

Maillard 反应的高分子产物的研究进展

曾世通, 胡 军*

(中国烟草总公司郑州烟草研究院, 郑州 450001)

摘要: Maillard 反应产物由于其天然性和独特的香味, 使其在食品和烟草领域的应用倍受关注。目前, 对 Maillard 反应产物中的小分子化合物的研究已经比较透彻, 但是高分子产物的结构及形成机理尚不清楚。虽然 Maillard 高分子产物及其复杂, 但人们通过膜透析、凝胶柱层析等分离方法, 对其提纯分级后, 再运用凝胶渗透色谱、元素分析、放射性同位素标记、紫外-可见光谱、红外光谱、核磁共振(NMR)、热裂解等分析手段对其进行表征, 对 Maillard 高分子产物的结构和形成机理有了一定的了解。本文对 Maillard 反应的高分子产物的分离提纯方法、分析表征方法和分子结构的假设模型三方面的研究进展进行了综述。

关键词: Maillard 反应; 高分子产物; 分离; 表征; 香料

Maillard 反应是氨基化合物与还原糖之间发生的非酶催化的棕色化反应(Non-enzymatic browning), 反应经过复杂的历程, 最终生成含各种小分子和高分子的棕色甚至黑色的混合物, 其中高分子产物也被称为类黑素(Melanoidins)^[1,2]。Maillard 反应能产生大量致香成分, 已被用于制备各类香精香料、增香剂。当使氨基酸和还原糖的种类、配比和反应条件不同时, 会产生不同风格香型的香基。由于 Maillard 反应无论从反应还是产物, 均可视作天然, 这些香基被国际权威机构认定为“天然的”, 因而其应用已广受各国关注, 成为有机化学、食品化学、香料化学、食品工业、烟草工业等领域的研究热点^[3]。目前, 反应条件对 Maillard 反应产物的增香效果的影响国内已有大量报道^[4~9], 但是这些研究结果都具有很大程度的经验性。为了能对 Maillard 反应产物的品质进行准确的控制, 还需要对其成分和形成机理进行深入研究。Maillard 反应产物的形成是一个极其复杂的过程。迄今为止, 人们只是对该反应产生小分子化合物的化学过程比较清楚, 一般公认此反应可以分成两个反应阶段, 三条反应路线^[10,11]。(1)初级阶段: 还原糖的羰基与氨基酸进行缩合, 缩合物迅速失去一分子水转变成希夫碱(Schiff Base), 经过环化形成相对应的 N-葡萄糖胺, 再经过 Amadori 重排形成 1-氨基-1-脱氧-2-酮糖; (2)高级阶段: 从 Amadori 重排产物开始延伸两条路线, 一是由 1-氨基-1-脱氧-2-酮糖在 2,3 位置不可逆地烯醇化; 二是从烯醇式 Amadori 产物在 1,2 位置烯醇化, 最终都生成褐色含氮色素类黑精; (3)第三条路线是 Strecker 降解, 氨基酸降解成为少一个碳原子的醛类。

虽然近年来国外对 Maillard 高分子产物的成分及形成机理做了大量的研究工作, 但并没有得出一致公认的结论, 学术界仍然存在很多分歧与争论。国内在这些方面研究还几乎是空白。本文将对国外近年来对 Maillard 高分子产物采用的分离提纯方法、分析表征方法和提出的分子结构的假设模型进行一个简要总结。

1 Maillard 高分子产物的分离提纯

为了对 Maillard 高分子产物进行准确的分析表征, 产物的分离提纯是至关重要的。迄今为止, 人们仍然不能对 Maillard 反应的高分子产物的成分和结构给出一个准确结论, 就是因为无法对其进行有效的提纯分级, 得到相应的纯物质。Maillard 反应是一个极其复杂的化学反应, 产物中含有大量的小分子物质和

基金项目: 国家科技部科研院所技术开发研究专项资金项目(No. 032005A070);

作者简介: 曾世通, 男, 26 岁, 硕士, 助理工程师, 从事高分子香料前体及香精香料载体的研究;

* **联系人,** E-mail: huj@ztri.com.cn Tel: 0371-67672521, Fax: 0371-67672539。

一部分大分子物质,而且高分子产物的分子量分布很宽,元素组成和分子结构也随分子量的不同而有所差异,因此在对 Maillard 反应的高分子产物进行分析表征前,除了要除去小分子物质外,还需要对高分子产物进行分级。目前,实验室对 Maillard 反应的高分子产物分离提纯方法有:膜透析、凝胶柱层析、超滤、超速离心、固相萃取、毛细管电泳等方法,其中膜透析和凝胶柱层析最为常用。

膜透析法是分离提纯 Maillard 高分子产物的一种简便而有效的方法。采用膜透析法能有效地将 Maillard 反应体系中未反应的原料和小分子产物除去,从而可以得到 Maillard 高分子产物。采用多种不同截留分子量的透析膜对 Maillard 高分子产物进行透析,可以有选择地得到不同分子量的产物,这样更能准确地对其进行成分和分子结构的分析。Wedzicha 等^[12]采用截留分子量为 3500 和 12500 的透析膜对葡萄糖、麦芽糖和甘氨酸的 Maillard 反应产物进行透析得到分子量大于 3500 和 12500 的高分子产物,并对其进行了元素分析,讨论了分子量对元素组成的影响。Kroh 等^[13]采用截留分子量为 14000~16000 的纤维素透析膜对 Maillard 产物进行透析后,分别对未透析的产物和透析后的产物进行 HPLC 分析,结果表明通过膜透析可以完全除去产物中的小分子,但是透析过程中大分子产物也会有所损失。

Maillard 高分子产物不同于一般意义的聚合物,由于 Maillard 反应的复杂性,其产生过程中可能存在多种聚合机理,从而导致了 Maillard 高分子产物的重复单元和链结构的多样性,同时也增加了对其进行研究的难度。膜透析法只能简单地从分子量大小上来对 Maillard 高分子产物进行粗略地提纯,然而利用凝胶柱层析则可以进一步对透析后得到的高分子产物进行分级,得到成分和结构更单一的级分。Yaylayan 等^[14]将葡萄糖和甘氨酸的 Maillard 产物通过截留分子量 10000 的透析膜透析除去小分子物质后,对未透过的高分子产物进行凝胶柱 HPLC 分析,发现在高分子产物中还存在三种具有不同保留时间的组分。因此又对透析后的产物进行反复凝胶柱层析(Bio-Gel P-10,排除尺寸 1500~20000Da),得到分子量在 10000~20000Da 之间的三种聚合物:PA、PB₁、PB₂,并且再次用凝胶柱 HPLC 对分离出的三种聚合物的纯度进行了鉴定。Kroh 等^[15]也采用凝胶柱层析有效分离了寡聚糖和甘氨酸、丙氨酸的 Maillard 高分子产物。凝胶柱层析法存在的缺点是 Maillard 高分子产物可能和凝胶发生强烈吸附,难以洗脱,从而导致产物损失。

除了采用膜透析和凝胶柱层析外,超滤和超速离心也常被用作 Maillard 高分子产物的提纯与分级,这两种方法也是依赖于分子量的分离方法^[16~19]。Hofmann 采用超速离心法测得了葡萄糖/甘氨酸(pH 7.0, 90℃, 4h)Maillard 产物中不同分子量级分的产率,如表 1。

表 1 葡萄糖/甘氨酸 Maillard 产物中各分子量级分的产率^[19]

Table 1 Yield of molecular weight fractions of Glucose/Glycine Maillard products^[19]

fraction	mol wt/Da	content/mg	percent content/%
1	>100000	<0.5	<0.1
2	100000~50000	<0.5	<0.1
3	50000~30000	<0.5	<0.1
4	30000~10000	0.6	0.1
5	10000~3000	5.4	0.8
6	3000~1000	154.9	19.8
7	<1000	632	78.4
	Σ(1~7)	792.9	96.7
	complete mixture	820	100

2 Maillard 反应的高分子产物的分析表征手段

虽然 Maillard 高分子产物分析难度极大,但是人们并没有因此而放弃对其的研究,反而近年来该领域成为了一个研究热点。人们不断摸索 Maillard 高分子产物的分离提纯方法,并且利用各种先进的现代分析表征手段对其进行研究,试图揭示其形成机理、成分和分子结构,而且也取得了较大的进展。目前,研究 Maillard 高分子产物常用的分析表征手段有:凝胶渗透色谱(GPC)、元素分析、放射性同位素标记、紫

外、红外、核磁共振、热裂解等等。

2.1 凝胶渗透色谱(GPC)

凝胶渗透色谱是测定 Maillard 高分子产物的分子量及分子量分布最常用的方法,同时也能分析出被测 Maillard 高分子产物组分的多少。凝胶渗透色谱测定分子量及分子量分布时,标样的选择是非常重要的,直接影响到分子量测定值的准确性。选择不同的标样得到的分子量是不同的,但分子量分布不会改变,因此为了使测量值更加接近真实值,应该选择与被测样分子链结构相近的高分子标样。

Agostina 等^[17]将浓咖啡超滤后得到的 Maillard 高分子产物,再用水/异丙醇(1:2.5)沉淀后,得到不溶组分 FFA 和能溶组分 FFB,然后分别用分子量范围 80000~10000 和 5000~100 的凝胶柱对 FFA 和 FFB 进行 GPC 测试。前者选择的标样为:麦芽糖(MW, 360.3Da)、葡聚糖 1(MW, 4000~6000Da)、葡聚糖 2(MW, 10500Da)和葡聚糖 3(MW, 68400Da);后者选择的标样为:麦芽糖(MW, 360.3Da)、麦芽三糖(MW, 504.4Da)、6'- α -D-半乳糖基麦芽三糖(GM3, MW, 666.6Da)、麦芽五糖(MW, 828.7Da)、麦芽六糖(MW, 1153Da)和葡聚糖 1(MW, 4000~6000Da)。结果表明,FFA 在分子量 80000Da 和 7900Da 处存在两个较宽的分布,而 FFB 则在分子量 3700Da 处存在一个较宽的分布,在 1000Da 处存在一个窄分布,说明 FFB 中存在大量未聚合的物质。

Rubinsztain 等^[20]也采用 GPC 法对一系列还原糖/氨基酸的 Maillard 模型反应的高分子产物进行分子量测试,结果表明所有透析后的样品分子量都在 6000Da 以上。其中半乳糖/赖氨酸(1:1)样品的分子量达 20000 以上,是所有样品中最大的。碱性氨基酸样品的分子量比酸性和中性的大可能是在 Maillard 反应中发生了交联。Rubinsztain 等通过 GPC 测得的 Maillard 高分子产物的分子量比 Bobbio 等^[21]所报道的要大。

2.2 元素分析

元素分析是测试 Maillard 高分子产物的元素组成最有效的手段,通过对元素分析的结果进行计算,可以得到高分子链结构中引入的还原糖和氨基酸的比例、脱水比例、碳氮比例(C/N)以及经验最简式。Wedzicha^[22], Kroh 等^[13]都对其计算方法进行了比较详细的介绍。值得注意的是,元素分析很容易产生实验误差,因此应该多次测试后取平均值。这也是不同文献报道的相同反应条件的 Maillard 高分子产物的元素分析结果存在一定差异的原因。

近年来人们在 Maillard 高分子产物的元素分析方面做了大量的工作,研究了不同反应物和不同的反应条件对 Maillard 高分子产物的元素组成的影响。所有的研究结果都表明反应物的种类和反应条件能显著地影响 Maillard 高分子产物的元素组成。表 2 为文献报道的不同反应条件的 Maillard 高分子产物的元素分析结果。

Kroh 等^[13]在这方面做了较为全面而深入的研究。Kroh 等对不同糖类与甘氨酸在无水条件下产生的 Maillard 高分子产物进行元素分析发现:核糖/甘氨酸体系中,高分子链中每摩尔的氨基酸引入 4 摩尔的糖,而在相同条件下,己糖/甘氨酸体系则每摩尔的氨基酸只引入 2 摩尔的糖;己糖/甘氨酸体系体系中,果糖的 C/N 值比葡萄糖的要略低一些,这可能是两种糖不同的热裂解性能引起的;二糖/甘氨酸体系体系中,乳糖和蔗糖易于生成高含氮量的 Maillard 高分子产物,而麦芽糖则与相同条件下的葡萄糖相似,每摩尔的氨基酸引入 2 摩尔的糖,因此麦芽糖易于生成低含氮量的 Maillard 高分子产物;无水条件下,糖和氨基酸的比例改变不会引起 Maillard 高分子产物的元素分析结果的显著变化。Kroh 等对葡萄糖/甘氨酸含水体系的 Maillard 高分子产物的元素分析发现:100℃反应时,高分子链中引入糖和氨基酸的比例不受体系 pH 值的影响,总是保持在 1:1 左右;反应温度降至 60℃时,分子链中引入氨基酸的量会略有上升;脱水比例也不会随反应温度和体系 pH 值的变化而变化,总是保持每摩尔羰基脱去 3 摩尔的水分子;随着反应温度和体系 pH 值的下降, Maillard 高分子产物的 C/N 值会减小,也就是说含氮量会增大。Wedzicha^[12, 22]、Yaylayan^[14]、Feather^[23]和 Martins 等^[24]也报道了与之相近的研究结果。

Mundt 和 Wedzicha^[12]将葡萄糖/甘氨酸和麦芽糖/甘氨酸在反应温度 70℃、体系 pH 值 5.5 时的 Maillard 高分子产物通过透析法进行分级后,得到分子量大于 3500 和分子量大于 12500 的 Maillard 高分子

产物,分别进行元素分析发现两种糖的 Maillard 高分子产物的 C/N 值都并不随其分子量的变化而有所改变,葡萄糖/甘氨酸的 C/N 值为 7.64 ± 0.21 ,麦芽糖/甘氨酸的 C/N 值为 10.55 ± 0.3 。麦芽糖/甘氨酸与葡萄糖/甘氨酸的 Maillard 高分子产物的含氮量存在差异的原因尚不清楚。

表 2 文献报道的不同反应条件的 Maillard 高分子产物的元素分析结果

Reference	Reaction conditions	C/N
Cammerer and Kroh(1995) ^[13]	H ₂ O; 60℃; 160 h; pH=5; [gly]=[glu]=0.1 M	7
	H ₂ O; 100℃; 10h; pH=5; [gly]=[glu]=0.1 M	9
Wedzicha and Kaputo(1992) ^[22]	Acetate Buffer 0.2 M; 90℃; 22 h; pH=5.5	8
	[gly]=1.0 M; [glu]=1.0 M	
Leong(1999) ^[31]	Acetate Buffer 0.2 M; 90℃; 22 h; pH=5.5	8
	[gly]=1.0 M; [glu]=1.0 M	
Feather and Nelson(1984) ^[23]	100℃; 8 h; pH=3.5; [gly]=1.0 M; [glu]=0.2 M	10
Bobbio et al(1981) ^[21]	Citrate Buffer 0.05 M; [gly]=0.66 M; [glu]=1.25 M	
	70℃; 415 h; pH=3.0	12
	70℃; 415 h; pH=6.0	11
	80℃; 80 h; pH=3.0	13
	80℃; 80 h; pH=6.0	10
Hayashi and Namiki(1986) ^[25]	[ala]=[glu]=2 M	
	100℃; 190 min; pH=2.3	12
	100℃; 53 min; pH=6.5	9
	100℃; 25 min; pH=9.2	7.5
Olsson et al(1978) ^[26]	H ₂ O; 100 ℃; 120 h; pH=5	12
	[gly]=0.5 M; [glu]=0.75 M	

Yaylayan 和 Kaminsky^[14]将葡萄糖/甘氨酸在 65℃ 下的 Maillard 高分子产物反复经过凝胶柱提纯分级后,得到分子量在 10000~20000 之间的三种聚合物(PA、PB₁、PB₂),并且对其分别进行了元素分析,计算出了三种聚合物的经验最简式,其中 PA 为 C₇H₁₁N₁O₄、PB₁ 和 PB₂ 为 C₁H₂O。这说明 PA 中氮元素来自于 Amadori 重排产物或者它的衍生物,PB₁ 和 PB₂ 则主要来源于葡萄糖、1-脱氧葡萄糖酮或者 3-脱氧葡萄糖酮。

2.3 放射性同位素标记

放射性同位素标记是研究 Maillard 高分子产物的组成来源和形成机理的一种常用手段。在形成 Maillard 高分子产物过程中,糖分子和氨基酸分子是如何引入高分子链中,以何种形式引入,氨基酸的 Strecker 降解产物是否参与 Maillard 高分子产物的形成,这一系列的问题至今尚未解决。通过对糖分子和氨基酸分子在不同位置上进行同位素标记,可以得到和上述问题相关的一些信息^[27]。

Wedzicha 等通过放射性同位素标记对葡萄糖/甘氨酸和麦芽糖/甘氨酸的 Maillard 高分子产物中糖和氨基酸残基的引入形式、糖和氨基酸引入高分子链中的化学计量比以及 Strecker 降解产物的引入情况进行了研究^[12, 28]。Wedzicha 等在实验中分别向相同条件的各反应体系中加入一定量的[U-¹⁴C]葡萄糖、[U-¹⁴C]麦芽糖、[U-¹⁴C]甘氨酸或者[1-¹⁴C]甘氨酸。反应结束后测试各 Maillard 高分子产物中的¹⁴C 的活性,并将其转化为所属分子的浓度。通过同位素标记 Wedzicha 等发现糖分子中的碳原子能全部进入高分子链中,而甘氨酸则有的全部进入,有的部分进入,这说明甘氨酸存在两种引入方式,一种是整个分子都进入高分子链中,另一种是甘氨酸分子以 Strecker 降解产物的形式进入高分子链中。应该注意得是,这里所说的糖和氨基酸引入高分子链中,不是指分子按照原有结构引入,仅仅是指糖和氨基酸分子中碳原子。Wedzicha 等还发现葡萄糖/甘氨酸和麦芽糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物在 470nm 处的吸光度与产物中所引入的标记物的浓度是呈线性关系的,因此可以利用这一线性关系,计算出 Maillard 高分子产物中引入的

完整甘氨酸、脱羧甘氨酸和糖分子的之间的比例,从而得到糖与氨基酸的化学计量比。在葡萄糖/甘氨酸和麦芽糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物中引入糖和氨基酸的比例分别为 1:0.95 和 1:1.44,而且分子链中引入的脱羧甘氨酸的量是完整甘氨酸的两倍。此外在葡萄糖/甘氨酸和麦芽糖/甘氨酸体系中,还可根据同位素标记法测得的完整甘氨酸、脱羧甘氨酸和糖分子的之间的比例,计算出 Maillard 高分子产物 C/N 值,并且还将其与元素分析得到的结果进行了对比,两者几乎一致。

2.4 紫外-可见光谱(UV-vis)分析

通过紫外-可见光谱测试,可以得到 Maillard 高分子产物的发色基团、分子结构、消光性质等方面的信息。Feather 等^[23]对葡萄糖/甘氨酸、果糖/甘氨酸和 5-羟甲基-2-糠醛/甘氨酸 Maillard 反应体系的 8 h 反应的原液和长时间透析并冻干得到的 Maillard 高分子产物分别进行了紫外测试。结果表明反应体系很快就产生具有紫外吸收的物质,而且每个体系的反应原液在 285nm 处都有一个宽而强的吸收,但是 Maillard 高分子产物在这一段波长范围内却几乎没有吸收。5-羟甲基-2-糠醛是 Maillard 反应的中间产物,也被认为是形成 Maillard 高分子产物的反应物。5-羟甲基-2-糠醛在 230nm 和 285nm 处有较强的吸收,而 Maillard 高分子产物却没有吸收,这可能是由于 5-羟甲基-2-糠醛在参与聚合反应时发生了开环反应或者是其它分子加成到了双键,从而改变了紫外吸收特性。Olsson 等^[29]也报道了类似的 Maillard 高分子产物没有紫外吸收,然而 Barbetti 等^[30]却发现这一类 Maillard 高分子产物有很显著的紫外吸收,而且分子链中还含有完整的呋喃环。

Martins 等^[24]采用紫外-可见分光光度计对葡萄糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物的消光系数进行了研究,讨论了三种不同反应条件(A: 120℃, pH=6.8; B: 100℃, pH=6.8; C: 100℃, pH=5.5)对消光系数的影响。实验中分别在 420、450、470、490nm 波长处测试吸光度并分别计算消光系数。结果发现消光系数几乎不受 pH 值、温度影响,在加热的 8 h 内基本保持恒定。Martins 等通过测试不同反应条件的反应原液和透析后的高分子产物在 470nm 处的吸光度,发现体系的吸光度 80%以上是由小分子有色物质贡献的,而 Maillard 高分子产物只贡献了很小的部分。这说明大部分的有色物质并没有保留在高分子产物中,而且在 Maillard 反应中高分子物质的产率非常低。Leong^[31]和 Hofmann^[19]等对葡萄糖/甘氨酸(55℃, pH=5.5)、葡萄糖/甘氨酸(95℃, pH=7.0)、葡萄糖/丙氨酸(95℃, pH=7.0)等体系的研究也得到了非常接近的结果。通过对消光系数的研究还发现 Maillard 高分子产物中的反应初期形成的发色团和反应后期形成的发色团是类似的,而且这些发色团的形成并不受发应条件的影响。

2.5 红外光谱分析(IR)

红外光谱是研究有机分子结构的主要手段之一,已经被广泛用于 Maillard 高分子产物的分子结构的分析。Rubinsztain 等^[32,33]在 Maillard 高分子产物的红外光谱表征方面做了非常深入的研究。Rubinsztain 等分别对半乳糖与甘氨酸、精氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、缬氨酸,在 100℃的碱性水体系中生成的 Maillard 高分子产物进行了红外光谱测试,并对谱图进行了详细的解析。在实验过程中,Rubinsztain 等选择了四种反应配比,分别为只有半乳糖没有氨基酸的体系以及半乳糖/氨基酸为 9:1、1:1、1:9。红外光谱测试表明只有半乳糖的体系和半乳糖/氨基酸为 9:1 的体系生成的 Maillard 高分子产物的红外谱图几乎是一致的,而半乳糖/氨基酸为 1:1 和 1:9 的体系生成的 Maillard 高分子产物的红外谱图几乎是一致的,因此 Rubinsztain 等将前两种糖过量的体系生成的 Maillard 高分子产物归为一类(Type1),而将后 1:1 和 1:9 的 Maillard 高分子产物归为另一类(Type2)。通过对红外光谱的解析发现:Type1 的分子链中存在芳香环和羰基,而在 Type2 的红外光谱中芳香环和羰基的特征吸收峰很弱甚至没有;Type1 的分子链中存在羟基,而 Type2 的分子链中几乎不存在羟基,这可能是由于后者糖分子的羟基参与了糖和氨基酸的缩合反应;Type1 和 Type2 的分子链中都含有羧基,但是 Type2 的羧基含量明显比 Type1 的高,而且 Type2 的羧基主要以羧酸根离子形式存在。Type1 和 Type2 中的氮都以叔胺的形式存在,而且很可能并没有参与杂环的形成。Type1 和 Type2 的红外光谱中都没有酰胺键的特征吸收峰(1660, 1540, 600~750 cm^{-1}),这说明在 Maillard 高分子产物形成过程中并没有肽键的形成。

2.6 核磁共振(NMR)

核磁共振是目前研究有机分子结构最重要的手段。在运用核磁共振研究 Maillard 高分子产物时,一

一般都采用 ^{13}C -NMR 和 ^{15}N -NMR, 很少运用 ^1H -NMR。Maillard 高分子产物能溶于碱性水溶液和部分溶于水中, 因此, Rubinsztain 等^[34]试图用 D_2O 将其溶解, 进行 ^1H -NMR 分析, 但是发现 Maillard 高分子产物的 H 和 D 会发生互换, 而且所产生的吸收峰也特别宽, 从而认为采用 ^1H -NMR 研究 Maillard 高分子产物是不可行的。Rubinsztain 等在采用 CP-MAS ^{13}C -NMR 对半乳糖/异亮氨酸 Maillard 高分子产物进行分析时, 发现在半乳糖过量的产物的分子链中碳原子主要与氧原子发生了键合, 而很少以 $-\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2$ 或 $-\text{CH}_3$ (sp^3) 的结构存在, 而在氨基酸过量的产物的分子链中却存在大量的 sp^3 杂化碳原子, 很少存在 sp^2 杂化碳原子(芳香基、双键和杂环芳香基)和与氧原子键合的碳原子。此外通过 ^{13}C -NMR 分析很难确定氮原子的所处的化学环境。Olsson 等^[29]则指出 Maillard 高分子产物的核磁谱图 and 一类 Amadori 重排产物的相似。Benzing-Purdie 和 Ripmeester^[35]通过 ^{13}C -NMR 分析则指出葡萄糖/甘氨酸和木糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物中存在大量的脂肪族碳原子, 也含有芳香基、羰基和羧基碳原子。Maillard 高分子产物的分子结构是非常复杂的, Rubinsztain、Olsson 和 Benzing-Purdie 等对其进行的 ^{13}C -NMR 测试又是在自然丰度下进行的, 因此所得结果的吸收峰较宽, 各峰之间的发生了重合, 谱图的解析比较困难。

Feather 等^[23,36]在对 Maillard 高分子产物进行自然丰度下的 ^{13}C -NMR 分析时所得的结果和 Rubinsztain 等的类似, 也很难进行谱图的解析。为了使 ^{13}C -NMR 能更加有效地对 Maillard 高分子产物的形成机理和分子结构进行剖析, Feather 等采用了同位素标记的 Maillard 高分子产物进行测试, 使所得的谱图得以简化, 从而解谱变得容易。Feather 等在对葡萄糖/甘氨酸 Maillard 体系进行 ^{13}C -NMR 分析时, 分别对 $[1-^{13}\text{C}]$ 葡萄糖、 $[1-^{13}\text{C}]$ 甘氨酸和 $[2-^{13}\text{C}]$ 甘氨酸的产物进行了测试, 结果发现体系中的小分子部分主要是没有反应的糖、氨基酸和 Amadori 重排产物。在对高分子产物的分析中, $[1-^{13}\text{C}]$ 甘氨酸产物的吸收峰主要集中在 155-160 ppm 之间, 这说明甘氨酸在引入高分子链时 1-C 的氧化态没有改变, 仍然以羰基或羧基的形式存在。此外, 甘氨酸的 1-C 存在吸收峰, 这还说明甘氨酸在引入高分子链时 1-C 并不是全部以 CO_2 的形式释放出体系, 而是有一部分 1-C 进入了高分子链中。 $[2-^{13}\text{C}]$ 甘氨酸产物的吸收峰主要集中在 60 ppm, 这说明甘氨酸的 2-C 的氧化态也没有发生变化, 仍以取代甲基存在。 $[1-^{13}\text{C}]$ 葡萄糖产物的 ^{13}C -NMR 分析表明葡萄糖的 1-C 在引入高分子链时有的以羰基形式存在, 有的以取代甲基形式存在。Feather 等虽然通过同位素标记的 ^{13}C -NMR 分析, 对 Maillard 高分子产物碳原子的结构进行了比较深入的研究, 但是没有对分子链中的另一重要组分氮原子进行探讨。

Kato 等^[37]对葡萄糖/ ^{15}N 甘氨酸的 Maillard 高分子产物进行了 CP-MAS ^{15}N -NMR, 结果发现吸收峰主要出现在 70~120 ppm 之间。Kato 等认为氮原子主要以烯胺的形式存在, 而且推测 Maillard 高分子产物的分子链中并不存在吡啶或吡嗪形式的氮, 可能存在吡咯氮。

2.7 热裂解分析

由于 Maillard 高分子产物的复杂性, 运用常用的有机波谱结构分析手段仍然不能对其结构进行准确的剖析。为了进一步了解 Maillard 高分子产物的成分与结构, 热裂解分析也是一种非常有效的手段。通过对 Maillard 高分子产物的热裂解物的分析, 可以得到有关成分和结构的信息。此外, 当将 Maillard 高分子产物作为一种潜香物质或香料前体进行研究时, 热裂解分析也是研究其通过加热产生的香味物质的最有效、最直接的手段。

Adams 等^[38,39]对葡萄糖/甘氨酸、葡萄糖/谷氨酸和维生素 C/甘氨酸 Maillard 高分子产物的进行了比较详细热裂解分析。为了使所得的结果具有可比性, Adams 等在制备 Maillard 高分子产物时采用的是 COST Action 919(COST, European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research)提出的标准方法^[40]。而热解产物的分析手段采用的是固相微萃取(SPME)和气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)。在葡萄糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物的热裂解分析发现: 无论在水溶性还是非水溶性 Maillard 高分子产物, 其热解产物中含量最多是呋喃类物质, 其次是吡嗪、羰基化合物、吡啶、吡咯和唑类物质, 而且随着加热温度的升高, 热解产物的量也增加。呋喃类和吡咯类物质的产生说明 Maillard 高分子产物的分子链结构中可能存在呋喃环和吡咯环, 但是 Kato 和 Tsuchida 却认为 Maillard 高分子产物的分子链中本身不含吡咯环, 吡咯类分子是在热解过程中形成的^[41]。热解过程中这些香味物质的产生, 证明了 Maillard 高分子产物可以作为潜香

物质或香料前体加以利用,但是它们的形成机理尚不清楚。与葡萄糖/甘氨酸体系相比,维生素 C/甘氨酸 Maillard 高分子产物的热解产物中含氮杂环类物质的相对含量较高,而葡萄糖/谷氨酸 Maillard 高分子产物的热解产物中却没有含氮杂环类物质。葡萄糖/谷氨酸 Maillard 高分子产物的热解不产生含氮杂环类物质是由于谷氨酸形成氮杂环类物质的反应活性很低,即使直接对其进行热解,所释放的氨与甘氨酸相比也很少^[42, 43]。相反,甘氨酸由于没有侧链,分子更具柔性,因此反应活性很高,从而使其 Maillard 高分子产物引入更多的氮元素。Adams 等还对葡萄糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物的酸解产物进行了热裂解分析,结果发现酸解后的高分子量部分的热解产物主要是呋喃和吡咯类物质,低分子量部分的热解产物主要是呋喃、吡咯和吡啶类物质。由于葡萄糖分子在反应时绝大部分引入了 Maillard 高分子产物的主链中,只有很少的部分引入侧链^[15],因此从理论上讲,如果酸解只导致侧链上糖残基的断裂,低分子量部分应该含量很低,而且热解产物应该只有呋喃,但是实际却产生了含氮杂环类物质。这可能一方面是由于酸解不仅导致糖残基侧链的断裂,主链也发生了降解;另一方面,也可能是由于断裂的糖残基和含氮的片段在酸解过程中发生了反应。此外,Adams 等还对一系列食物 Maillard 高分子产物进行了热裂解分析^[16]。

Rubinsztain 等^[34, 44]采用了居里点热解/质谱(Py/MS)和居里点热解/气相色谱/质谱(Py/GC/MS)两种方法对葡萄糖、半乳糖和酪氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸的 Maillard 高分子产物进行了热解分析。Py/MS 分析主要能得到 Maillard 高分子产物的指纹信息;Py/GC/MS 分析则可以得到与 Maillard 高分子产物的分子结构相关的信息。Rubinsztain 等进行的热解分析发现:氨基酸的特征链结构在其 Maillard 高分子产物的分子中仍然存在;Py/MS 的分析结果受裂解温度的影响不大,而受糖氨比的影响则很显著;Maillard 高分子产物的 Py/MS 的分析结果不同于其对应的多糖和多肽的 Py/MS 的分析结果。此外,Py/GC/MS 分析结果表明热解产物主要是含氧类(呋喃、甲基呋喃、苯酚、邻苯二酚等)和含氮类(吡啶、哌啶、吡嗪等)物质。值得注意的是 Rubinsztain 等的热解分析中没有检测到大量吡咯类物质的存在。Kato 和 Tsuchida^[41]的热解研究也发现 Maillard 高分子产物的分子链中吡咯环并不是主要组分。然而 Adams 等却发现热解产物中含大量的吡咯类物质,这可能是由于他们所采用的不同分析方法造成的。Maillard 高分子产物的链结构中是否大量存在吡咯环至今仍是 Maillard 高分子产物的研究中的一大争议,需要进一步研究加以证明。

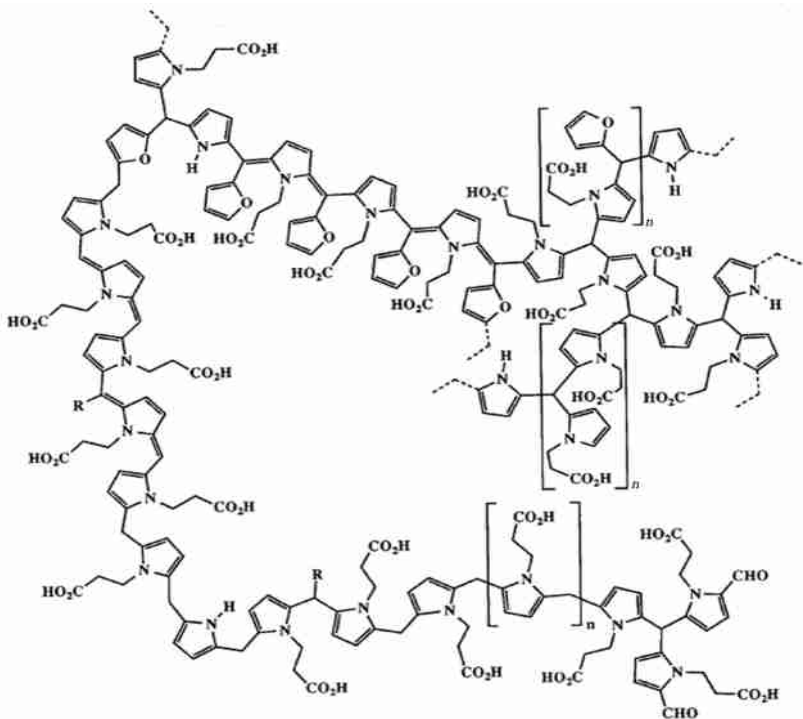


图 1 Tressl 等提出的 Maillard 高分子产物分子结构的假设模型^[46]

Figure 1 Hypothesis of molecular structure of Maillard polymeric product proposed by Tressl^[46]

3 Maillard 反应的高分子产物的分子结构假设模型

虽然人们采用了各种先进的仪器分析手段对 Maillard 高分子产物进行了表征,但仍然不能彻底揭示其形成机理和分子结构。目前,研究者们只能根据各自的研究结果提出了各种形成机理和分子结构的假设。本文在此将介绍三种被普遍认可的假设模型。

戊糖和己糖的 Maillard 反应中会产生吡咯类、糠醛类和呋喃类中间产物。Tressl 等^[45, 46]选用了一些特征的中间产物进行模型实验,发现这些中间产物能够发生聚合,形成以吡咯环或呋喃环为组成单元的直链型聚合物和支链型聚合物。Tressl 等认为直链和支链结构只是 Maillard 高分子产物的亚结构,在实际的 Maillard 反应中两种聚合方式应该同时存在,而且 Strecker 降解产生的非取代吡咯和醛也可能引入 Maillard 高分子产物的链结构中,因此提出了如图 1 所示的分子结构模型。

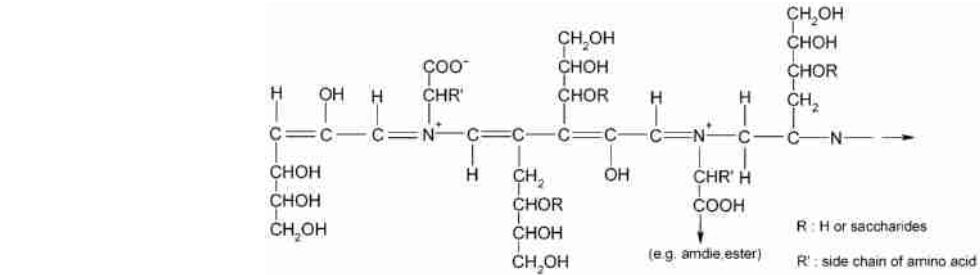


图 2 Korh 等提出的 Maillard 高分子产物分子结构的假设模型^[13]

Figure 2 Hypothesis of molecular structure of Maillard polymeric product proposed by Korh^[13]

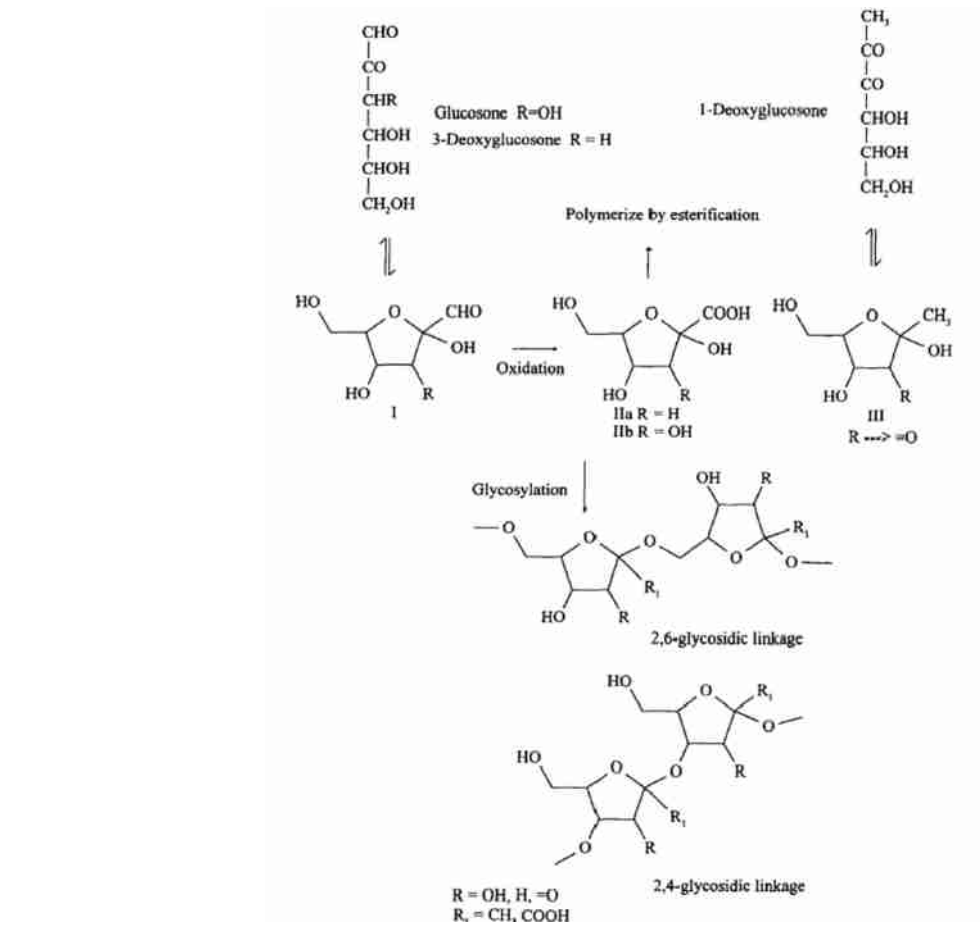


图 3 Yaylayan 提出的非含氮 Maillard 高分子产物的形成机理和分子结构假设模型^[14]

Figure 3 Hypothesis of formation mechanism and molecular structure of non-nitrogen containing Maillard polymeric

product proposed by Yaylayan^[14]

Korh 等认为 Maillard 反应中的具有反应活性中间产物二羰基化合物如 3-脱氧己糖酮,能发生醇醛缩合或则亲核加成从而形成聚合物,与此同时氨基酸通过取代反应接支到主链上^[13]。此外,Korh 等还发现完整的糖单元能以侧链的形式引入 Maillard 高分子产物的链结构中,并且无水条件下产生 Maillard 高分子产物的糖单元含量较多,而水体系中产生的 Maillard 高分子产物的糖单元含量相对较少^[13]。Korh 等提出的 Maillard 高分子产物分子结构模型(如图 2 所示)。

Yaylayan 和 Kaminsky^[14]对分级提纯后的葡萄糖/甘氨酸 Maillard 高分子产物进行元素分析,发现产物包括非含氮高分子和含氮高分子。Yaylayan 和 Kaminsky 认为脱氧己糖酮首先形成呋喃类物质,然后呋喃类物质在通过酯键或糖苷键的形式相互连接从而生成非含氮 Maillard 高分子产物,(如图 3 所示)。而在含氮 Maillard 高分子产物的形成过程中,Amadori 重排产物可通过一个分子的氨基和另一个分子的羰基间的亲核加成发生聚合,然后脱氢形成两性离子聚合物,进一步脱氢或氢原子分子内转移、脱丁二酸即得到最终产物,(如图 4 所示)。

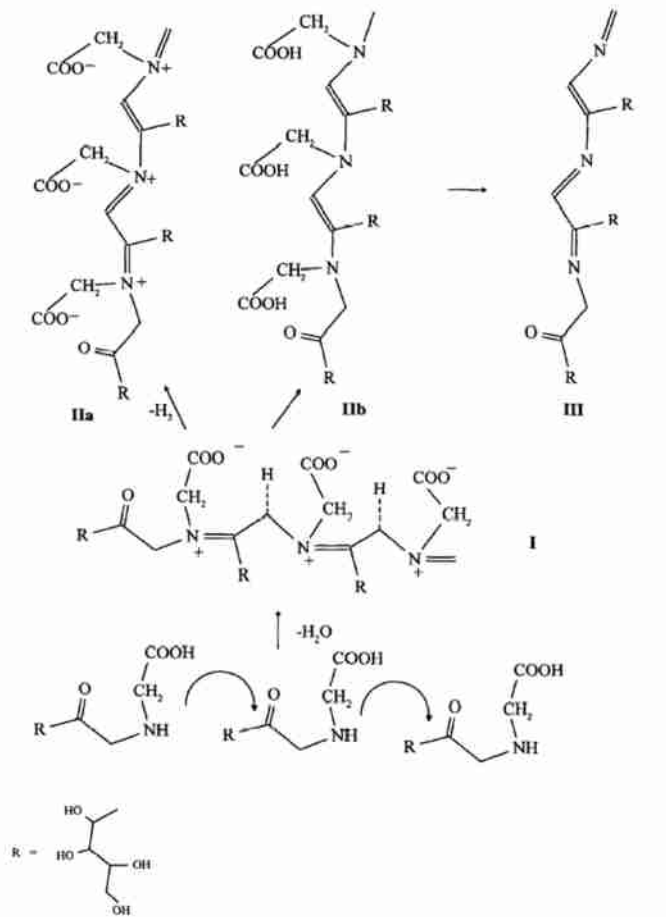


图 4 Yaylayan 提出的含氮 Maillard 高分子产物的形成机理和分子结构假设模型^[14]

Figure 4 Hypothesis of formation mechanism and molecular structure of nitrogen containing Maillard polymeric product proposed by Yaylayan^[14]

4 结束语

Maillard 高分子产物作为一种极具应用价值的香料前体,其加香效果的好坏、产品质量的控制以及毒理学评价都必须依赖于对其形成机理和分子结构准确剖析。因此,对 Maillard 高分子产物的基础研究还应该继续深入进行,而且随着仪器分析水平的不断提高,这一系列的难题也必将得以解决。

参考文献:

- [1] O'Brien J, Morrissey P A. CRC Crit Rev Food Sci Nutr, 1998, 28;211~248.
- [2] Reynolds T M. Adv Food Res, 1963, 12;1~52.
- [3] 吴松, 秦军. 中国信息科技, 2005, 11;71.
- [4] 吴鸣, 谢剑平. 烟草科技, 1996, 6;14~15.
- [5] 孙凤玲, 蔡妙颜, 李冰. 广东化工, 2005, 1;26~29.
- [6] 孙凤玲, 蔡妙颜, 蔡金, 等. 中国烟草科学, 2005, 4;5~7.
- [7] 刘国珍, 朱巍, 黄龙, 等. 烟草科技, 2002, 10;30~33.
- [8] 周正红, 杨华连, 沈光林. 烟草科技, 1998, 4;8~11.
- [9] 李元实, 韩民杰, 朱良华. 烟草科技, 2001, 4;5~7.
- [10] 吴松, 秦军. 贵州工业大学学报(自然科学版), 2005, 34(4);17~20.
- [11] Martin S I F S, Jongen W M F, Van Boekel M A J S. Trends in Sci Tech, 2001, 11;364~373.
- [12] Mundt S, Wedzicha B L. J Agric Food Chem, 2004, 52;4256~4260.
- [13] Cammerer B, Kroh L W. Food Chem, 1995, 53;55~59.
- [14] Yaylayan V A, Kaminsky E. Food Chem, 1998, 63;25~31.
- [15] Cammerer B, Jalyschko W, Kroh L W. J Agric Food Chem, 2002, 50;2083~2087.
- [16] Adams A, Borrelli R C, Fogliano V F, et al. J Agric Food Chem, 2005, 53;4136~4142.
- [17] Agostina A D, Boschini G, Bacchini F, et al. J Agric Food Chem, 2004, 52;7118~7125.
- [18] Royle L, Richard G, Jennifer M. Food Chem, 1998, 62;425~430.
- [19] Hofmann T. J Agric Food Chem, 1998, 46;3891~3895.
- [20] Rubinsztain Y, Ioselis P, Ikan R, Aizenshtat Z. Org Geochem, 1984, 6;791~804.
- [21] Bobbio P A, Imasato H, Leite S R A. Ann Acad Brasil Cienc, 1981, 53;83~86.
- [22] Wedzicha B L, Kaputo M T. Food Chem, 1992, 43;359~367.
- [23] Feather M S, Nelson D. J Agric Food Chem, 1984, 32;1428~1432.
- [24] Martins S I F S, Boekel M A J S. Food Chem, 2003, 83;135~142.
- [25] Hayashi T, Namiki M. Agric Biol Chem, 1986, 50;1965~1970.
- [26] Olsson K, Pernemalm P A, Theander O. Acta Chemica Scandinavia B, 1978, 32;249~256.
- [27] Wedzicha B L, Leong L P. Food Chem, 2000, 68;21~28.
- [28] Wedzicha B L, Vasiliauskaite R. Food Chem, 1997, 59;229~235.
- [29] Olsson K, Pernemalm P A, Theander O. In "Progress in food and nutritional science-Maillard reactions in food". Eriksson, C. . Ed. Pergamon Press: New York, 1982, Vol. 5.
- [30] Barbetti P, Chiappini I. Ann Chim(Rome) 1976a, 66;239~304.
- [31] Leong L P. Modelling the Maillard reaction involving more than one amino acid. PhD thesis, Procter Department of Food Science, University of Leeds, UK. 1999.
- [32] Rubinsztain Y, Yariv S, Ioselis P, et al. Org Geochem, 1986, 9;371~374.
- [33] Rubinsztain Y, Yariv S, Ioselis P, et al. Org Geochem, 1986, 9;117~125.
- [34] Rubinsztain Y, Ioselis P, Ikan R, et al. Org Geochem, 1984, 6;791~804.
- [35] Benzing-Purdie L, Ripmeester J A. Soil Sci Soc Am J, 1983, 47;56~61.
- [36] Huang R D, Feather M S. J Agric Food Chem, 1988, 36;673~676.
- [37] Hayase F, Kim S B, Kato H. Agric Biol Chem, 1986, 50;1950~1957.
- [38] Tehrani K A, Kersiene M, Adams A, et al. J Agric Food Chem, 2002, 50;4062~4068.
- [39] Adams A, Abbaspour K, Kersiene M, et al. J Agric Food Chem, 2003, 51;4338~4343.
- [40] Ames J M, Cammerer B, Velisek J, et al. The nature of melanoidins and their investigation. Melanoidin in Food and Health, Vol. 1. J. M. Ames, Ed. Office for Official Publications of the European Communities; Luxembourg, EUR 19684, 2000;13~29.
- [41] Kato H, Tsuchida H. Prog Food Nutr Sci, 1981, 5;147~156.
- [42] Hwang H, Hartman T G, Ho C. J. Agric Food Chem, 1995, 43;2917~2921.
- [43] Sohn M, Ho C. J Agric Food Chem, 1995, 43;3001~3003.
- [44] Boon J J, Leeuw J W, Rubinsztain Y, et al. Org Geochem, 1984, 6;805~811.
- [45] Tressl R, Wondrak G T. J Agric Food Chem, 1998, 46;104~110.
- [46] Tressl R, Wondrak G T, Garbe L A. J Agric Food Chem, 1998, 46;1765~1776.

Progress in Polymeric Products of Maillard Reaction

ZENG Shi-tong, HU Jun^{*}

(Zhengzhou Tobacco Research Institute, China Tobacco Company, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Maillard reaction products has been extensively attentioned in food and tobacco industry, because of their natural property and unique flavor. Small molecular compounds produced in Maillard reaction have been generally clarified so far, while polymeric products have not been well understood due to complexity of the system. However, through characterized by GPC, microanalysis, radiochemical investigation, UV-vis, IR, NMR and pyrolysis after purified by dialysis and colomn chromatography, some information related to molecular structure and formation mechanism of Maillard polymeric product was derived. In this paper, separation, characterization and hypothesises of molecular structure of polymeric products formed in Maillard reaction were summarized.

Key words: Maillard reaction; Polymeric products; Separation; Characterization; Flavouring