheng, et al. Simultaneous determination of 9 heterocyclic aromatic amines in poultry products by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(8): 755-761
- [18] Chen Q, Gan Z, Zhao J, et al. In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L) oils and their main components [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 55(2): 632-637
- [19] 童庆宣,罗小飞,梁诗.香辛料植物及香辛料主要化学成分[J].中国野生植物资源,2009,28(4):60-65
TONG Qing-xuan, LUO Xiao-fei, LIANG Shi. Spice plants and the main chemical components of spices [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2009, 28(4): 60-68
- [20] Yao Y, Peng Z Q, Shao B, et al. Effects of the antioxidant capacities of 20 spices commonly consumed on the formation of heterocyclic amines in braised sauce beef [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(20): 4252-4259
- [21] Zeng M, He Z, Zheng Z, et al. Effect of six Chinese spices on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9908-9915
- [22] Zhou B, Zhao Y L, Wang X C, et al. Unraveling the inhibitory effect of dihydromyricetin on heterocyclic aromatic amines formation [J]. Journal of the Science Of Food and Agriculture, 2018, 98: 1988-1994
- [23] Cheng K W, Wong C C, Chao J, et al. Inhibition of mutagenic PhIP formation by epigallocatechin gallate *via* scavenging of phenylacetaldehyde [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 53(6): 716-725
- [24] Cheng K W, Wu Q, Zheng Z P, et al. Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(25): 10359
- [25] Herraiz T. Tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid compounds in fish and meat: Possible precursors of co-mutagenic beta-carbolines norharman and harman in cooked foods [J]. Food Additives & Contaminants, 2000, 17(10): 859-866

(上接第 274 页)

- [11] Wang Z H, Mi T, Ross C B, et al. Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk [J]. Food Chemistry, 2015, 171(15): 98-107
- [12] 王亚楠,王晓斐,牛琳琳,等.G 族黄曲霉毒素半抗原分子设计、抗原合成及抗体特性[J].西北农业学报,2018,27(5):626-633
WANG Ya-nan, WANG Xiao-pei, NIU Lin-lin, et al. Hapten molecular design and antigen synthesis and antibody characterization of G-group aflatoxins [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2018, 27(5): 626-633