

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2006 年 9 月 28 日 (28.09.2006)



PCT



(10) 国际公布号
WO 2006/099798 A1

(51) 国际专利分类号:

A23L 1/015 (2006.01) A24B 3/00 (2006.01)
A23L 1/211 (2006.01) A23L 1/10 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01) A23L 1/217 (2006.01)
A23F 5/10 (2006.01) A23L 1/311 (2006.01)
A23G 1/30 (2006.01)

州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。张根义(ZHANG, Genyi) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。楼鼎鼎(LUO, Dingding) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。董怡(DONG, Yi) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/000431

(22) 国际申请日: 2006 年 3 月 20 日 (20.03.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

200510049402.1
2005 年 3 月 21 日 (21.03.2005) CN
200510049401.7
2005 年 3 月 21 日 (21.03.2005) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 杭州浙大力夫生物科技有限公司(ZHEJIANG UNIVERSITY (HANGZHOU) INNOESSEN BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市文三路388号钱江科技大厦13楼, Zhejiang 310012 (CN)。浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号, Zhejiang 310029 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 张英(ZHANG, Ying) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。吴晓琴(WU, Xiaoqin) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。章宇(ZHANG, Yu) [CN/CN]; 中国浙江省杭

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A METHOD FOR USING BAMBOO LEAF EXTRACT AS ACRYLAMIDE INHIBITOR FOR HEAT PROCESSING FOOD

(54) 发明名称: 应用竹叶提取物作为热加工食品中丙烯酰胺抑制剂的方法

(57) Abstract: A method for using bamboo leaf extract as acrylamide inhibitor for heat processing food, comprises adding to bamboo leaf extract by at least one of ginkgo extract, tea extract, rosemary extract, apple polyphenol extract, haw extract, onion extract, licorice extract, root of kudzu vine extract, grape seed extract and leech extract; and preparing a complex, in which the bamboo leaf extract amounts to 34-95 % of the total weight of the complex. The bamboo leaf extract used as the acrylamide inhibitor to above food system has the inhibiting rate to acrylamide of up to 15-98 %.

(57) 摘要: 本发明公开了一种应用竹叶提取物作为热加工食品中丙烯酰胺抑制剂的方法, 在竹叶提取物中添加银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蒡提取物中的至少一种制成复配物, 竹叶提取物占复配物总重的34-95%。本发明的竹叶提取物作为丙烯酰胺抑制剂在上述食品体系中使用, 其对丙烯酰胺的抑制率达15-98%。

WO 2006/099798 A1

应用竹叶提取物作为热加工食品中丙烯酰胺抑制剂的方法

技术领域

5 本发明涉及热加工食品安全领域；尤其是涉及以黄酮和酚酸类化合物为主要化学成分的天然竹叶提取物，在热加工食品中作为丙烯酰胺抑制剂的应用。

背景技术

10 食品安全是关系生命健康和国计民生的重大问题，它的决定因素是食品危害，所以解决食品安全问题应从食品危害入手，也就是从物理危害、化学危害和微生物危害这三种食品危害入手。物理危害容易监测和防范，微生物危害需在食品加工过程中加以控制，而化学危害(例如农药、兽药残留等)从一般意义上讲，是在食品原料生长中由于人为因素而加入的，可从源头实施控制。最令人棘手的是，某些化学危害物并非来源于外部环境，而是在食品加工过程中自然形成的，如热加工食品中的丙烯酰胺(acrylamide)。

15 2002 年 4 月，瑞典斯德哥尔摩大学的 Margareta Törnqvist 首次在油炸或焙烤的马铃薯和谷物类食品中发现了具有神经毒性的潜在致癌物丙烯酰胺[Tareke, E. *et al.* Analysis of Acrylamide, a carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *J. Agri. Food Chem.*, 2002, 50: 4998-5006]，她在报道中指出“淀粉类食品经过 120° C 以上的高温加工后，其中所含的丙烯酸胺会大大超出安全标准，长期食用者可导致癌症”的观点一度引起了人们的恐慌。这一发现促使瑞典国家食品管理局(Swedish National Food Administration, SNFA)对随机抽取的一百多种食品进行了检验和分析，并在其官方网站上公布了检验结果。2002 年 5 月 17 日，英国食品标准局(Food Standards Agency, FSA)公布了类似的结果，随后，挪威、美国、澳大利亚、新西兰、加拿大等国的负责食品安全的政府机构对丙烯酰胺在食品中的含量也进行了测定并公布了结果，瑞典科学家的发现被广泛证实。与此同时，许多国际组织和研究机构对丙烯酰胺在食品中的形成机理、毒理学、风险评估等各方面展开了研究。2005 年 3 月 2 日，世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)属下的食品添加剂联合专家委员会在日内瓦发表声明，含有致癌毒素——丙烯酰胺化合物(简称“丙毒”)的食品会严重危害人的健康，特别是“洋快餐”的多种食物中均含有大量丙毒。丙烯酰胺是一种公认的神经毒素和致癌物[JIFSAN/NCFST Workshop “Acrylamide in food, scientific issues, uncertainties, and research strategies,” 28-30th October 2002. Rosemont, USA]，动物实验表明，长期暴露在丙烯酰胺的环境中，不仅会引发神经系统的病变，而且可能导致各种癌变。进一步研究表明这一化学危害物并不存在于食品原料中，而是在食品加工过程中形成的[Mottram, D.S., *et al.* Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, 419: 448-449; Stadler, R.H., *et al.* Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 2002, 419: 449-450]。

35 丙烯酰胺是一种白色晶体，溶于水、乙醇、甲醇、二甲醚、丙酮，而不溶于非极性溶剂如庚烷和苯，它的 α -不饱和氨基系统非常容易和亲核物质(例如蛋白质中半胱氨酸的巯基)通过 Michael Addition 发生化学反应，从而影响蛋白质的正常功能而致病。

各国政府对丙烯酰胺都有一定的限量标准，如饮用水中规定不超过 0.5 g/L。比照

这个标准, 每 kg 油炸薯片中应至多含有 0.5 g 的丙烯酸胺, 而实际情况是, 炸薯片中丙烯酸胺的含量高达 1480 g/kg, 是正常安全标准的 2960 倍。其它一些淀粉类食品, 像烤面包片、饼干等经高温处理的食品中丙烯酸胺的含量也大大超出安全标准。在我国广泛消费的大众化食品中有着类似热加工方式(加工温度 $\geq 120^{\circ}\text{C}$)的有以油条、烧饼为代表的传统早餐食品, 以油炸方便面、谷物早餐为代表的引进速食品, 以咖啡、可可为代表的饮品, 还有以烟草和香烟为代表的副食品。可令人遗憾的是, 自 2002 年热加工食品中丙烯酸胺的发现距今两年多的时间里, 我国在这方面的监测、监控和危害评估几近空白。

对丙烯酸胺产生机理的研究表明, 丙烯酸胺是由游离的天门冬酰胺通过美拉德反应(Maillard Reaction)而形成的, 如今这一机理基本得到确认。美拉德反应是由还原性糖和氨基酸或蛋白质中的自由氨基在高温条件下所发生的一系列复杂的化学反应, 它是热加工食品风味产生的重要途径之一。美拉德反应主要有三个反应阶段, 第一阶段是由还原糖的羰基和氨基酸的氨基形成的具有“C=N”键的 Schiff 碱, 经过重排而生成 Amadori 或 Heyns 产物; 第二阶段是 Amadori 或 Heyns 产物通过不同途径降解而成多种风味化合物和中间体; 最后阶段是美拉德反应棕黄色物质的形成。

由天门冬酰胺参与美拉德反应而形成丙烯酸胺的机理被称作天门冬酰胺途径。天门冬酰胺途径的开始是美拉德反应的初始阶段, 当 Schiff 碱中间物(与 *N*-糖基氨基酸处于动态平衡之中)形成以后, 两条不同的反应路线都可导致丙烯酸胺的产生: 一条继续美拉德反应, Schiff 碱经过 Amadori 重排生成 Amadori 产物, 继而脱水、脱氨生成含有羰基的产物, 天门冬酰胺在这些含有羰基的分子存在下可以通过 Strecker 降解机制在脱羧、脱氨后生成丙烯酸胺, 这一反应机理可以称作 Strecker 途径; 而另一条则是由 Schiff 碱经过分子内环化反应生成唑烷酮, 进而形成脱羧 Amadori 产物, 这一产物的“C-N”键在高温下被断裂而生成丙烯酸胺, 这一反应机理可叫做 *N*-糖苷(*N*-glycoside)途径[张根义. 热加工食品中丙烯酸胺的形成机理和风险分析. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4): 91-99]。Yaylayan 等和 Becalski 等的工作进一步证实了天门冬酰胺是形成丙烯酸胺的关键前体物质[Yaylayan, V.A., *et al.* Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 1753-1757; Becalski, A., *et al.* Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 802-808]; Elmore 等用土豆、小麦和黑麦的热加工模式系统也证实了食品中丙烯酸胺的形成机理和前体物质[Elmore, J.S., *et al.* Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 4782-4787]。

根据丙烯酸胺形成的上述理论, 如果去除食品原料中游离的天门冬酰胺或者抑制美拉德反应的进行, 热加工时丙烯酸胺的形成就会受到抑制。目前的实验研究表明, 在热加工过程中降低或抑制丙烯酸胺产生的途径主要有两种, 一是通过改变热加工的条件(包括热加工方式、时间、温度)来实现; 二是通过改变食品的加工属性来实现。首先, 丙烯酸胺的产生因热加工的时间和温度而异, 且受热加工方式的影响, 通过控制这些热加工过程中的关键条件, 从而达到降低或抑制丙烯酸胺产生之目的。例如, 通过水煮的方法, 控制加热温度在 $45-78^{\circ}\text{C}$ 以及加热时间在 4min 以上, 可达到抑制丙烯酸胺生成的目的[Lindsay, R.C. and Jang, S. Method for suppressing acrylamide formation. US patent, US2004/0224066 A1]; 通过控制油炸和加热过程以及先前的洗涤过程中的关键环节, 如完

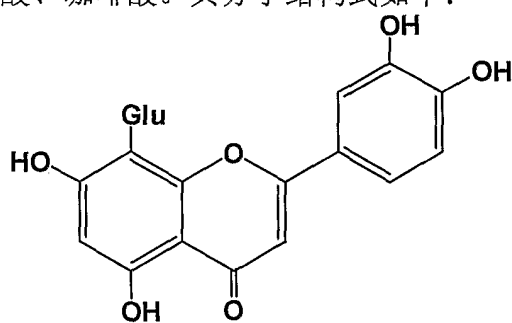
全去皮、充分洗涤、及时翻炸和沥干油分等措施来降低丙烯酰胺的生成[Barry, D.L. *et al.* Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods. PCT patent, WO2004/075656 A2], 其机理是通过降低油脂的热解度来抑制油脂-甘油-丙烯醛-丙烯酸-丙烯酰胺途径[Tricoit, J. *et al.* Method for preventing acrylamide formation during heat treatment of food. US patent, US2004/0115321 A1; Tricoit, J. *et al.* Method for preventing acrylamide formation during heat-treatment of food. EU patent, 03292813.7]。其次, 可通过改变或合理控制食品的加工属性或添加其它组分来降低或抑制丙烯酰胺的产生, 如富含盐类(包括钙、镁、铜、铝、铁盐)的食品, 由于其二价或三价金属阳离子的存在而使得它们在热加工过程中产生的丙烯酰胺很少[Elder, V.A. *et al.* Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods. PCT patent, WO 2004/075657 A2; Elder, V.A. *et al.* Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods. US patent, US 2004/0085045 A1]; 通过酸处理降低食品原料的 pH 值, 使亲核性强的氨基($-NH_2$)质子化为亲核性弱的胺类物质($-NH_3^+$), 可以抑制丙烯酰胺的产生[Baardseth, P. *et al.* Reduction of acrylamide formation. PCT patent, WO 2004/028278 A2; Jung, M.Y. *et al.* Method for the reduction of acrylamide formation. PCT patent, WO 2004/060078 A1; Jung, M.Y. *et al.* A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in french fries. *J. Food Sci.*, 2003, 68: 1287-1290]; 通过降低丙烯酰胺前体物质在食品原料中的含量(包括以微生物糖代谢的方式消耗还原糖或添加天门冬酰胺酶使天门冬酰胺转化为天冬氨酸)来抑制丙烯酰胺的产生 [Awad, A.C. Reduction of acrylamide formation in cooked starchy foods. US patent, US 2004/0086597 A1; Elder, V.A. *et al.* Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods. PCT patent, WO 2004/026042 A1]; 另外, 还可以利用竞争性抑制作用的原理, 添加一些其它氨基酸, 使其与还原糖反应, 从而限制天门冬酰胺与还原糖的反应, 这些氨基酸包括半胱氨酸、赖氨酸、甘氨酸、组氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸和精氨酸 [Elder, V.A. *et al.* Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods. PCT patent, WO 2004/075655 A2]。尽管这些方法从理论上可能对丙烯酰胺的产生具有不同程度的抑制作用, 但从方法的实用性、食品对色香味的要求以及食用安全性的角度来讲, 很难满足实际的需要, 所以还有待探索新的方法来降低丙烯酰胺的形成, 并保持食品原有的风味和质构。最近, 国内学者采用钙离子和阿魏酸作用于由天门冬酰胺和葡萄糖组成的模拟反应体系, 在钙离子和阿魏酸的最适添加范围以及最适反应温度和时间内发现其对丙烯酰胺的抑制率可达80%以上[欧仕益等. 用于高温加工食品的丙烯酰胺抑制剂及其应用工艺方法. 公开号 CN 1561866A], 但实际体系与模拟体系往往存在显著的差异, 其在实际体系中的应用效果还有待检验。同时, 由天门冬酰胺途径产生的丙烯酰胺随热加工条件变化的规律也有待进一步研究。

芬兰赫尔辛基大学食品技术研究所 2004 年最近公告的 PCT 专利称, 在制作炸薯条的过程中, 使用黄酮类化合物可大大减少薯条中的丙烯酰胺含量。其在制作薯条过程中添加了 0.05-0.15% 的植物提取物, 该提取物由绿茶提取物(45%)、苹果浓缩汁(45%)和洋葱浓缩汁(10%)组成, 富含大量的黄酮类化合物。结果发现, 在实际油炸过程中产生的丙烯酰胺减少了 50% [Kurppa, L. A process and composition for prevention of reducing the

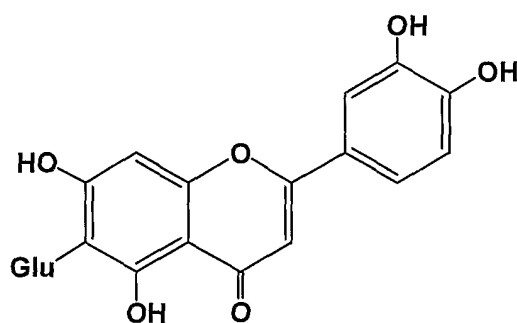
formation of acrylamide in foods. PCT patent, WO 2004/032647 A1].

黄酮类化合物是一种重要的食物功能因子, 广泛存在于药用植物和蔬菜、水果中, 具有很强的生物抗氧化活性, 对心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病等具有明显的防治效果。用植物黄酮来抑制食品体系中丙烯酰胺的形成可能是目前比较适用的方法, 因为这一方法融合了

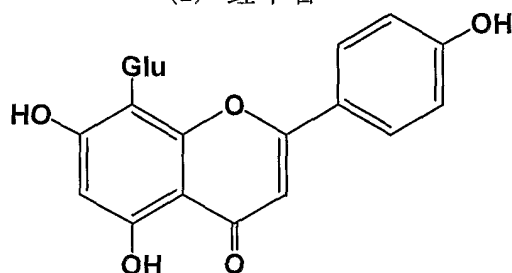
就其抗氧化性质而言, 植物黄酮类提取物中的许多品种, 如茶叶提取物、甘草提取物、迷迭香提取物等在世界范围内被广泛用作食品抗氧化剂。本发明者近期研发的一种竹叶提取物(竹叶抗氧化物)已于 2004 年 4 月被卫生部批准列入了《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》(GB-2760)。如专利申请号为 200310107871.5 所述的竹叶抗氧化物(AOB), 是一种从竹叶中提取的天然酚性部位, 以黄酮和酚酸类化合物为主要化学成分, 包括四种主要的竹叶碳苷黄酮和三种酚酸, 分别是荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷和绿原酸、阿魏酸、咖啡酸。其分子结构式如下:



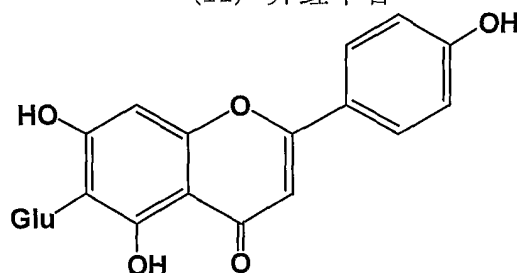
(I) 荭草苷



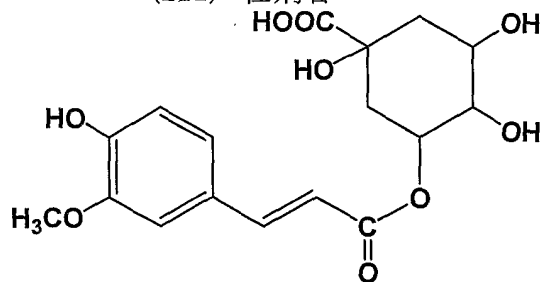
(II) 异荭草苷



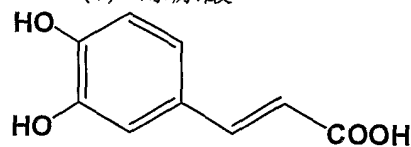
(III) 牡荆苷



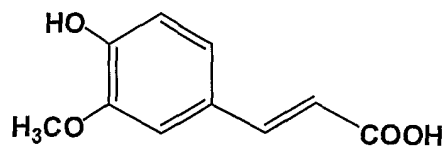
(IV) 异牡荆苷



(V) 绿原酸



(VI) 咖啡酸



(VII) 阿魏酸

竹叶碳苷黄酮的结构特点是黄酮母核在 6 位或 8 位以 C-C 键与葡萄糖相连, 由于 C-C 键合的强大键能, 这类化合物具有极高的结构稳定性, 遇酸完全不水解, 并能抗热解和酶

解,同时具有良好的亲水性,适用于多种食品体系,具有氧苷黄酮(0-glycosyl flavone)无法比拟的优越性,尤其是应用于高温处理的热加工食品。尽管人类对黄酮类化合物的研究已经有100多年的历史,但大量的研究工作主要集中在黄酮苷元(如槲皮素等)和氧苷黄酮(如芦丁等)上。自20世纪90年代起,国际上对碳苷黄酮的结构与功能性的研究开始起步,属国际前沿领域。迄今用碳苷黄酮抑制高温处理的食品中丙烯酰胺形成的研究未见公开报道。

鉴于竹叶“药食两用”的独特背景和竹叶提取物的优良禀赋,它在食品工业中的应用前景将十分广阔。

10 发明内容

本发明的目的是提供一种竹叶提取物的新用途,即在热加工食品中作为丙烯酰胺抑制剂的应

15 在本发明的第一方面,提供了一种竹叶提取物的用途,它被用于制备热加工食品中丙烯酰胺抑制剂。

在另一优选例中,所述抑制剂中含有1-99wt%(较佳地34-95wt%)竹叶提取物。

在另一优选例中,所述抑制剂中还含有银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

20 在另一优选例中,所述抑制剂中含有34-95wt%竹叶提取物,以及5-66wt%的所述天然提取物(如植物提取物或动物提取物)。

在另一优选例中,所述的竹叶提取物是竹叶的水提取物或醇提取物。更佳地其黄酮含量为4-50%(硝酸铝-亚硝酸钠比色法,以芦丁为标准品),总酚含量为10-80%(福林试剂还原比色法测定,以对羟基苯甲酸为标准品)。

25 在本发明的第二方面,提供了一种热加工食品的方法,包括步骤:

(a)将待加工的食品与丙烯酰胺抑制剂混合,形成混有抑制剂的食品,其中所述抑制剂含有竹叶提取物;

(b)在120℃或以上温度热加工所述的混有抑制剂的食品,形成热加工食品。

30 在另一优选例中,所述抑制剂中还含有银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

在另一优选例中,所述的待加工食品包括以油炸、焙烤、烧烤、烘烤、微波加热、膨化、燃烧方式得到的炸薯条、炸薯片、薄脆饼、饼干、蛋糕、面包、谷物早餐、油条、大饼、方便面、汉堡包、炸鸡块、咖啡、可可、烟草、香烟。

35 在另一优选例中,步骤(a)中每千克待加工食品与0.001-5克丙烯酰胺抑制剂混合。

在另一优选例中,步骤(a)中每千克待加工食品与0.01-2克丙烯酰胺抑制剂混合。

在另一优选例中,步骤(a)中每千克待加工食品与0.1-1克丙烯酰胺抑制剂混合。

在另一优选例中,在步骤(a)中,混合步骤采用包裹、浸泡或喷洒的方式进行。

40 在另一优选例中,包裹料中添加所述的丙烯酰胺抑制剂制成混合包裹料,再用所述混合包裹料均匀包裹待加工食品原料。

在另一优选例中, 每千克包裹料中添加 0.001-5 克所述丙烯酰胺抑制剂。

在另一优选例中, 每千克包裹料中添加 0.1-1 克所述丙烯酰胺抑制剂。

在另一优选例中, 在水溶液或低醇溶液中添加所述的丙烯酰胺抑制剂制成浸泡液, 再用所述浸泡液浸泡待加工食品。

5 在另一优选例中, 在每升水溶液或低醇溶液中添加 0.001-5 克所述丙烯酰胺抑制剂制成浸泡液。

在另一优选例中, 每升水溶液或低醇溶液中添加 0.1-1 克所述丙烯酰胺抑制剂制成浸泡液。

10 在另一优选例中, 在水溶液或低醇溶液中添加所述的丙烯酰胺抑制剂制成喷洒液, 再用所述喷洒液均匀喷洒待加工食品的表面。

在另一优选例中, 在每升水溶液或低醇溶液中添加 0.001-5 克所述丙烯酰胺抑制剂制成喷洒液。

在另一优选例中, 每升水溶液或低醇溶液中添加 0.1-1 克所述丙烯酰胺抑制剂制成喷洒液。

15 在本发明的第三方面, 提供了一种用于热加工食品中的丙烯酰胺抑制剂组合物, 它含有 1-99wt%竹叶提取物以及 1-99wt%银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

本发明提供的丙烯酰胺抑制剂能有效抑制食品热加工中所产生的丙烯酰胺。

20

附图说明

图 1 为丙烯酰胺标准品的 GC 图谱;

图 2 为空白对照组由天门冬酰胺途径产生丙烯酰胺的 GC 图谱;

图 3 为试验组 1(竹叶提取物(AOB)含量为 10mg/kg)丙烯酰胺的 GC 图谱;

25 图 4 为试验组 2(竹叶提取物(AOB)含量为 150mg/kg)丙烯酰胺的 GC 图谱;

图 5 为 A 组土豆片经油炸后产生丙烯酰胺的 GC 图谱;

图 6 为 B 组土豆片(用含有 1g/L 竹叶提取物的水溶液浸泡后的土豆片)经油炸后丙烯酰胺的 GC 图谱;

30 图 7 为 C 组土豆片(用含有 1g/L 茶叶提取物的水溶液浸泡后的土豆片)经油炸后丙烯酰胺的 GC 图谱;

图 8 为丙烯酰胺以及 ^{13}C 标记的丙烯酰胺标准品的 LC-MS/MS 图谱;

图 9 为 A 组鸡翅(炸鸡料中无任何添加成分)外表面裹上面粉后经油炸产生丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

35 图 10 为 B 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 竹叶提取物)外表面裹上面粉后经油炸后丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

图 11 为 C 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 茶叶提取物)外表面裹上面粉后经油炸后丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

图 12 为 D 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 芦丁)外表面裹上面粉后经油炸后丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱。

40

具体实施方式

发明人经过广泛而深入的研究,发现包含有竹叶提取物的组合物可以有效地抑制食品热加工过程中所产生的有毒物质丙烯酰胺。此外,在上述的丙烯酰胺抑制剂组合物中还可以包括其他提取物(如银杏提取物、茶叶提取物等)。在食品热加工过程中,可以本发明的
5 丙烯酰胺抑制剂组合物包裹、浸泡或喷洒于待加工的食品。

如本文所用,竹叶提取物、含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂以及含竹叶提取物的复配物,都可在制备热加工食品时用作丙烯酰胺抑制剂。其中含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂和含竹叶提取物的复配物可互换使用,所述的组合物中含有竹叶提取物以及银杏提取物、
10 茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

本发明所指的竹叶提取物是从禾本科(*Graminae*)、竹亚科(*Bambusoideae*)、刚竹属(*Phyllostachys Sieb. Et Zucc*)品种的叶子中得到的天然竹叶提取物,其生产工艺在申请者以前的两项发明专利(专利号分别为 ZL 98104563.4 和 ZL 98104564.2)中已经涉及。
15 需要声明的是,本专利所指的竹叶提取物既可以是采用上述专利工艺得到的产品,也可以是在此基础上进一步运用吸附-解吸和膜分离等高新技术及其组合方法精制得到的竹叶提取物[包括竹叶抗氧化物(AOB)]制品。

竹叶提取物的外观为黄色或棕黄色粉末(也可以浸膏的形式存在),其主要成分包括以荭草苷(Orientin)、异荭草苷(Homoorientin)、牡荆苷(Vitexin)和异牡荆苷(Isovitexin)
20 为代表的黄酮类化合物和以绿原酸(Chlorogenic acid)、阿魏酸(Ferulic acid)和咖啡酸(Caffeic acid)为代表的酚酸类化合物。其总黄酮含量一般在 4-50%(硝酸铝-亚硝酸钠比色法,以芦丁为标准品),其中总酚含量一般在 10-80%(福林试剂还原比色法测定,以对羟基苯甲酸为标准品)。

在由天门冬酰胺途径产生丙烯酰胺的模拟反应体系中,以天门冬酰胺和葡萄糖按等摩尔浓度比例进行反应,反应体系可以是水溶液或混合物润湿体,在 $\geq 120^{\circ}\text{C}$ 的温度条件下
25 加热 10-40min,从而产生丙烯酰胺,并测定丙烯酰胺的生成量。同时,以此反应体系为空白对照,并在此基础上添加本发明声明的添加范围内的含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂,按同样条件加热并测定丙烯酰胺的生成量,与空白对照作比较,计算含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂对丙烯酰胺形成的抑制率。丙烯酰胺的测定采用 GC 或 LC-MS/MS 进行。

在食品原料经过热加工而产生丙烯酰胺的实际反应体系中,一是将含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂按比例直接添加至食品原料或包裹料中,使其在热加工过程中作用于天门冬酰胺途径,阻断产生丙烯酰胺的反应链,从而降低或抑制热加工过程中丙烯酰胺的产生;
30 二是将含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂按比例配成水溶液或加入少量乙醇或料酒制成低醇溶液,用来浸泡食品原料或均匀喷洒在食品原料的表面,同时,以不添加含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂的
35 实际热加工体系为空白对照,将试验组添加本发明声明的添加范围内的含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂后,按同样条件加热并测定丙烯酰胺的生成量,与上述空白对照作比较,计算含竹叶提取物的丙烯酰胺抑制剂对丙烯酰胺生成的抑制率。丙烯酰胺的测定采用 GC 或 LC-MS/MS 进行。

(1) 气相色谱法(GC)分析的实验条件如下:

40 仪器名称: Fuli GC9790 气相色谱仪; 检测器: ECD(电子捕获);

色谱柱: HP-5(30 m×0.32mm, 25 m); 进样器: SLIP(不分流毛细管);

流动相以及流速: 氮气(1mL/min); 进样量: 1 L;

柱箱初温: 100°C; 检测口温度: 250°C; 进样口温度: 250°C;

升温程序: 100°C 1min → 10°C/min 140°C 15min → 30°C /min 240°C 7min。

- 5 与此同时, 气相色谱法测定前须对样品进行衍生化处理提高其挥发程度, 采用 KBr 和 KBrO₃通过氧化还原反应产生溴分子, 使溴分子与丙烯酰胺反应生成一溴或二溴丙酰胺, 最后加入 Na₂S₂O₃终止衍生化反应并将多余的溴还原为 Br⁻。

丙烯酰胺标准品的 GC 图谱如图 1 所示。

(2) 液相色谱-两级质谱联用(LC-MS/MS) 分析的实验条件如下:

- 10 仪器名称: Micromass 公司液相色谱-两级质谱联用仪;

LC 条件:

色谱柱: Atlantis(1.5 × 210mm, 5 m);

流动相: 甲醇(0.1%甲酸): 水(0.1%甲酸)= 2 : 98;

流速: 1mL/min; 柱温: 20°C; 进样量: 10 L。

- 15 MS 条件:

毛细管电压: 3.50kV; 锥孔电压: 50V; 源温: 100°C; 脱溶剂温度: 350°C; 锥孔气流速: 45L/h; 脱溶剂气流速: 400L/h;

MRM 参数: 丙烯酰胺标样 72>55, ¹³C₃-丙烯酰胺内标 75>58;

碰撞能量 6eV。

- 20 丙烯酰胺以及 ¹³C 标记的丙烯酰胺标准品的 LC-MS/MS 图谱如图 8 所示。

本发明的主要优点在于:

- 1、采用外源性植物化学素(黄酮和酚酸等)在所述浓度范围内处理食品物料, 在有效抑制热加工过程中丙烯形成的同时, 对终端产品的色、香、味、型、质地等感官品质无显著的不良影响, 易于为消费者接受。

2、在食品中添加植物黄酮和酚酸等天然抗氧化物作为丙烯酰胺抑制剂, 在保障食品安全性的同时, 还可起到营养强化和延长食品保质期的双重作用, 一举数得。

3、原料来源广泛, 成本低。

- 30 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则所有的百分比和份数按重量计。

实施例 1

竹叶提取物对模拟反应体系产生丙烯酰胺的抑制作用

- 35 取 0.1mol/L 的 L-天门冬酰胺和 D-葡萄糖各 10mL 混合→置于 100mL 锥形瓶中→设空白对照组; 还在上述空白对照组的基础上加入竹叶提取物, 制成最终体系中竹叶提取物浓度分别为 10mg/kg 的试验组 1 和 150mg/kg 的试验组 2→将空白对照组、试验组 1、试验组 2 分别在 120°C 水浴中加热 15min→直接取得到的反应溶液后进行衍生化→GC 分析。

其中衍生化反应具体过程如下:

- 40 各取 20 L 的空白对照组、试验组 1、试验组 2→入 20mL 比色管中→加入 0.6mL

10% (v/v) H_2SO_4 → 加水定容至 10mL → 4°C 冰箱放置 20min 后预冷 → 加入 1.5 g KBr 粉末充分溶解 → 加入 1 mL 0.1 mol/L KBrO_3 → 充分混匀 → 冰箱中静置衍生 30min → 取出后加入 0.1mL 1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ → 充分混匀 → 取出后加入 5mL 重蒸后或者 HPLC 纯的乙酸乙酯充分萃取 → 取乙酸乙酯相并用无水 Na_2SO_4 脱水 → 待用。

- 5 其中竹叶提取物为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的竹叶抗氧化物(产品代码为 AOB), 外观为棕黄色粉末, 总黄酮含量 32.5%, 总酚含量 56.7%。其中四种竹叶碳苷黄酮——异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷和牡荆苷的含量比例为: 2.75 : 1.05 : 1.15 : 1 [Yu Zhang *et al.*, Determination of flavone C- glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1065: 177-185]。

- 15 图 2 为空白对照组由天门冬酰胺途径产生丙烯酰胺的 GC 图谱; 图 3 为试验组 1 (AOB 浓度为 10mg/kg) 产生丙烯酰胺的 GC 图谱; 图 4 为试验组 2 (AOB 浓度为 150mg/kg) 产生丙烯酰胺的 GC 图谱。根据峰面积计算并折合后得丙烯酰胺的生成量分别为 6460.31 g/kg、410.10 g/kg 和 190.66 g/kg, AOB 对模拟反应体系产生的丙烯酰胺的抑制率分别为 93.6% 和 97.0% (如表 1 所示)。

表 1 竹叶提取物 (AOB) 对模拟反应体系产生的丙烯酰胺的抑制率 ($n=6$)

组 别	AOB 添加量 (mg/kg)	丙烯酰胺生成量 (g/kg)	抑制率 (%)
空白对照	0	6460.31 ± 570.24	—
试验组 1	10	410.10 ± 10.45	93.6 ± 0.4
试验组 2	150	190.66 ± 11.74	97.0 ± 0.3

由表 1 可见, AOB 对模拟反应体系产生的丙烯酰胺具有极显著的抑制作用。

实施例 2

20 不同剂量的竹叶提取物对模拟反应体系产生丙烯酰胺的抑制作用

竹叶提取物 (AOB) 来源同实施例 1。为了探明其抑制丙烯酰胺的最适作用剂量范围, 在模拟体系中分别设置了 4 个不同浓度的添加剂量。模拟体系反应过程、取样以及衍生化过程同实施例 1, 采用 GC 法测定丙烯酰胺含量。

表 2 不同剂量的竹叶提取物 (AOB) 对模拟反应体系产生的丙烯酰胺的抑制率 ($n=6$)

组别	AOB 添加量 (g/kg)	丙烯酰胺生成量 (g/kg)	抑制率 (%)
空白对照	0	5977.19 ± 425.43	0
试验组	0.001	4870.30 ± 221.28	18.5 ± 3.1
	0.003	3884.90 ± 185.40	35.0 ± 2.9
	0.007	1735.46 ± 76.55	71.0 ± 4.8
	0.009	544.95 ± 33.70	90.9 ± 4.0

- 25 由表 2 可见, 在模拟反应体系中当 AOB 添加量在 1-9mg/kg 的范围内对模拟反应体系产生的丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用, 其抑制率具有显著的线性相关性。

实施例 3

竹叶提取物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制作用

(1) 土豆片

新鲜土豆经清洗后去皮并切成厚度大约为 1mm 的薄片,切好的土豆片经挑选后用流水漂洗两次,并用吸水纸吸干。

(2) 植物提取物

竹叶提取物:为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品(产品代码为 EOB-C01),
5 总黄酮含量为 40.7%,总酚含量为 79.8%;

茶叶提取物:为浙江大学茶学系提供的水溶性茶多酚制剂,含量为 98%。

(3) 实验分组

本实验共设三个组,分别为空白对照组 A(土豆片不用任何溶液处理)、竹叶提取物剂
10 量组 B(土豆片用竹叶提取物水溶液浸泡处理)和茶叶提取物剂量组 C(土豆片用茶叶提取物水溶液浸泡处理)。

将竹叶提取物配制成质量含量为 1g/L 的水溶液,即在每升水中添加 1 克的竹叶提取物,然后将土豆片浸没在竹叶提取物水溶液中,浸渍时间为 1min。该组设为竹叶提取物剂
量组 B。

将茶叶提取物配制成质量含量为 1g/L 的水溶液,即在每升水中添加 1 克的水溶性茶
15 多酚制剂,然后将土豆片浸没在茶叶提取物水溶液中,浸渍时间为 1min。该组设为茶叶提取物剂量组 C。

将 A、B、C 三个组中的土豆片分别放入功率为 750W 的家用微波炉中,在中火档加热干燥,干燥时间为 A 组 3.5 min, B、C 组各为 5.5min。

(4) 油炸

20 设定各组土豆片的量均为 50-60g,将干燥后的 A、B、C 三组土豆片分别在油锅中炸制,所用油为市售花生油,油温控制在 140-160° C 之间,油炸时间在 3min 左右,炸至土豆片表面呈金黄色或棕黄色,捞出,沥油,检测;每炸完一组后启用新油。

(5) 取样及样品预处理

25 取适量油炸土豆片样品并用研钵碾碎→称取 1.5g 样品→加入浓度为 1 g/mL 的内标 500 L→静置 10min→两次加入 20mL 重蒸石油醚脱脂并充分振荡 10min→两次加入 8mL 2mol/L NaCl 超声振荡提取 20min→15000rpm 离心 15min→三次加入 15mL 重蒸乙酸乙酯充分萃取→合并萃取液旋转蒸发→N₂吹干→1.5mL 蒸馏水重溶→6cc HLB 柱固相萃取纯化→进样分析。

(6) 结果检测

30 土豆片经上述预处理后用 GC 测定丙烯酰胺的含量。

图 5 为 A 组土豆片经油炸后产生丙烯酰胺的 GC 图谱;图 6 为 B 组土豆片(用含有 1g/L 竹叶提取物的水溶液浸泡后的土豆片)经油炸产生丙烯酰胺的 GC 图谱;图 7 为 C 组土豆片(用含有 1g/L 茶叶提取物的水溶液浸泡后的土豆片)经油炸产生丙烯酰胺的 GC 图谱。根据
35 峰面积计算得竹叶提取物和茶叶提取物对油炸土豆片产生的丙烯酰胺的抑制率分别为 95.7%和 73.4%(如表 3 所示)。

表 3 竹叶提取物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制率($n=6$)

组 别	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照(A 组)	556.12 ± 84.35	
竹叶提取物剂量(B 组)	24.11 ± 2.46	95.7 ± 0.3

茶叶提取物剂量(C组)	147.85 ± 14.33	73.4 ± 2.8
-------------	----------------	------------

由表 3 可见, 竹叶提取物和茶多酚对油炸土豆片产生的丙烯酰胺均具有显著的抑制作用, 且竹叶提取物的抑制效果好于茶多酚。

实施例 4

竹叶提取物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制作用

- 5 与实施例 3 不同的是增加了一黄酮醇糖苷化合物(芦丁)的试验组, 并将竹叶提取物(AOB)浸泡液的浓度增大到 5g/L, 即在每升水中添加 5 克的 AOB。竹叶提取物的来源同实施例 1, 茶叶提取物的来源同实施例 3。芦丁为购自 Sigma 公司的标准品, 其纯度≥95%。所用油同实施例 3, 油温控制在 140-160° C 之间。样品预处理的方法同实施例 3, 采用 LC-MS/MS 测定丙烯酰胺含量, 根据内标法计算得竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对油炸土
10 豆片产生丙烯酰胺的抑制率分别为 40.0%、37.7%和 39.7%(如表 4 所示)。

表 4 竹叶提取物(AOB)对油炸土豆片产生的丙烯酰胺的抑制率($n=6$)

组 别	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照(A组)	416.96 ± 44.38	
竹叶提取物剂量(B组)	250.21 ± 22.58	40.0 ± 1.3
茶叶提取物剂量(C组)	259.89 ± 56.92	37.7 ± 2.5
芦丁剂量(D组)	251.48 ± 43.82	39.7 ± 0.8

- 由表 4 可见, 竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对油炸土豆片产生的丙烯酰胺均具有一定的抑制作用, 但与实施例 3 相比, 抑制效果均显著下降, 这表明, 抑制效果与添加剂量之间并非呈简单的线性关系。说明黄酮类化合物对油炸土豆片中丙烯酰胺的抑制效果并非
15 随着添加量的增加而增加, 而是存在一个最适添加量区间, 并且随食品体系和加工条件的变化而变化。

实施例 5

不同剂量的竹叶提取物对油炸土豆片产生丙烯酰胺形成的抑制作用

- 20 竹叶提取物(AOB)来源同实施例 1。为了探明不同剂量的 AOB 对油炸土豆片中丙烯酰胺形成的抑制作用, 分别设置了 6 个不同浓度的浸泡液, 油炸后的土豆片样品经预处理后, 用 LC-MS/MS 测定丙烯酰胺的含量, 样品预处理方法同实施例 3。

表 5 不同剂量的竹叶提取物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制作用($n=6$)

组别	竹叶提取物浸泡液浓度(g/L)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照组	0	587.10 ± 31.01	
试验组 1	0.002	502.46 ± 20.00	14.4 ± 2.3
试验组 2	0.01	235.43 ± 14.10	59.9 ± 8.6
试验组 3	0.1	118.34 ± 11.39	79.8 ± 6.6
试验组 4	1	36.12 ± 4.66	93.8 ± 2.0
试验组 5	2.5	203.16 ± 11.23	65.4 ± 7.1
试验组 6	4.9	360.98 ± 19.42	38.5 ± 3.2

- 25 由表 5 可见, 在油炸土豆片中当竹叶提取物(AOB)浸泡液浓度在 0.002-4.9g/L 的范围内时, 浸泡土豆片后对其油炸产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用, 其抑制率在浸泡液浓度为 0.002-1g/L 时随着浸泡液浓度的增加而增加, 而在浸泡液浓度为 1-4.9g/L 时却随

着浸泡液浓度的增加而减少,这说明存在一个最适添加量区间。

实施例 6

竹叶提取物对焙烤咖啡产生丙烯酰胺的抑制作用

(1) 原料来源

5 咖啡生豆为市售产品,竹叶提取物(AOB)来源同实施例 1。

(2) 实验分组

本实验共设两个组,分别为空白对照组 A(咖啡豆不用任何溶液处理)、竹叶提取物剂量组 B(咖啡豆用竹叶提取物水溶液浸泡处理)。

10 将竹叶提取物(AOB)制成质量含量为 0.1g/L 的水溶液,即每升水中添加 0.1 克的 AOB,然后将咖啡生豆浸没在 AOB 水溶液中,浸渍时间为 1min,所得的咖啡豆为竹叶提取物剂量组 B。

(3) 咖啡制作

将 A、B 两组中的咖啡豆进行焙烤,焙烤温度控制在 190-200° C 之间。将焙烤后的咖啡粉碎,并用热水充分萃取,经喷雾干燥后得到咖啡产品。

15 咖啡产品经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量,样品预处理方法同实施例 3。根据内标法计算得竹叶提取物对焙烤咖啡产生丙烯酰胺的抑制率为 85.0%(如表 6 所示)。

表 6 竹叶提取物(AOB)对焙烤咖啡产生丙烯酰胺的抑制率($n=6$)

组 别	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照(A 组)	241.45 ± 20.02	
竹叶提取物剂量(B 组)	36.10 ± 3.30	85.0 ± 3.4

20 由表 6 可见,采用 0.1g/L 的竹叶提取物(AOB)水溶液浸泡咖啡生豆,进而对咖啡焙烤过程中丙烯酰胺的产生具有非常显著的抑制作用,说明在该竹叶提取物添加剂量下对丙烯酰胺的抑制率已接近最佳水平。

实施例 7

竹叶提取物对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制作用

25 竹叶提取物为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品,总黄酮含量为 16.5%,总酚含量为 33.7%;茶叶提取物和芦丁的来源与实施例 4 相同;煎炸用油来源同实施例 3;炸鸡料为市售产品。

(1) 分组

30 本实验共设四个组,分别为空白对照组 A(炸鸡翅所用包裹料不添加任何试样)、竹叶提取物剂量组 B、茶叶提取物剂量组 C 和芦丁剂量组 D。添加方法和剂量均为在每千克包裹料中分别均匀混入 4.9 克试样。然后制作面糊:加水调成稀薄糊状,并打入鸡蛋一个,拌匀。

(2) 油炸

用各组对应调好的炸鸡料裹匀鸡翅,然后将鸡翅挂上面糊,立即上油锅炸制,油温控制在 140-160° C 之间,炸至金黄色出锅,每次炸完一组后启用新油。

35 (3) 检测

样品预处理方法同实施例 3,经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

(4) 结果

图 9 为 A 组鸡翅(炸鸡料中无任何添加成分)外表面裹上面粉后经油炸产生丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

5 图 10 为 B 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 竹叶提取物)外表面裹上面粉后经油炸产生丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

图 11 为 C 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 茶叶提取物)外表面裹上面粉后经油炸产生丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱;

图 12 为 D 组鸡翅(炸鸡料中含有 4.9g/kg 芦丁)外表面裹上面粉后经油炸产生丙烯酰胺的 LC-MS/MS 图谱。

10 根据内标法计算得竹叶提取物、水溶性茶多酚和芦丁对炸鸡翅产生的丙烯酰胺的抑制率分别为 38.3%、32.5%和 22.5%(如表 7 所示)。

表 7 竹叶提取物对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制率 ($n=6$)

组 别	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照(A 组)	177.51 $\pm$ 13.06	
竹叶提取物剂量组(B 组)	109.50 $\pm$ 8.98	38.3 $\pm$ 0.3
茶多酚剂量组(C 组)	119.84 $\pm$ 11.39	32.5 $\pm$ 3.9
芦丁剂量组(D 组)	137.56 $\pm$ 9.09	22.5 $\pm$ 1.0

由表 7 可见,竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对炸鸡翅产生的丙烯酰胺均具有一定的抑制作用。

15 实施例 8

不同剂量的竹叶提取物对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制作用

竹叶提取物来源同实施例 1。为了探明不同剂量的竹叶提取物与包裹料混合后对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制作用,在实际油炸体系中分别设置了 6 个不同添加量的竹叶提取物,样品预处理方法同实施例 3,经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

20 表 8 不同剂量的竹叶提取物(AOB)对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制作用 ($n=6$)

组别	添加的竹叶提取物(g/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照组	0	194.50 $\pm$ 9.45	
试验组 1	0.002	168.77 $\pm$ 6.12	13.2 $\pm$ 2.2
试验组 2	0.01	116.99 $\pm$ 1.20	39.8 $\pm$ 4.6
试验组 3	0.1	57.70 $\pm$ 5.04	70.3 $\pm$ 3.5
试验组 4	1	30.74 $\pm$ 3.08	84.2 $\pm$ 1.1
试验组 5	2.5	77.13 $\pm$ 3.33	60.3 $\pm$ 3.7
试验组 6	4.9	139.12 $\pm$ 10.30	28.5 $\pm$ 4.2

由表 8 可见,在炸鸡翅中当竹叶提取物(AOB)添加量在 0.002-4.9g/kg 的范围内时,与包裹料混合后对炸鸡翅产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用,其抑制率在 AOB 添加量为 0.002-1g/kg 时随着添加量的增加而增加,而在添加量为 1-4.9g/L 时却随着添加量的增加而减少,这说明存在一个最适添加量区间。

25 实施例 9

竹叶提取物对油条产生丙烯酰胺的抑制作用

(1) 原料来源

竹叶提取物的来源和含量与实施例 1 相同, 茶叶提取物和芦丁的来源和含量与实施例 4 相同。

(2) 试验分组

本实验共设四个组, 分别为:

空白对照组 A(面粉不作任何处理);

在每千克面粉中加入 2.5g 竹叶提取物, 制成 B 组;

在每千克面粉中加入 2.5g 茶叶提取物, 制成 C 组;

在每千克面粉中加入 2.5g 芦丁, 制成 D 组。

将上述 4 组用于制作油条的面粉, 加入适量苏打和发酵粉, 然后加水和成面团。静置 12 h 后再和面一次, 然后静置直至油炸。

(3) 油炸

将各组发酵好的面团搓成条状, 切成小团, 然后拉成长条状以后入油锅炸制, 待金黄色且膨松后将油条捞出油锅并沥干油分即成。样品预处理方法同实施例 3, 经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

根据内标法计算得竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对油条产生丙烯酰胺的抑制率分别为 67.5%、64.9%和 53.7%(如表 9 所示)。

表 9 竹叶提取物(AOB)对油条产生丙烯酰胺的抑制率(n=6)

组 别	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照	182.74 ± 15.06	
竹叶提取物剂量组(B 组)	59.33 ± 6.29	67.5 ± 2.1
茶叶提取物剂量组(C 组)	64.07 ± 4.32	64.9 ± 3.6
芦丁剂量组(D 组)	84.56 ± 7.20	53.7 ± 3.9

由表 9 可见, 竹叶提取物、茶多酚和芦丁对油条产生的丙烯酰胺均具有一定的抑制作用。

实施例 10

不同剂量的竹叶提取物对油条产生丙烯酰胺的抑制作用

竹叶提取物来源同实施例 1。为了探明不同剂量的竹叶提取物对油条产生丙烯酰胺的抑制作用, 在实际油炸体系中分别设置了 6 个不同的添加量水平。样品预处理方法同实施例 3, 样品经预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

表 10 不同剂量的竹叶提取物(AOB)对油条产生丙烯酰胺的抑制作用(n=6)

组别	添加的竹叶提取物(g/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照组	0	201.23 ± 12.40	
试验组 1	0.002	184.12 ± 10.23	8.5 ± 1.0
试验组 2	0.01	123.94 ± 8.66	38.4 ± 7.0
试验组 3	0.1	67.70 ± 4.86	66.4 ± 5.5
试验组 4	1	34.41 ± 2.98	82.9 ± 6.9
试验组 5	2.5	74.52 ± 9.44	63.0 ± 5.8
试验组 6	4.9	141.00 ± 11.01	29.9 ± 5.3

由表 10 可见,在油条中当竹叶提取物(AOB)添加量在 0.002-4.9g/kg 的范围内时,与原料混合后对油条产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用,其抑制率在 AOB 添加量为 0.002-1g/kg 时随着添加量的增加而增加,而在添加量为 1-4.9g/L 时却随着添加量的增加而减少,这说明存在一个最适添加量区间。

5 实施例 11

竹叶提取物对香烟燃烧过程中产生丙烯酰胺的抑制作用

(1) 试样来源

竹叶提取物:为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品(产品代码为 EOB-S03),外观为深棕色浓缩液,总黄酮含量为 4.5%,固形物含量为 25.2%。

10 茶叶提取物:为浙江大学茶学系提供的水溶性茶多酚制剂,含量为 98%;

芦丁:为购自 Sigma 公司的标准品,其纯度为 95%。

(2) 试验分组

本实验共设 4 个组:

空白对照组 A 为普通烟丝制成的卷烟。

15 将竹叶提取物配制成 4.9g/L 的水溶液,即在每升水溶液中含有以干基计 4.9 克的竹叶提取物,然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面,制成的卷烟为试验组 B。

将茶叶提取物配制成 4.9g/L 的水溶液,即在每升水溶液中含有以干基计 4.9 克的茶叶提取物,然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面,制成的卷烟为试验组 C。

20 将芦丁配制成 4.9g/L 的水溶液,即在每升水溶液中含有以干基计 4.9 克的芦丁,然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面,制成的卷烟为试验组 D。

(3) 卷烟燃烧

采用吸烟机在标准条件下进行卷烟的燃烧试验,并分别收集焦油相和气相,测定焦油相中丙烯酰胺的含量。焦油相样品的预处理方法同实施例 3,样品经预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

25 根据峰面积计算竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对烟草产生丙烯酰胺的相对抑制率分别为 67.8%、55.0%和 65.3%(如表 11 所示)。

表 11 竹叶提取物对烟草燃烧过程中产生的丙烯酰胺的抑制率 (n=6)

组 别	丙烯酰胺峰面积	相对抑制率 (%)
空白对照	12343 ± 146	
竹叶提取物剂量组	3976 ± 36	67.8 ± 6.7
茶多酚剂量组	5556 ± 62	55.0 ± 9.4
芦丁剂量组	4287 ± 31	65.3 ± 4.4

由表 11 可见,竹叶提取物、茶叶提取物和芦丁对烟草燃烧过程中产生的丙烯酰胺均具有不同程度的抑制作用。

30 实施例 12

不同剂量的竹叶提取物对香烟燃烧过程中产生丙烯酰胺的抑制作用

竹叶提取物来源同实施例 11。

本实验共设 4 个组:空白对照组 A 为普通烟丝制成的卷烟。

将竹叶提取物配制成浓度为 10g/L 的低醇溶液,即在每升低醇溶液(本实施例中低醇

溶液是指体积分数为 20% 的酒精溶液) 中含有以干基计 10 克的竹叶提取物, 然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面, 制成的卷烟为试验组 D。

将竹叶提取物调整为浓度 1g/L 的低醇溶液, 即在每升溶液含以干基计 1 克的竹叶提取物, 然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面, 制成的卷烟为试验组 C。

- 5 将竹叶提取物调整为浓度 0.1g/L 的低醇溶液, 即在每升溶液中含以干基计为 0.1 克的竹叶提取物, 然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面, 制成的卷烟为试验组 B。

(3) 卷烟燃烧

- 10 采用吸烟机在标准条件下进行卷烟的燃烧试验, 并分别收集焦油相和气相, 测定焦油相中丙烯酰胺的含量。焦油相样品的预处理方法同实施例 3, 样品经预处理后用 LC-MS/MS 法测定其丙烯酰胺的含量。根据峰面积计算竹叶提取物对烟草产生丙烯酰胺的相对抑制率(如表 3 所示)。

表 12 不同剂量的竹叶提取物对香烟燃烧过程中产生丙烯酰胺的抑制作用 ($n=6$)

组别	竹叶提取物喷洒液浓度(g/L)	丙烯酰胺峰面积	相对抑制率(%)
A	0	11645 ± 107	
B	0.1	10204 ± 87	12.4 ± 2.3
C	1	6483 ± 32	44.3 ± 3.8
D	10	3367 ± 21	71.1 ± 4.1

- 15 由表 12 可见, 当竹叶提取物(EOB-S03)的低醇溶液浓度在 0.1-10g/L 的范围内时, 以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面, 采用吸烟机在标准条件下进行卷烟的燃烧试验, 对其燃烧过程焦油相中产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用, 其抑制率在竹叶提取物的低醇溶液浓度为 0.1-10g/L(即烟丝中竹叶提取物添加量为 0.001-0.1g/kg)时随着喷洒液浓度的增加而增加。

实施例 13

- 20 含竹叶提取物的复配物对模拟反应体系产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物、迷迭香提取物和甘草提取物按 3:1:1 的质量比混合得到复配物, 此时竹叶提取物占复配物总重的 60%。

- 25 取 0.1mol/L 的 L-天门冬酰胺和 D-葡萄糖各 10mL 混合→置于 100mL 锥形瓶中→设空白对照组; 还在上述空白对照组的基础上加入复配物, 制成最终体系中复配物浓度分别为 10mg/kg 的试验组 1 和 150mg/kg 的试验组 2→将空白对照组、试验组 1、试验组 2 分别在 120°C 水浴中加热 15min→直接取得到的反应溶液后进行衍生化→GC 分析。

其中衍生化反应具体过程如下:

- 30 各取 20 L 的空白对照组、试验组 1、试验组 2→入 20mL 比色管中→加入 0.6mL 10%(v/v) H_2SO_4 →加水定容至 10mL→4°C 冰箱放置 20min 预冷→加入 1.5g KBr 粉末充分溶解→加入 1mL 0.1mol/L $KBrO_3$ →充分混匀→冰箱中静置衍生 30min→取出后加入 0.1mL 1mol/L $Na_2S_2O_3$ →充分混匀→取出后加入 5mL 重蒸后或者 HPLC 纯的乙酸乙酯充分萃取→取乙酸乙酯相并用无水 Na_2SO_4 脱水→待用。

其中竹叶提取物为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的竹叶抗氧化物(产品代码为 AOB), 外观为棕黄色粉末, 总黄酮含量为 32.5%, 总酚含量为 56.7%。其中四种竹叶碳苷

黄酮——异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷和牡荆苷的含量比例为 2.75 : 1.05 : 1.15 : 1 [Yu Zhang *et al.*, Determination of flavone *C*- glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1065: 177-185]。迷迭香提取物和甘草提取物均为市售产品。

根据峰面积计算并折合后得空白对照组、试验组 1 和试验组 2 的丙烯酰胺生成量分别为 5421.12 g/kg、421.44 g/kg 和 148.40 g/kg, 含竹叶提取物的复配物对模拟反应体系产生的丙烯酰胺的抑制率分别为 92.2%和 97.3%(如表 13 所示)。

表 13 含竹叶提取物的复配物对模拟反应体系产生丙烯酰胺的抑制率($r=6$)

组 别	复配物添加剂量(mg/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
空白对照	0	5421.12 $\pm$ 244.30	
试验组 1	10	421.44 $\pm$ 11.00	92.2 $\pm$ 1.5
试验组 2	150	148.40 $\pm$ 9.78	97.3 $\pm$ 0.7

由表 13 可见, 含竹叶提取物的复配物对模拟反应体系产生的丙烯酰胺具有极显著的抑制作用。

实施例 14

含竹叶提取物的复配物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物和茶叶提取物按 19:1 的质量比混合得到复配物, 此时竹叶提取物占复配物总重的 95%。

(1) 土豆片

新鲜土豆经清洗后去皮并切成厚度大约为 1mm 的薄片, 切好的土豆片经挑选后用流水漂洗两次, 并用吸水纸吸干。

(2) 植物提取物

竹叶提取物: 为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品(产品代码为 EOB-C01), 总黄酮含量为 40.7%, 总酚含量为 79.8%;

茶叶提取物: 为浙江大学茶学系提供的水溶性茶多酚制剂, 含量为 98%。

(3) 实验分组

本实验共设 8 个组:

空白对照组 A(土豆片不用任何溶液处理)。

将复配物制成质量浓度为 0.001g/L 的水溶液, 即在每升水中溶入 0.001 克复配物, 然后将土豆片浸没在竹叶提取物水溶液中, 浸渍时间为 1min, 所得的土豆片为试验组 B。

同理, 依照试验组 B 的浸渍方法, 当将复配物制成质量浓度为 0.01g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 C; 当将复配物制成质量浓度为 0.1g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 D; 当将复配物制成质量浓度为 0.5g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 E; 当将复配物制成质量浓度为 1g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 F; 当将复配物制成质量浓度为 2.5g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 G; 当将复配物制成质量浓度为 4.9g/L 的水溶液时, 所得的土豆片为试验组 H。

将上述所有组中的土豆片分别放入功率为 750W 的家用微波炉中, 在中火档加热干燥, 干燥时间: A 组 3.5 min, 其余组均为 5.5 min。

(4) 油炸

设定各组土豆片的量均为 50-60g, 将干燥后的上述所有组的土豆片分别在油锅中炸制, 所用油为市售花生油, 油温控制在 140-160°C 之间, 油炸时间在 3min 左右, 炸至土豆片表面呈金黄色或黄棕色, 捞出, 沥油, 检测; 每炸完一组后启用新油。

(5) 取样及样品预处理

取适量油炸土豆片样品并用研钵碾碎→称取 1.5g 样品→加入浓度为 1 g/mL 的内标 500 L→静置 10min→两次加入 20mL 重蒸石油醚脱脂、并充分振荡 10min→两次加入 8mL 2M NaCl 超声振荡提取 20min→15000rpm 离心 15min→三次加入 15mL 重蒸乙酸乙酯充分萃取→合并萃取液旋转蒸发→N₂ 吹干→1.5mL 蒸馏水重溶→6cc HLB 柱固相萃取纯化→进样分析。

(6) 结果检测

土豆片经上述预处理后, 用 LC-MS/MS 测定丙烯酰胺的含量。

根据峰面积计算得含竹叶提取物的复配物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制率(如表 14 所示)。

表 14 含竹叶提取物的复配物对油炸土豆片产生丙烯酰胺的抑制率($n=6$)

组 别	水溶液中复配物的质量浓度(g/L)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
A	0	558.14 ± 76.50	
B	0.001	456.33 ± 35.21	18.2 ± 3.5
C	0.01	380.12 ± 12.11	31.9 ± 4.1
D	0.1	316.41 ± 4.50	43.3 ± 1.8
E	0.5	222.40 ± 3.12	60.2 ± 0.8
F	1	162.99 ± 3.01	70.8 ± 1.2
G	2.5	381.70 ± 11.90	31.6 ± 2.0
H	4.9	441.23 ± 23.45	20.9 ± 0.4

由表 14 可见, 当含竹叶提取物(EOB-C01)复配物的浸泡液浓度在 0.001-4.9g/L 的范围内时, 浸泡所得到的土豆片对其油炸产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用, 其抑制率在复配物浸泡液浓度为 0.001-1g/L 时随着浸泡液浓度的增加而增加, 而在复配物浸泡液浓度为 1-4.9g/L 时却随着浸泡液浓度的增加而减少, 这说明存在一个最适添加量区间。

因此, 含竹叶提取物的复配物对油炸土豆片产生的丙烯酰胺在经不同浓度浸泡液浸泡后具有不同程度的抑制作用。

实施例 15

含竹叶提取物的复配物对香烟燃烧过程中产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物、银杏提取物、山楂提取物按 1:1:1 的质量比混合得到复配物, 此时竹叶提取物占复配物总重的 34%。

(1) 试样来源

竹叶提取物: 为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品(产品代码为 EOB-S03), 外观为深棕色浓缩液, 总黄酮含量为 4.5%, 固形物含量为 25.2%; 银杏提取物和山楂提取物均为市售产品。本实施例中采用低醇溶液作为浸泡液溶剂, 是指体积分数为 20%的酒精溶液。

(2) 试验分组

本实验共设 4 个组：

空白对照组 A 为普通烟丝制成的卷烟。

5 将复配物配制成浓度为 10g/L 的低醇溶液，即在每升低醇溶液中含有以干基计 10 克的复配物，然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面，制成的卷烟为试验组 D。

将复配物调整为浓度 1g/L 的低醇溶液，即在每升溶液含以干基计 1 克的复配物，然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面，制成的卷烟为试验组 C。

将复配物调整为浓度 0.1g/L 的低醇溶液，即在每升溶液中含以干基计为 0.1 克的复配物，然后将此溶液以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面，制成的卷烟为试验组 B。

10 (3) 卷烟燃烧

采用吸烟机在标准条件下进行卷烟的燃烧试验，并分别收集焦油相和气相，测定焦油相中丙烯酰胺的含量。焦油相样品的预处理方法同实施例 2，样品经预处理后用 LC-MS/MS 法测定其丙烯酰胺的含量。根据峰面积计算含竹叶提取物的复配物对烟草产生丙烯酰胺的相对抑制率(如表 15 所示)。

15 表 15 含竹叶提取物的复配物对烟草燃烧过程中产生的丙烯酰胺的抑制率($n=6$)

组 别	复配物喷洒液浓度(g/L)	丙烯酰胺峰面积	相对抑制率(%)
A	0	13426 ± 347	0
B	0.1	12056 ± 153	10.2 ± 1.2
C	1	5491 ± 84	59.1 ± 3.9
D	10	4494 ± 42	66.5 ± 3.7

20 由表 15 可见，当含竹叶提取物(EOB-S03)复配物的低醇溶液浓度在 0.1-10g/L 的范围内时，以 10mL/kg 的比例均匀喷洒至烟丝表面，采用吸烟机在标准条件下进行卷烟的燃烧试验，对其燃烧过程焦油相中产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用，其抑制率在复配物的低醇溶液浓度为 0.1-10g/L(即烟丝中复配物添加量为 0.001-0.1g/L)时随着喷洒液浓度的增加而增加。

实施例 16

含竹叶提取物的复配物对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物、苹果多酚提取物和洋葱提取物按 1.63:1:1 的质量比混合得到复配物，此时竹叶提取物占复配物总重的 45%。

25 竹叶提取物为杭州浙大力夫生物科技有限公司生产的产品，总黄酮含量为 16.5%，总酚含量为 33.7%。苹果多酚提取物和洋葱提取物均为浙江大学生物系统工程与食品科学学院天然产物实验室自制，均为 30%的乙醇提取物干粉。

(1) 实验分组

本实验共设 8 个组：

30 空白对照组 A，使用普通的炸鸡料用来均匀包裹鸡翅，其中炸鸡料为市售品。

在每千克炸鸡料中加入 0.001 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 B；同理，在每千克炸鸡料中加入 0.01 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 C；当每千克炸鸡料中加入 0.1 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 D；当每千克炸鸡料中加入 0.5 克的复配物制成混合

包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 E；当每千克炸鸡料中加入 1 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 F；当每千克炸鸡料中加入 2.5 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 G；当每千克炸鸡料中加入 4.9 克的复配物制成混合包裹料，用此混合包裹料包裹的鸡翅为试验组 H。

(2) 油炸

将面粉加水调成稀薄糊状，并打入鸡蛋一个，拌匀制成面糊。将上述各组鸡翅(已经裹有相应的炸鸡料)再分别挂上面糊，立即上油锅炸制，等到金黄色即出锅，每次炸完一组后将油弃去。样品预处理方法同实施例 2，经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

根据内标法计算得含竹叶提取物的复配物对炸鸡翅产生丙烯酰胺的抑制率(如表 16 所示)。

表 16 含竹叶提取物的复配物对炸鸡翅产生的丙烯酰胺的抑制率 (n=6)

组别	每千克炸鸡料中添加的复配物(g/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
A	0	165.24 ± 11.98	
B	0.001	140.60 ± 9.46	14.9 ± 1.8
C	0.01	101.23 ± 1.50	38.7 ± 5.9
D	0.1	79.40 ± 6.23	51.9 ± 3.5
E	0.5	47.93 ± 7.42	71.0 ± 4.1
F	1	43.44 ± 8.89	73.7 ± 2.6
G	2.5	68.10 ± 12.00	58.8 ± 3.0
H	4.9	115.80 ± 7.71	29.9 ± 2.4

由表 16 可见，在炸鸡翅过程中当含竹叶提取物的复配物添加量在 0.001-4.9g/kg 的范围内时，与原料混合后对炸鸡翅产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用，其抑制率在复配物添加量为 0.001-1g/kg 时随着添加量的增加而增加，而在添加量为 1-4.9g/kg 时却随着添加量的增加而减少，这说明存在一个最适添加量区间。因此，含竹叶提取物的复配物对炸鸡翅产生的丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用。

实施例 17

含竹叶提取物的复配物对油条产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物和葡萄籽提取物按 3:1 的质量比混合得到复配物，此时竹叶提取物占复配物总重的 75%。

竹叶提取物(AOB)的来源同实施例 1，葡萄籽提取物为市售产品。

试验分组

本实验共设 8 个组：

空白对照组 A，面粉不作任何处理。

在每千克面粉中加入 0.001 克的复配物制成试验组 B；同理，在每千克面粉中加入 0.01 克的复配物制成试验组 C；在每千克面粉中加入 0.1 克的复配物制成试验组 D；在每千克面粉中加入 0.5 克的复配物制成试验组 E；在每千克面粉中加入 1 克的复配物制成试验组 F；在每千克面粉中加入 2.5 克的复配物制成参比对照组 G；在每千克面粉中加入 4.9 克的复配物制成试验组 H。

将上述 8 组用于制作油条的面粉，分别加入适量苏打和发酵粉，然后加水成面团。静置 12 h 后再和面一次，然后静置直至油炸。

(3) 油炸

5 将各组发酵好的面团搓成条状，切成小团，然后拉成长条状以后入油锅炸制，待金黄色且膨松后将油条捞出油锅并沥干油分即成。样品预处理方法同实施例 2，经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

根据内标法计算得含竹叶提取物的复配物对油条产生丙烯酰胺的抑制率(如表 17 所示)。

表 17 含竹叶提取物的复配物对油条产生的丙烯酰胺的抑制率 (n=6)

组 别	每千克面粉中添加的复配物(g/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
A	0	222.80 ± 15.46	
B	0.001	193.84 ± 9.67	13.0 ± 1.6
C	0.01	145.31 ± 7.12	34.8 ± 4.4
D	0.1	92.37 ± 5.50	58.5 ± 3.8
E	0.5	58.12 ± 2.40	73.9 ± 4.0
F	1	44.81 ± 5.72	79.9 ± 3.3
G	2.5	96.11 ± 1.32	56.9 ± 6.1
H	4.9	155.02 ± 6.12	30.4 ± 1.7

10 由表 17 可见，在制作油条过程中当含竹叶提取物的复配物添加量在 0.001-4.9g/kg 的范围内时，与原料混合后对炸油条产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用，其抑制率在含竹叶提取物的复配物添加量为 0.001-1g/kg 时随着添加量的增加而增加，而在添加量为 1-4.9g/kg 时却随着添加量的增加而减少，这说明存在一个最适添加量区间。因此，含竹叶提取物的复配物对炸油条产生的丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用。

15 实施例 18

含竹叶提取物的复配物对油条产生丙烯酰胺的抑制作用

将竹叶提取物和银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物、牛蛭提取物按 30:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 的质量比混合得到复配物，此时竹叶提取物占复配物总重的 75%。

20 竹叶提取物(AOB)的来源同实施例 1；茶叶提取物为浙江大学茶学系提供的水溶性茶多酚制剂，含量为 98%；苹果多酚提取物和洋葱提取物均为浙江大学生物系统工程与食品科学学院天然产物实验室自制，均为 30%的乙醇提取物干粉；银杏提取物、迷迭香提取物、山楂提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物、牛蛭提取物为市售产品。

试验分组

25 本实验共设 8 个组：

空白对照组 A，面粉不作任何处理。

30 在每千克面粉中加入 0.001 克的复配物制成试验组 B；同理，在每千克面粉中加入 0.01 克的复配物制成试验组 C；在每千克面粉中加入 0.1 克的复配物制成试验组 D；在每千克面粉中加入 0.5 克的复配物制成试验组 E；在每千克面粉中加入 1 克的复配物制成试验组 F；在每千克面粉中加入 2.5 克的复配物制成试验组 G；在每千克面粉中加入 4.9 克的复配

物制成试验组 H。

将上述 8 组用于制作油条的面粉，分别加入适量苏打和发酵粉，然后加水和成面团。静置 12 h 后再和面一次，然后静置直至油炸。

(3) 油炸

- 5 将各组发酵好的面团搓成条状，切成小团，然后拉成长条状以后入油锅炸制，待金黄色且膨松后将油条捞出油锅并沥干油分即成。样品预处理方法同实施例 2，经样品预处理后用 LC-MS/MS 测定其丙烯酰胺的含量。

根据内标法计算得含竹叶提取物的复配物(质量含量为 75%)对油条产生丙烯酰胺的抑制率(如表 18 所示)。

10 表 18 含竹叶提取物的复配物对油条产生的丙烯酰胺的抑制率 ($n=6$)

组 别	每千克面粉中放入的复配物(g/kg)	丙烯酰胺生成量(g/kg)	抑制率(%)
A	0	222.80 ± 15.46	
B	0.001	184.56 ± 11.02	17.2 ± 3.1
C	0.01	156.30 ± 6.45	29.8 ± 3.4
D	0.1	122.34 ± 10.11	45.1 ± 1.9
E	0.5	103.41 ± 7.50	53.6 ± 4.3
F	1	61.18 ± 2.12	72.5 ± 2.0
G	2.5	102.44 ± 9.40	54.0 ± 4.1
H	4.9	158.66 ± 8.44	28.8 ± 0.9

- 15 由表 18 可见，在制作油条过程中当含竹叶提取物的复配物添加量在 0.001-4.9g/kg 的范围内时，与原料混合后对炸油条产生丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用，其抑制率在含竹叶提取物的复配物添加量为 0.001-1g/kg 时随着添加量的增加而增加，而在添加量为 1-4.9g/kg 时却随着添加量的增加而减少，这说明存在一个最适添加量区间。因此，含竹叶提取物的复配物对炸油条产生的丙烯酰胺具有不同程度的抑制作用。

- 20 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种竹叶提取物的用途, 其特征在于, 用于制备热加工食品中丙烯酰胺抑制剂。

5 2. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述抑制剂中含有 1-99wt%竹叶提取物。

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述抑制剂中还含有银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

10 4. 一种热加工食品的方法, 其特征在于, 包括步骤:

(a) 将待加工的食品与丙烯酰胺抑制剂混合, 形成混有抑制剂的食品, 其中所述抑制剂含有竹叶提取物;

(b) 在 120℃或以上温度热加工所述的混有抑制剂的食品, 形成热加工食品。

15 5. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述的待加工食品包括以油炸、烘烤、烧烤、烘烤、微波加热、膨化、燃烧方式得到的炸薯条、炸薯片、薄脆饼、饼干、蛋糕、面包、谷物早餐、油条、大饼、方便面、汉堡包、炸鸡块、咖啡、可可、烟草、香烟。

6. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 步骤(a)中每千克待加工食品与 0.001-5 克丙烯酰胺抑制剂混合。

20 7. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 步骤(a)中每千克待加工食品与 0.01-2 克丙烯酰胺抑制剂混合。

8. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 步骤(a)中每千克待加工食品与 0.1-1 克丙烯酰胺抑制剂混合。

25 9. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 在步骤(a)中, 混合步骤采用包裹、浸泡或喷洒的方式进行。

10. 一种用于热加工食品中的丙烯酰胺抑制剂组合物, 其特征在于, 它含有 1-99wt%竹叶提取物以及1-99wt%银杏提取物、茶叶提取物、迷迭香提取物、苹果多酚提取物、山楂提取物、洋葱提取物、甘草提取物、葛根提取物、葡萄籽提取物和牛蛭提取物中的至少一种。

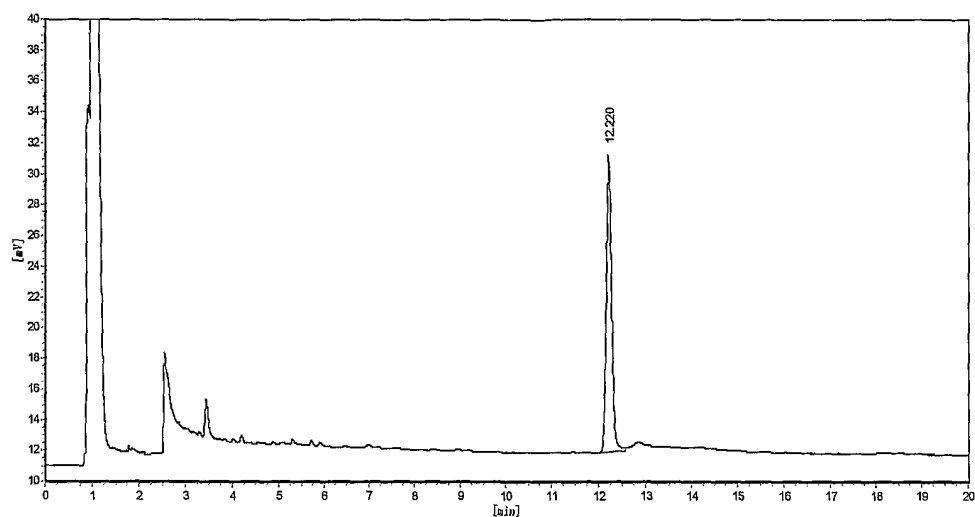


图 1

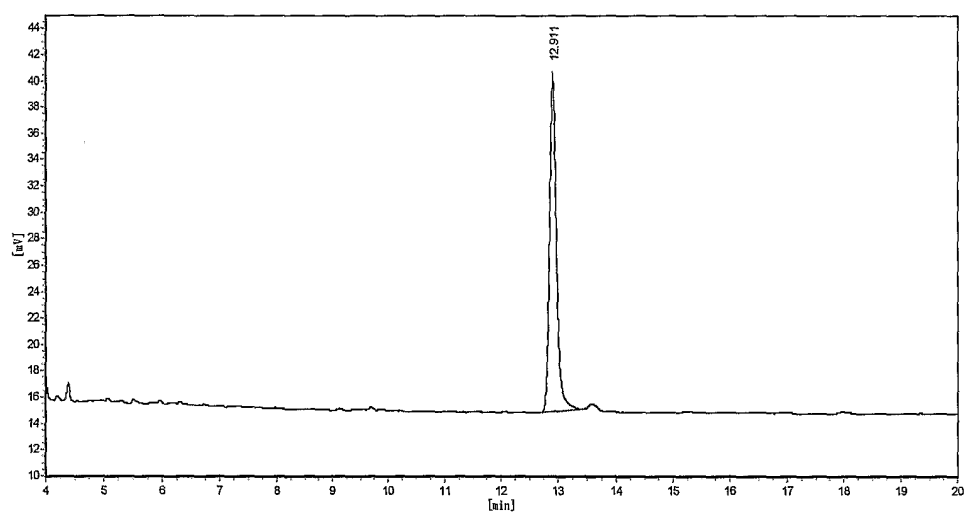


图 2

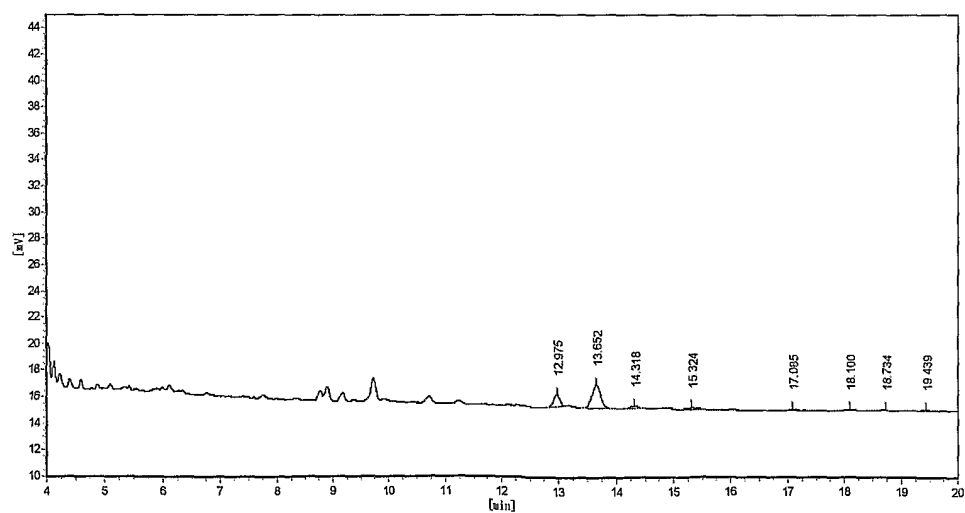


图 3

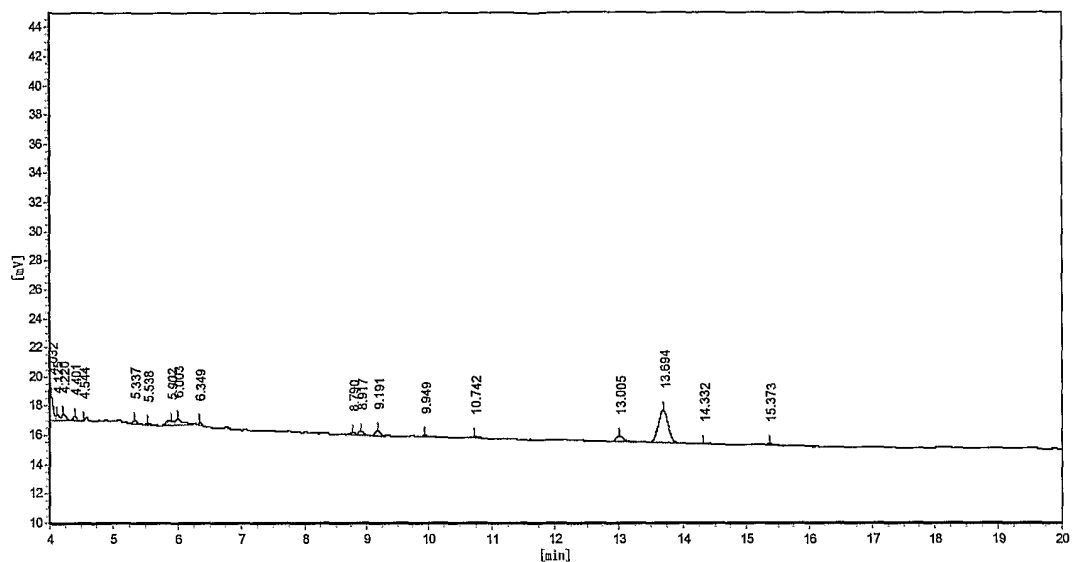


图 4

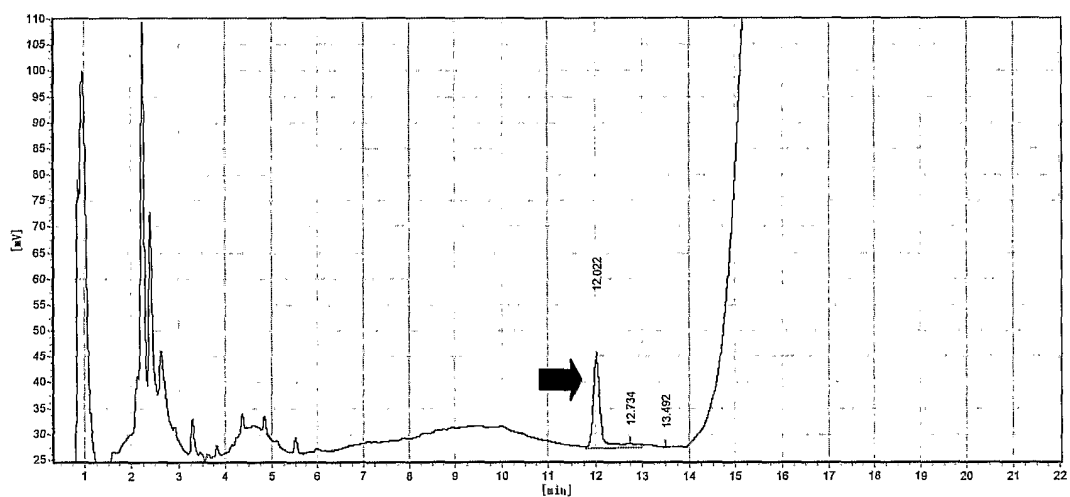


图 5

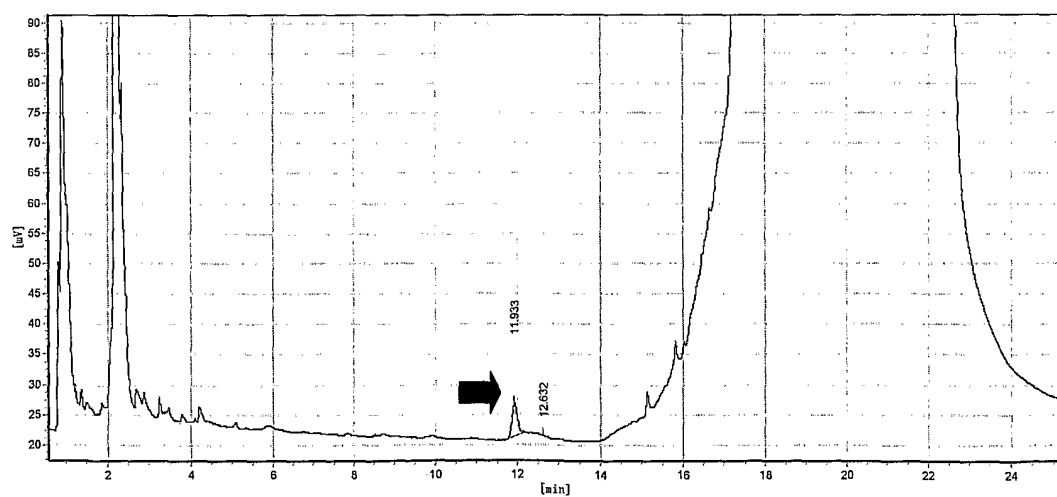


图 6

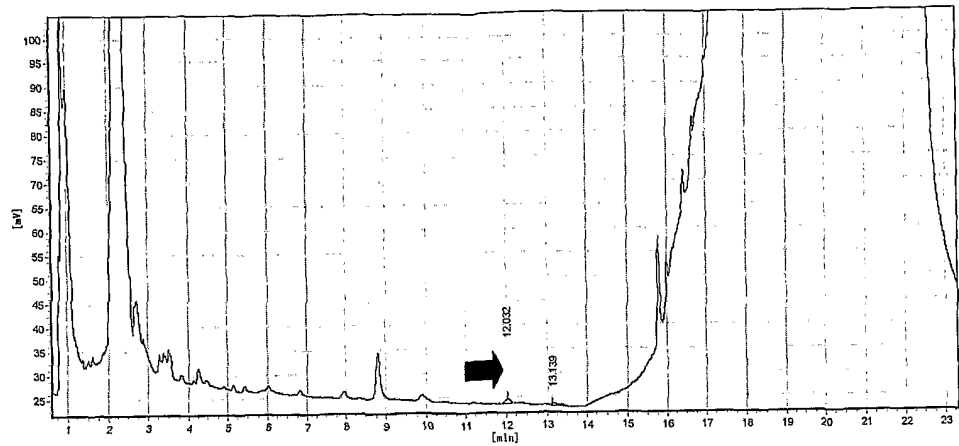


图 7

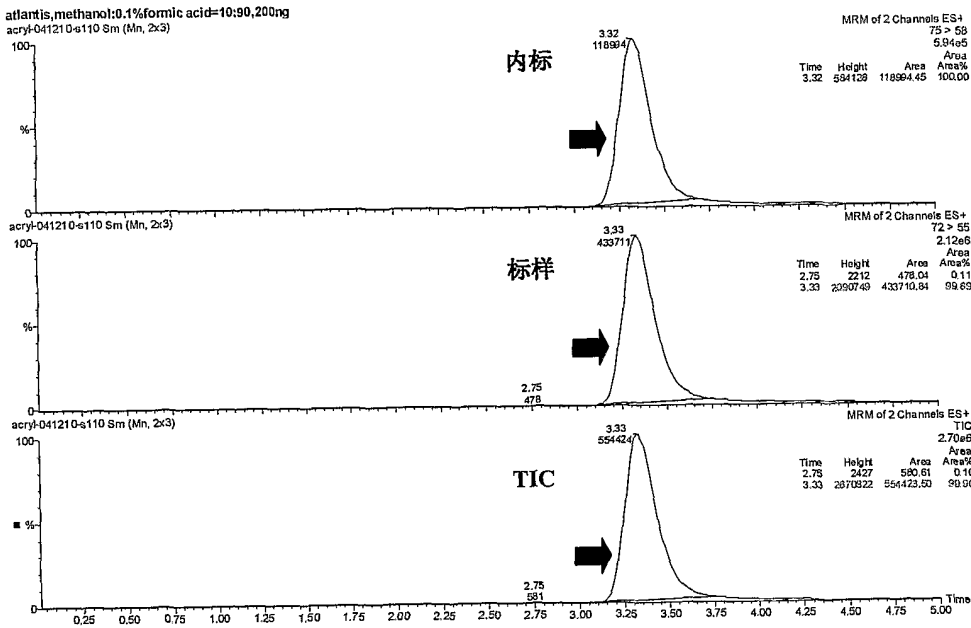


图 8

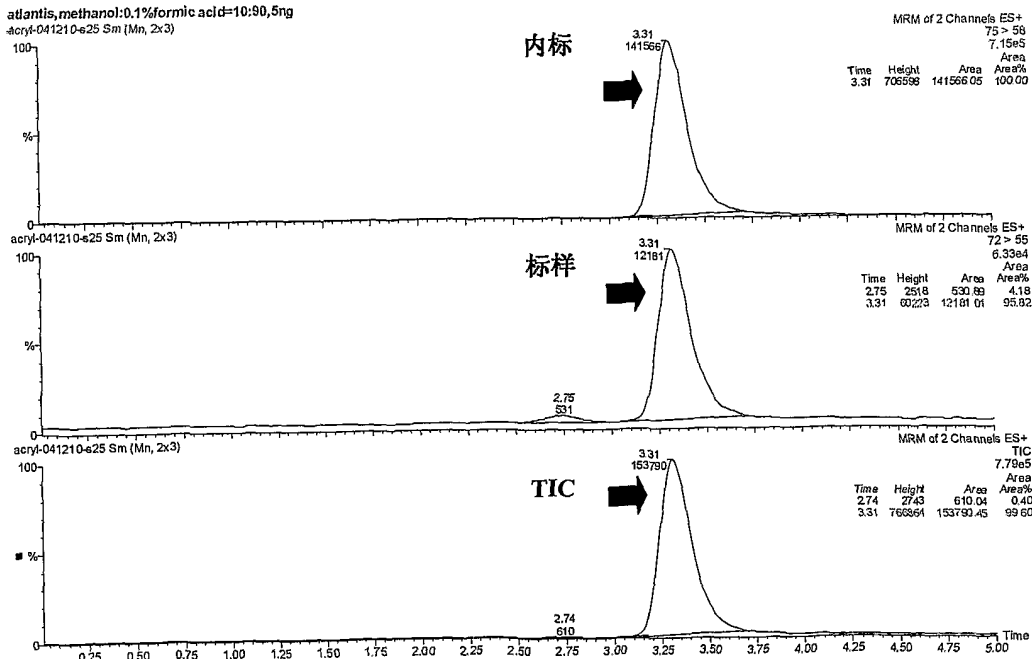


图 9

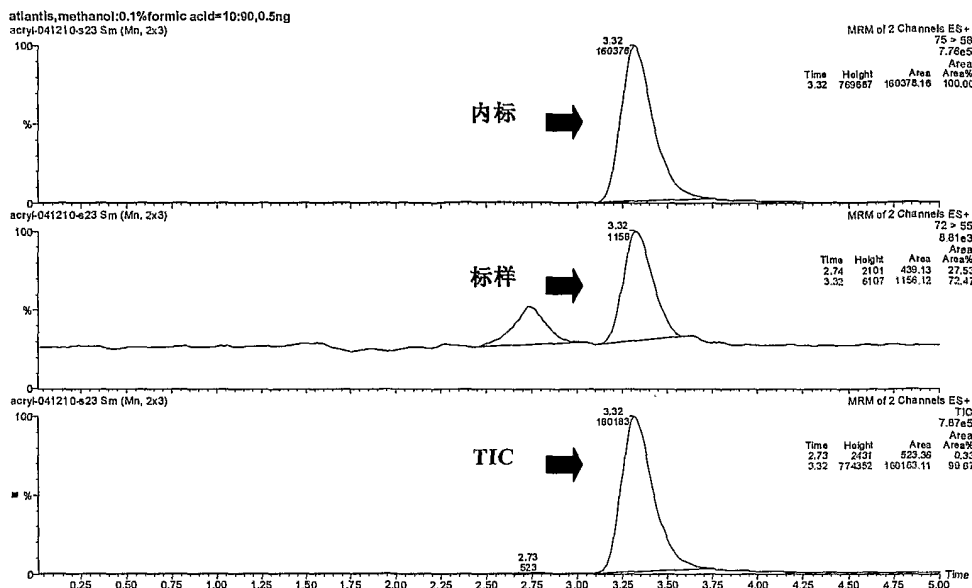


图 10

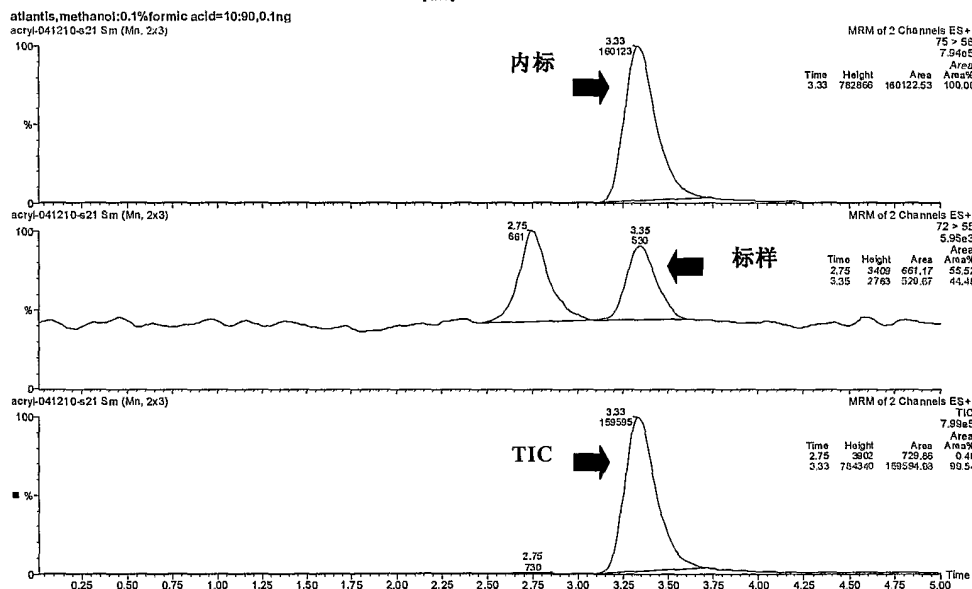


图 11

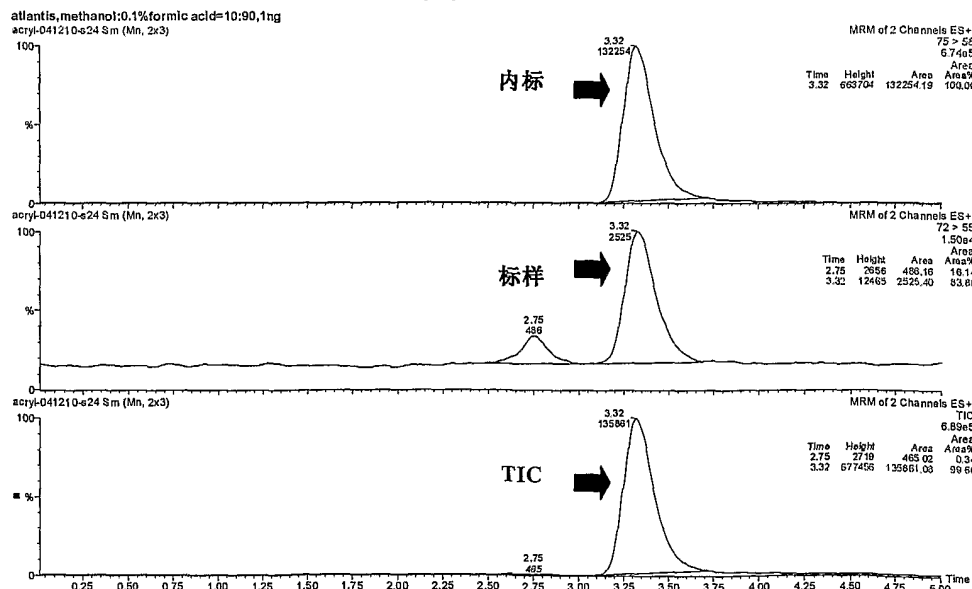


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000431

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L, C07C, C07D, A23F, A24B, A23G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNKI, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1291443A (LIU, Jianguo) 18.Apr.2001 (18.04.2001), claim 2	10
Y	WO2004032647A (SLK FOUNDATION) 22.Apr.2004 (22.04.2004), claims 1-24	1-10
Y	CN1528197A (ZHEJIANG UNIVERSITY (HANGZHOU) INNOESSEN BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 15. Sep.2004 (15.09.2004), claims 1-8	1-10
Y	CN1568840A (LI, Cong) 26.Jan.2005 (26.01.2005), claims 1-6	1-10
Y	CN1228968A (ZHEJIANG AGRICULTURE UNIVERSITY) 22.Sep.1999 (22.09.1999), claim 1	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26.May.2006 (26.05.2006)	Date of mailing of the international search report 29 · JUN 2006 (29 · 06 · 2006)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer ZHAO, Xuewu Telephone No. 86-10-62085280

International application No.
PCT/CN2006/000431

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000431

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 1/015 (2006.01) i
A23L 1/211 (2006.01) i
A23L 3/3463 (2006.01) i

A23F 5/10 (2006.01) i
A23G 1/30 (2006.01) i
A24B 3/00 (2006.01) i
A23L 1/10 (2006.01) i
A23L 1/217 (2006.01) i
A23L 1/311 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/000431

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A23L, C07C, C07D, A23F, A24B, A23G

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, CNKI, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1291443A (刘建国) 18.04 月 2001 (18.04.2001), 权利要求 2	10
Y	WO2004032647A (SLK 基金会) 22.04 月 2004 (22.04.2004), 权利要求 1-24	1-10
Y	CN1528197A (杭州浙大力夫生物科技有限公司) 15. 09 月 2004 (15.09.2004), 权利要求 1-8	1-10
Y	CN1568840A (李聪) 26.01 月 2005 (26.01.2005), 权利要求 1-6	1-10
Y	CN1228968A (浙江农业大学) 22.09 月 1999 (22.09.1999), 权利要求 1	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

26.5 月 2006 (26.05.2006)

国际检索报告邮寄日期

29 · 6月 2006 (29 · 06 · 2006)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

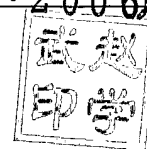
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

赵学武

电话号码: (86-10)62085280



国际申请号
PCT/CN2006/000431

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1291443A	2001-04-18	无	
WO2004032647A	2004-04-22	AU2003264663A FI200201807A	2004-05-04 2004-04-11
CN1528197A	2004-09-15	WO2005032275A	2005-04-14
CN1568840A	2005-01-26	无	
CN1228968A	1999-09-22	CN1066055C	2001-05-23

主题的分类

A23L 1/015 (2006.01) i

A23L 1/211 (2006.01) i

A23L 3/3463 (2006.01) i

A23F 5/10 (2006.01) i

A23G 1/30 (2006.01) i

A24B 3/00 (2006.01) i

A23L 1/10 (2006.01) i

A23L 1/217 (2006.01) i

A23L 1/311 (2006.01) i