

朱艳美, 陈亨业, 邓高琼, 等. 高温大曲白酒中吡嗪类化合物的检测、来源、香气和功能活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 420-428. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040256

ZHU Yanmei, CHEN Hengye, DENG Gaoqiong, et al. Research Progress of the Detection, Source, Aroma and Functional Activity of Pyrazine Compounds in High Temperature Daqu Baijiu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(5): 420-428. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040256

· 专题综述 ·

高温大曲白酒中吡嗪类化合物的检测、来源、香气和功能活性研究进展

朱艳美, 陈亨业, 邓高琼, 付海燕*
(中南民族大学药学院, 湖北武汉 430074)

摘要: 白酒风味与品质差异形成的关键因素——微量化合物, 是当前白酒研究领域的热点之一。吡嗪类化合物是一类对白酒风味形成有重要贡献的微量化合物, 也是白酒中重要的功能性成分。该文详细综述了高温大曲白酒中已知吡嗪类化合物的种类、含量及其常用检测方法, 并对其来源(微生物合成和美拉德反应)、香气和功能活性等方面进行了探讨, 作为高温大曲白酒中兼具风味和功能活性, 又与白酒微生物发酵和酿造工艺密切相关的吡嗪类化合物, 其在白酒生产、质量控制和掺假鉴别等领域将有广阔应用, 该文可为白酒中吡嗪类化合物的研究提供理论参考。

关键词: 白酒, 吡嗪, 高温大曲, 检测, 功能性成分

中图分类号: TS262.3; TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2023)05-0420-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040256



本文网刊:

Research Progress of the Detection, Source, Aroma and Functional Activity of Pyrazine Compounds in High Temperature Daqu Baijiu

ZHU Yanmei, CHEN Hengye, DENG Gaoqiong, FU Haiyan*

(School of Pharmacy, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

Abstract: Microcompounds, the key factors for the difference of flavor and quality in Baijiu, are one of the hot topics in the research field of Baijiu. Pyrazine compounds are a kind of microcompounds which contribute to the formation of the flavor in Baijiu, and are also important functional components in Baijiu. In this review, the types and contents of pyrazine compounds known in high temperature Daqu Baijiu and their common detection methods are reviewed in detail. And the source (microbial synthesis and Maillard reaction), aroma and functional activities of pyrazines are also discussed. Pyrazines, which have both flavor and functional activities in high temperature Daqu Baijiu and are closely related to the microbial fermentation and brewing process of Baijiu, will be widely used in the production, quality control and adulteration identification for Baijiu. This review can provide theoretical reference for the study of pyrazines in Baijiu.

Key words: Baijiu; pyrazine; high temperature Daqu; detection; functional component

白酒又称烧酒, 是用高粱、玉米、小麦等粮食为原料, 经过接种、制曲、固态发酵、甾桶蒸馏、勾兑等一系列复杂工序制成。白酒作为我国的国酒, 历史悠久, 种类丰富, 由于我国地域、气候、环境水质和微生物

菌群的差异, 形成了不同酿造工艺的白酒, 构造了风味迥异的十二大香型, 其中酱香、兼香、芝麻香和部分浓香型白酒均部分或全部采用高温大曲工艺酿造而成, 这种酿造工艺使得白酒具有酿造周期长、香

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32001789, 32122068, 31972164); 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ2023077); 国家重点研发计划项目(2020YFC1712700)。

作者简介: 朱艳美(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 多元谱学技术在食药安全检测中的应用, E-mail: 2604324715@qq.com。

* 通信作者: 付海燕(1983-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 多元谱学技术在食药安全检测中的应用, E-mail: fuhaiyan@mail.scuec.edu.cn。

味优雅细腻、喷香浓郁和酒体丰满等特点^[1-2]。高温大曲是指制曲过程中品温超过 60 °C 的大曲,由于制曲温度较高,加速了美拉德反应,使得此类白酒中吡嗪类化合物的种类与含量高于其它类型的白酒,尤以四甲基吡嗪最为显著。白酒中的四甲基吡嗪主要是由微生物代谢和发酵过程中的美拉德反应产生的。上世纪七十年代北京医药工业研究院从川穹中分离得到量甚微的四甲基吡嗪纯品,研究证明具有抗炎、抗氧化、抑制血小板集聚和神经保护等作用,其作为药物中间体制成药片在临床上用于治疗缺血性血管疾病、癌症、阿尔兹海默症等^[3]。因此,吡嗪类化合物不仅对白酒的风味有很大贡献,同时也是一类重要的健康功能因子。近年来在白酒研究的过程中,吡嗪类化合物也受到人们越来越多的关注。

吡嗪类化合物是指苯环的 1,4 位含两个氮原子的杂环化合物,在天然食品或其发酵过程中普遍存在^[4]。其可用作香精、香料中间体,吡嗪类香料一般有可可、炒花生、烤肉等香味,虽然它没有肉香味,但常被加入肉味香精配方中,原因是它可以烘托出更加浓郁饱满的香味。另外还可用作医药中间体,例如吡嗪酸或吡嗪-2-羧酸由于其诱导细胞凋亡和诱导活性氧 DNA 裂解的活性常作为抗癌药的中间体^[5]。从上世纪二十年代,有人从咖啡中检测出甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪和 2,6-二甲基吡嗪^[6]后,到目前为止,人们已经从许多天然食品中或食品发酵过程中检测到了近百种吡嗪类物质。据粗略统计,目前白酒中已分析到两千多种成分,其中吡嗪类化合物检测到近三十种,其含量与种类以高温大曲工艺酿造而成的酱香型、兼香型和芝麻香型白酒中居多,浓香型次之,清香型中最少,它们主要是由美拉德反应和微生物代谢

产生^[7]。该类化合物由于其对人体健康有益的功能特性被认为是白酒“健康”的主要物质基础,同时也能准确代表高温大曲白酒的品质,故白酒中吡嗪类化合物的研究对白酒“健康”和品质以及真实性鉴别具有重要意义。

本文总结归纳了当前高温大曲白酒中吡嗪类化合物的国内外研究现状,详细综述了其种类、含量和常用检测方法,并对其来源(微生物合成和美拉德反应)、香气和消炎、保肝、抗肿瘤等功能活性进行了探讨,最后展望了吡嗪类化合物在白酒实际生产和鉴别掺假中的应用前景,以期对白酒中吡嗪类化合物的研究提供理论参考。

1 高温大曲白酒中主要的吡嗪类化合物

目前,白酒中的吡嗪类化合物检测出近三十种,由高温大曲工艺酿造的不同香型的白酒中检测到的吡嗪类化合物的种类和含量最为丰富^[8-9](表 1)。杨亮等^[10]采用气质联用法对酱香型和浓香型白酒中的挥发性成分进行了分析,结果表明酱香型酒样中的吡嗪类物质的种类多于浓香型,并且在含量上也有明显差异,酱香型酒样中吡嗪类化合物的含量是浓香型酒样的 46.95 倍;李正涛等^[11]采用气相色谱四级杆串联质谱选择监测模式从酱香型、浓香型、芝麻香型白酒中检测出 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、四甲基吡嗪等 5 种吡嗪类化合物,且每种酒样的四甲基吡嗪含量都要明显高于其它 4 种吡嗪类化合物;王颖等^[12]采用顶空固相微萃取与气质联用技术测定不同产区酱香型高温大曲白酒中挥发性成分的浓度差异,结果表明四甲基吡嗪的浓度是最高的;史改玲等^[13]运用液液萃取结合气相色谱-质谱-选择离子扫描技术检测到四甲基吡嗪在酱香型酒样中质量浓度为

表 1 高温大曲工艺酿造的不同香型白酒中吡嗪类化合物的种类和含量^[8-9]($\mu\text{g/L}$)

Table 1 Types and contents of pyrazine compounds in Baijiu with different flavor types brewed by high temperature Daqu process^[8-9]($\mu\text{g/L}$)

序号	吡嗪类化合物	酱香型			浓香型			兼香型		芝麻香型
		种类1	种类2	种类3	种类1	种类2	种类3	种类1	种类2	景芝
1	吡嗪	37	10					23		23
2	2-甲基吡嗪	323	199	150	21	25	26	154	191	154
3	2-乙基吡嗪	60.31			20.56					
4	2,3-二甲基吡嗪	660	117	80	11	18	22	48	157	48
5	2,5-二甲基吡嗪	143	110	100	8	10	21	57	83	57
6	2,6-二甲基吡嗪	992	873	460	376	75	96	341	792	341
7	2,3,5-三甲基吡嗪	302	940	390	16					
8	四甲基吡嗪	53020	731		195	23	120	156	482	156
9	2-乙基-5-甲基吡嗪	27	23			4				21
10	2,3-二甲基-5-乙基吡嗪	820	330	140	39					
11	2,6-二乙基吡嗪	247	36		275	14	8	40	88	40
12	2-乙基-6-甲基吡嗪	796	349	230	108	73	78	244	418	244
13	3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	83	23		8	4	12	31	27	31
14	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪	1402	231		57	28	14	93	299	93
15	三甲基吡嗪	4965	712		294	53	69	217	729	217
16	2-甲基-3,5-二乙基吡嗪	420	40		23	10			61	17

2379.65~2985.09 $\mu\text{g/L}$, 远高于芝麻香型酒样的 1116.80~1309.66 $\mu\text{g/L}$ 及浓香型酒样的 245.40~555.76 $\mu\text{g/L}$ 。以上研究表明高温大曲酿造的不同香型白酒中吡嗪类化合物的种类和含量有显著差异。其中四甲基吡嗪是含量最高的也是目前最受关注的吡嗪类化合物,其产生机理及功能活性是近年来白酒中吡嗪类化合物领域研究的热点之一。鉴于此,以下关于吡嗪类化合物的产生机理和功能活性主要围绕四甲基吡嗪展开。

2 吡嗪类化合物的检测方法

2.1 高温大曲白酒前处理方法

白酒中风味化合物只占 2%, 其中吡嗪类化合物的含量甚少, 很难检测到。为了精准检测出它们的含量, 必须在仪器检测之前对样品进行富集和浓缩, 这个过程称为样品前处理。目前, 国内外对白酒中风味成分检测的前处理方法主要有直接进样法、液液萃取法、液液微萃取法、固相萃取法、固相微萃取法、搅拌棒吸附萃取法、顶空进样法和超临界二氧化碳流体萃取法等。这些前处理方法种类多样且操作过程复杂, 各方法根据自身的优缺点具有不同的适用范围(表 2)。直接进样法操作简单, 适用于白酒中含量较高物质的定性定量分析, 如丙醇、乙酸乙酯、己酸乙酯等, 不适合含量相对较低的微量组分分析。液液萃取、固相微萃取是目前应用最广泛的香气提取方法, 液液萃取主要适用于极性较大的物质的提取, 而固相微萃取因其灵敏度高、检出化合物种类多, 主要用于微量化合物的提取, 如萜烯类、吡嗪类、含硫化合物等^[14-15]。由于白酒中风味成分组成极其复杂, 且各成分之间性质存在较大差异, 常用一种或多种方法结合分析处理^[16-17]。2020年, Yan 等^[18]采用直接进样法结合 UPLC/MS-MS 实现了对高温大曲不同香型白酒中 27 种吡嗪类化合物的分析, 检出限低至 $6.0 \times 10^{-7} \text{g/L}$ 。同年, 范三红等^[19]采用涡旋辅助分散液液微萃取(DLLME)-气相色谱(GC)法测定清香型白酒中 5 种高级醇的含量。这些结合大型仪器处理的方法虽然效果较好, 但仍存在着耗时长、操作复杂、适用范围有限等问题。故在未来, 前处理方法的发展方

向有两个。一个是开发新的适用范围广泛、经济又操作简便的前处理方法, 另一个是在现有方法的基础上, 结合现代先进技术对其不足之处进行改进, 同时改善或保持其原有的优势。白酒风味物质前处理方法的进一步改善对白酒风味化学的研究有重要意义。

2.2 高温大曲白酒中吡嗪化合物的检测技术

白酒风格与品质的判定离不开对白酒内含物质的探索与研究。白酒风味物质的检测亦需要高效、适用的检测方法和灵敏度高、操作简便的仪器。近年来, 白酒风味物质的检测技术发展迅猛, 出现了气相色谱-嗅觉测定法(gas chromatographic olfactory, GC-O)、气相色谱-氮磷检测器(gas chromatography-nitrogen and phosphorus detector, GC-NPD)、全二维气相色谱-飞行时间质谱(full two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC \times GC-TOFMS)、高效液相-三重四极杆质谱检测仪(high performance liquid phase-triple quadrupole mass spectrometry detector, HPLC-QQQ)和超高效液相色谱结合串联质谱(ultra performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)等一大批新型检测技术, 它们都具有灵敏度高、准确度高、操作简便的优势, 同时也有一些不可忽视的局限性(表 3)。高温大曲白酒中吡嗪化合物的检测技术主要集中在气相色谱和气质联用^[22]。Wang 等^[23]采用 HS-SPME 结合 GC-MS/O 对浓香型大曲白酒中的挥发性成分进行了分析, 共鉴定出 139 种不同种类和浓度的化合物, 其中包括 43 种芳烃化合物, 基于定量分析结果, 计算了这些芳香化合物的香气活度值(odour active values, OAV), 得出一些 OAV>1 的化合物对大曲香气做出了重大贡献, 如 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪。Zhu 等^[24]采用 GC-NPD 对郎酒中的挥发性成分进行了分析并利用气味活性值(OAV)对重要化合物进行评价, 结果表明, 2-甲基-3-呋喃硫醇、3-巯基乙酸酯、 β -大马稀酮、(E)-2-壬烯醛、庚醛、己醛和 2-异丙基-3-甲氧基吡嗪是郎酒香气的主要来源。GC-NPD 检测器的使用对白酒中含氮化合物的检测具有极大的优势。Yang

表 2 高温大曲白酒检测的前处理方法

Table 2 Preprocessing method of detection for high temperature Daqu Baijiu

前处理方法	优点	缺点
直接进样	操作简单, 无需溶剂, 真实性高, 重现性好 ^[14]	不适合含量低的微量组分分析 ^[15]
液液萃取	操作简单, 检出种类多, 回收率高 ^[15]	样品用量大, 耗时长, 萃取液浓缩过程中会损失一部分低沸点的挥发性成分 ^[20]
液液微萃取	加快萃取平衡速率、提高萃取效率, 减少了因萃取时间过长而导致低沸点化合物的损失 ^[15]	回收率和萃取效率有待提高
固相萃取	萃取液用量少, 重复性好 ^[15]	成本高, 过程相对复杂, 对固定相材料要求高 ^[15]
固相微萃取	检出种类多, 即时现场采样, 萃取时间和解吸时间短, 灵敏度高 ^[21]	萃取量不足, 萃取头价格昂贵 ^[15]
搅拌棒吸附萃取	固定相体积大, 具有萃取容量大, 萃取剂用量少, 经济环保 ^[15]	涂层种类少、价格昂贵 ^[17]
顶空进样	操作简便, 成本低, 易于实现自动化	待测成分易于挥发
超临界二氧化碳流体萃取	无毒, 经济环保, 容易与反应产物分离	操作要求高、便携性差, 无法大规模使用 ^[17]

表 3 高温大曲白酒中吡嗪类化合物的检测技术发展

Table 3 Development of detection techniques for pyrazine compounds in high temperature Daqu Baijiu

检测技术	优点	缺点	参考文献
GC-MS/O	灵敏度高,可同时定性和定量,应用范围广阔	在香气成分的结构分析上不能满足研究的需要	[23]
GC-NPD	该方法简单,便捷,分析时间较短,满足了生产快速检测的需求	由于此种方法为直接进样,故检测限和定量限相对较高	[24]
GC×GC/TOF-MS	分辨率高、灵敏度高、峰容量大,采集频率高	样品在前处理中,会造成百分之十左右的目标成分的损失	[25]
HPLC-QQQ	操作简单,时间短,准确度高,灵敏度高	分辨力不足,容易受m/z近似的离子干扰,仪器成本高	[26]
UPLC-MS/MS	操作过程简单,样品用量小,无需富集,准确度高	流动相的选择较困难,要考虑的因素较多	[18]

等^[25]基于 GC×GC-TOF/MS 和 UPLC-Q-TOF/MS 的非靶向代谢组学研究了大曲的理化性质与其代谢谱之间的关系,大曲共鉴定出化合物 647 种,其中挥发性化合物 401 种,以芳香族化合物和吡嗪类化合物为主,非挥发性化合物 246 种,以有机和氨基酸类化合物为主。王双^[26]利用高效液相-三重四极杆质谱分析酱香型、清香型白酒中的芳香酯类物质,并同时检测白酒中的苯乙酸乙酯、苯乙酸异丁酯这两种芳香酯类的含量,结果显示,苯乙酸乙酯在剑南春中的浓度是 9.80 μg/mL,苯乙酸异丁酯的浓度是 1.15 μg/mL,利用高效液相-三重四极杆质谱可以方便、快捷地检测出白酒中的苯乙酸乙酯和苯乙酸异丁酯这两种物质的含量,为白酒中芳香酯类物质的检测提供了一种更好的方法。高效液相-三重四极杆质谱是最近几年新发展的质谱分析器,由于它较高的准确性、灵敏度和选择性,很适合检测像白酒这样复杂体系中的物质。在检测鉴定白酒中风味化合物时,单一的检测手段往往具有一定的局限性,采用多种手段结合取长补短可提高检测结果的准确性。确定白酒中吡嗪类化合物对白酒风味贡献的研究对白酒的质量控制有重要意义,所以研究人员在对白酒中的吡嗪类化合物进行检测时,一定要根据白酒的酿造工艺和吡嗪类化合物的物理化学性质选择正确的检测方法,从而使检测结果具有更高的科学性和准确性,为吡嗪类化合物的深入研究提供良好的技术方法支持。

3 吡嗪类化合物的产生途径

3.1 美拉德反应

美拉德反应是羰基化合物和氨基化合物之间的反应又称羰氨反应,1912 年被法国化学家 L.C. Maillard 提出,广泛发生于食品发酵和贮存过程中^[27]。白酒酿造过程中的美拉德反应集中发生在制曲、高温发酵和甾桶蒸馏等工艺中,美拉德反应过程不仅产生吡嗪类物质,同时还可生成咪喃、吡喃等含氮、含氧的杂环化合物,这些物质虽然在酒中含量微少,但各类优质白酒独特的酒体风格均离不开美拉德反应产物的贡献。美拉德反应过程非常复杂,到目前为止人们只是对葡糖胺(Amadori)重排和斯特雷克尔(Strecker)降解这两个阶段有了较为明确的认识,而对于反应中高聚物的生成机理仍没有可靠的理论解释^[28]。四甲基吡嗪作为白酒中的健康功能因子,其来源得到了极大的关注。Rizz^[29]发现其在美拉德反应中首先由 2,3-丁二酮和 α-氨基酸通过 Strecker 降解

产生 3-氨基-2-丁酮,然后两分子的 3-氨基-2-丁酮通过亲核加成反应并脱水氧化生成四甲基吡嗪(图 1)。后来 AMRANIHEMAIMI 等^[30]通过同位素标记的缬氨酸和甘氨酸研究了美拉德反应中吡嗪类化合物的合成机理,发现氨基酸可作为烷基吡嗪合成的侧链取代基团。目前相对于四甲基吡嗪来说,其它吡嗪类物质的合成路线及机制尚未明确,仍需进一步挖掘。最近几年 Deng 等^[31]发现前体相互作用不足和 pH 的快速下降限制了葡糖胺重排产物降解过程中吡嗪的形成,但升高反应温度可以通过增加前体含量来降低负抑制作用。由此可以想到美拉德反应的影响因素包括温度、时间、湿度、pH 及底物的浓度和性质等对产物的生成有很大影响,可以尝试通过控制反应条件来控制吡嗪类产物的含量进而改善生产工艺,提升白酒的质量。

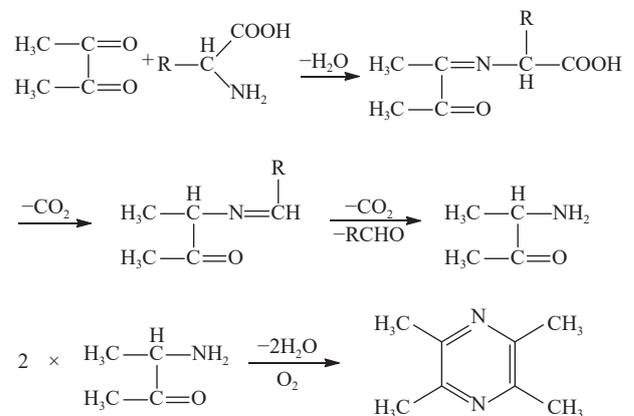


图 1 美拉德反应中四甲基吡嗪可能的生成路径^[32]
Fig.1 Possibly formation paths of tetramethylpyrazine in Maillard reaction^[32]

3.2 微生物代谢

早期,白酒中的吡嗪类化合物均被认为是由美拉德反应产生的。直到 2007 年,江南大学研究人员首次在酱香型高温大曲白酒中筛选到了高产四甲基吡嗪的芽孢杆菌,从实践上证明了中国白酒中的四甲基吡嗪亦来源于发酵蒸馏过程中的微生物代谢反应,而不仅仅是美拉德反应。后来他们又以高产四甲基吡嗪的枯草芽孢杆菌为研究对象,通过底物添加和同位素跟踪法对微生物发酵产生四甲基吡嗪的前体物质乙偶姻和氨的产生途径进行了追踪,结果表明糖酵解途径产生的丙酮酸缩合成 α-乙酰乳酸,再脱羧形成了乙偶姻,乙偶姻与氨经过非酶促反应合成了四甲

基吡嗪^[28]。在这之后 Dickschat 等^[33]研究了谷氨酸棒状杆菌中吡嗪的生物合成,首先两分子的丙酮酸在焦硫酸硫胺素的辅助下由乙酰乳酸合酶合成一分子的乙酰乳酸,之后乙酰乳酸氧化脱羧生成乙偶姻,乙偶姻再通过脱氢和转氨两个过程生成 3-氨基-2-丁酮,最后两分子的 3-氨基-2-丁酮通过亲核加成反应并脱水氧化生成四甲基吡嗪(图 2)。目前通过分离筛选高产四甲基吡嗪的微生物进而来稳定和提提高白酒中四甲基吡嗪含量是一种常用的手段。2021 年,张颖等^[34]从酱香大曲中经过液态发酵试验筛选到了高产四甲基吡嗪的地衣芽孢杆菌,将该菌株的种子培养液按不同浓度接种到酱香型白酒堆积培养中与传统大曲协同发酵,结果表明,四甲基吡嗪产量比对照组提高 24.88%。同年,梁慧珍等^[35]采用高温培养和固态发酵,从高温大曲中筛选到高产吡嗪的菌株,并将其应用于大曲生产,使用超高效液相色谱-串联质谱检测强化大曲中吡嗪类物质含量,结果表明四甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪含量相比对照大曲分别提升 2.36 倍、2.56 倍、2.33 倍。微生物代谢生产四甲基吡嗪,由于经济环保、反应条件温和等优势而备受关注,但同时,也存在产物含量低、前体物质转化率不高、产业化难等问题亟待解决。行业未来要攻克的重点是在阐明白酒中四甲基吡嗪合成机制的基础上,提高堆积糟醅中的含氧量实现高产四甲基吡嗪的菌株在酒醅中的积累,进而提高白酒中四甲基吡嗪含量,对现有的白酒酿造的工艺进行改进、调节和控制。

4 吡嗪类化合物的香气特征

吡嗪类化合物的香气很容易辨别,嗅觉阈值极低,一般具有类似于坚果、可可、烤肉的香味,香气透散性好,对其他香味有助香作用,常用于巧克力、奶制品、烘焙食品的加工过程中。另外它还略带广藿香、香草根及薄荷香味,用于制作香水,具有强烈,自然,持久的效果^[36]。白酒中有 98% 是水和酒精,只有 2% 的呈香呈味物质,白酒香味成分种类有:醇、酯、酸、醛酮、芳香族化合物、含氮化合物等,含氮化合物主要是四甲基吡嗪、三甲基吡嗪和 2,6-二甲基吡嗪等,对白酒的风格和口感有重要贡献^[37]。2020 年,HE 等^[38]采用二维气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOF-MS)和描述性感官分析相结合的方法,揭示了浓香型白酒中的焙烤香主要由吡嗪类化合物贡献,包括 2,3-二甲基-5-乙基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪等。2022 年,熊小月等^[39]采用液液萃取法结合气相色谱质谱法同时结合香气活性值法(OAV),对酱香型白酒酿造轮次醇甜典型体基酒的风味结构进行解析,发现 2,6-二甲基吡嗪、2-乙基-6-甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪对 7 个轮次均具有主要贡献。不同的吡嗪类化合物其香味特征明显不同(表 4)。通常采用香气活度值(OAV)来量化评价各种吡嗪类化合物对白酒总体香味的贡献程度,OAV>1 说明该成分对白酒总体香味有直接影响,在一定范围内,OAV 越大,说明该物质对白酒总体香味贡献越大,对呈现白酒整体香气特征的影响也就越大。

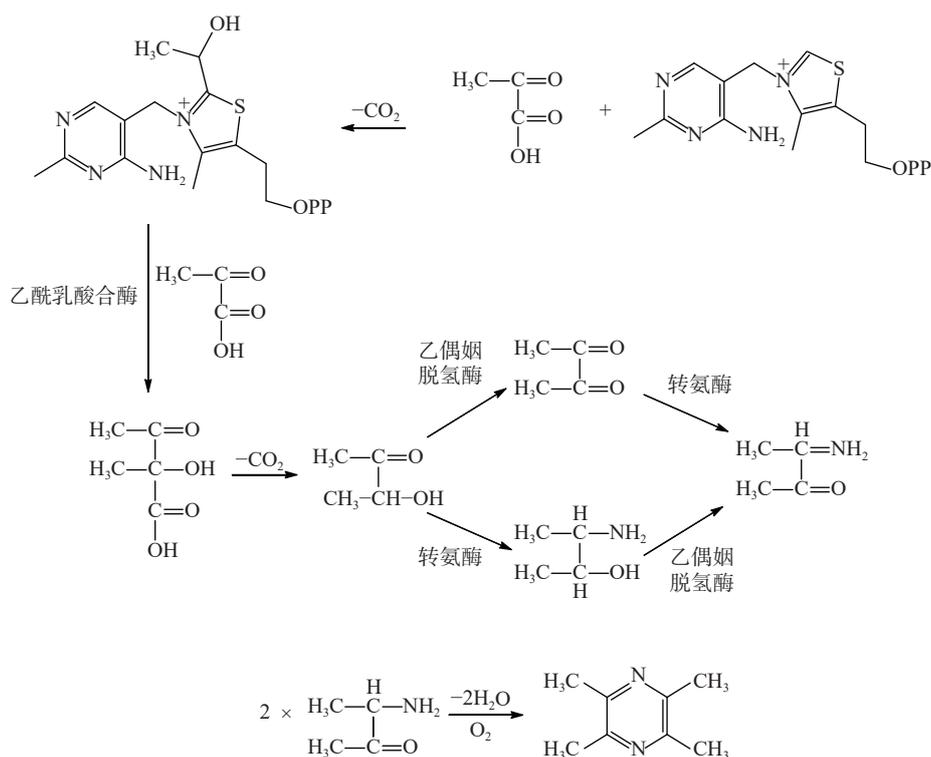


图 2 四甲基吡嗪可能的生物合成途径^[30]

Fig.2 Possibly biosynthetic pathway of tetramethylpyrazine^[30]

表 4 高温大曲白酒中吡嗪类化合物的香气特征^[37]Table 4 Aroma characteristics of pyrazine compounds in high-temperature Daqu Baijiu^[37]

序号	化合物名称	感官特征	在46%vol酒精水溶液中的嗅觉阈值(μg/L)	平均浓度(μg/L)	平均香气活度值
1	2-甲基吡嗪	坚果,烤牛肉香	121927.01	138	0.001132
2	2-乙基吡嗪	焙炒坚果香	21814.58	41	0.001879
3	2,3-二甲基吡嗪	坚果,可可香	10823.770	129	0.011918
4	2,5-二甲基吡嗪	类似炸土豆片香	3201.90	66	0.020613
5	2,6-二甲基吡嗪	青椒香	21814.58	283	0.012973
6	2,3,5-三甲基吡嗪	青椒香、咖啡香、烤面包香	729.86	278	0.380895
7	四甲基吡嗪	牛肉猪肉加热时的香气	80073.16	6861	0.085684

5 吡嗪类化合物的功能活性

中国白酒因原料和酿造工艺的独特性而含有众多对人体有益的功能性成分^[40]。截止到 2021 年,研究发现中国白酒中共有 202 种健康功能因子,易挥发的有酚、酸、酯、萜烯类、含硫化合物、含氮化合物等,不易挥发的有氨基酸、维生素、多糖、微量元素等,其中吡嗪类化合物是重要的含氮化合物,共有 6 种^[41]。这些健康因子覆盖了全部的十二大香型,以高温大曲工艺酿造的浓香型、酱香型、芝麻香型白酒中报道的健康因子的数量居多。2019 年罗强等^[42]证明了酱香型高温大曲白酒中吡嗪类物质具有体外抗炎活性;2020 年罗强等^[43]又研究了酱香型白酒中吡嗪类物质对幽门螺杆菌代谢物诱导人胃上皮细胞炎症的抑制作用;还有人研究出 2-甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪和 2,3,5-三甲基吡嗪均具有一定的抗氧化功能。除此之外,一些含吡嗪的天然产物对人类的醛糖还原酶(ALR2)有抑制活性,有助于减轻糖尿病并发症^[44]。目前,白酒中吡嗪类健康因子研究最多的是四甲基吡嗪,已经发现了其降血糖、抗肿瘤、保肝、降血压等多种功能活性(表 5)。现代医学研究表明,适当饮酒可以增强人体免疫力,降低冠心病的死亡率^[45],并且一定范围的非常轻的酒精剂量可能具有潜在的人类癌症抑制作用^[46]。

表 5 四甲基吡嗪的功能活性

Table 5 Functional activity of tetramethylpyrazine

功能活性	作用机制
降血压	a. 调整离子通道,刺激 NO 产生的释放; b. 抑制血管平滑肌细胞增殖和凋亡迁移,清除 ROS; c. 调节炎症和细胞凋亡和防止血小板聚集 ^[47-49]
神经保护	a. 调节硫氧还蛋白所致转录 ^[50] ,下调表达 NO 合成酶的神经元同种型(NOS)起到神经保护作用 ^[51] ; b. 调节 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)改善脑缺血再灌注损伤 ^[51-53] ; c. 具有保护线粒体功能和酶促抗氧化剂的能力 ^[54] ; d. 抗炎特性 ^[55-56]
降血糖	有效地缓解葡萄糖和糖尿病尿素氮浓度(BUN) ^[55]
保肝	a. 激活 UQCRC2 依赖性线粒体自噬抑制酒精性肝病中 MLKL 介导的肝细胞坏死凋亡 ^[57] ; b. 对含有 m-DNA 的肝细胞来源的细胞外囊泡介导的肝细胞损伤和肝损伤期间星状肝细胞激活有保护作用 ^[58]
消炎	减轻氧化应激损伤、抑制炎症反应 ^[59]
抗肿瘤 ^[60]	通过抑制刺猬信号通路抑制 CC 细胞的增殖、迁移和侵袭 ^[61]
预防关节炎	缓解软骨细胞内质网应激激活的细胞凋亡和相关炎症,调控软骨退变 ^[62]

6 总结与展望

高温大曲白酒中的吡嗪类化合物无论是种类还是含量都是相当丰富的,它们对白酒的风味和品质起着至关重要的作用。由于高温大曲白酒中吡嗪类化合物的种类和含量与其酿造原料、制曲、堆积和蒸馏等工艺密切相关,故吡嗪类化合物亦是一种能够准确代表高温大曲白酒的品质的标志性化合物。通过提高白酒中吡嗪类化合物的含量可进一步优化白酒的生产工艺,提升白酒质量,这具有十分重要的现实意义。现阶段,四甲基吡嗪是白酒中最早被发现同时研究最多的吡嗪类化合物,在它的含量、产生途径、香气特征及其功能活性等方面都有研究。除了之前最早由江南大学研究人员首次筛选到了高产四甲基吡嗪的芽孢杆菌,后来也有其他研究人员发现了高产四甲基吡嗪的地衣芽孢杆菌和其他菌株,并将此功能菌株应用于中国白酒的酿造工艺中,明显提高了白酒中四甲基吡嗪的含量,还在一些酿酒企业中也成功投入使用。与此同时体现出的问题就是其它种类的吡嗪类化合物的研究资料相对匮乏,故当前白酒中吡嗪类化合物的研究重点是: a. 进一步揭示其它吡嗪类化合物对白酒风味的贡献及其生成途径,寻找白酒生产过程中风味品质的精准调控方法; b. 深入探究白酒酿造工艺对吡嗪类化合物生成的影响机制,为白酒酿造过程中吡嗪类化合物含量的调控奠定理论基础; c. 阐明高温大曲白酒中吡嗪类化合物的种类和含量与其酿造工艺和品质之间的量效-组效关系,为白酒品质和真实性的精准鉴别提供新方法。

参考文献

- [1] YI Z L, JIN Y L, XIAO Y, et al. Unraveling the contribution of high temperature stage to Jiang-flavor Daqu, a Baijiu starter for production of Chinese Jiang-flavor Baijiu, with special reference to metatranscriptomics[J]. Food Microbiology, 2019, 10: 472.
- [2] WANG M Y, YANG J G, ZHAO Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of sauce flavor Baijiu[J]. Food Science, 2019, 84(1): 6-18.
- [3] 吴建峰. 中国白酒中健康功能性成份四甲基吡嗪的研究综述[J]. 酿酒, 2006(6): 13-16. [WU J F. Review on the study of tetramethylpyrazine, a healthy functional component in Chinese Baijiu[J]. Wine, 2006(6): 13-16.]
- [4] 郭学武, 范恩帝, 马冰涛, 等. 中国白酒中微量成分研究进展

- [J]. *食品科学*, 2020, 41(11): 267-276. [GUO X W, FAN E D, MA B T, et al. Research progress of trace components in Chinese Baijiu[J]. *Food Science*, 2020, 41(11): 267-276.]
- [5] AKHLAGHI S, MOSTOUFI A, KALANTAR H, FEREDOONNEZHAD M. Synthesis and biological evaluations of novel pyrazinoic acid derivatives as anticancer agents[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2022, 31(4): 580-593.
- [6] 金其璋. 食品香料的新成员-杂环化合物[J]. *化学通报*, 1984(1): 31-37. [JIN Q Z. Heterocyclic compounds are new members of food flavoring[J]. *Chemistry Bulletin*, 1984(1): 31-37.]
- [7] 王奕芳, 周容, 张明春, 等. 白酒中重要的功能化合物吡嗪的研究进展[J]. *酿酒*, 2018, 45(6): 20-24. [WANG Y F, ZHOU R, ZHANG M C, et al. Research progress of pyrazine, an important functional compound in Baijiu[J]. *Wine*, 2018, 45(6): 20-24.]
- [8] 余晓, 尹建军, 胡国栋. 白酒中含氮化合物的分析研究[J]. *酿酒*, 1992(1): 71-76. [YU X, YIN J J, HU G D. Analysis of nitrogen compounds in Baijiu[J]. *Wine*, 1992(1): 71-76.]
- [9] 庄名扬. 再论美拉德反应产物与中国白酒的香和味[J]. *酿酒科技*, 2005(5): 34-38. [ZHUANG M Y. On the aroma and taste of Maillard reaction products and Chinese Baijiu[J]. *Baijiu-Making Science & Technology*, 2005(5): 34-38.]
- [10] 杨亮, 占杨杨, 魏刚, 等. 基于气质联用法的两种香型白酒挥发性成分差异分析[J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 76-81. [YANG L, ZHAN Y Y, WEI G, et al. Difference analysis of volatile components in two flavor Baijiu based on GC-MS[J]. *China Brewing*, 2018, 37(10): 76-81.]
- [11] 李正涛, 孙跃, 孙海燕, 等. GC-MS/MS-SRM 技术在检测白酒中 5 种吡嗪类化合物的应用研究[J]. *酿酒科技*, 2020(5): 17-21, 26. [LI Z T, SUN Y, SUN H Y, et al. Application of GC-MS/MS-SRM in determination of five pyrazine compounds in Baijiu[J]. *Baijiu-making Technology*, 2020(5): 17-21, 26.]
- [12] 王颖, 邱勇, 王隆, 等. 不同产区酱香型高温大曲黑、白、黄曲的理化、挥发性成分差异性分析[J]. *中国调味品*, 2022, 47(6): 155-159. [WANG Y, QIU Y, WANG L, et al. Analysis on the differences of physicochemical indexes and volatile components of black, white and yellow koji at high temperature with Maotai flavor in different production areas[J]. *China Condiment*, 2022, 47(6): 155-159.]
- [13] 史改玲, 郭莹, 李景辉, 等. LLE-GC-MS-SIM 检测白酒中 9 种微量功能成分[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 114-119. [SHI G L, GUO Y, LI J H, et al. Nine trace functional components in Baijiu were detected by LLE-GC-MS-SIM[J]. *Food Science*, 2021, 42(20): 114-119.]
- [14] 唐平, 山其木格, 王丽, 等. 白酒风味化学研究方法及其酱香型白酒风味化学研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 315-324. [TANG P, SHAN Q M G, WANG L, et al. Research methods of flavor chemistry of Baijiu and progress in flavor chemistry of sauce flavor Baijiu[J]. *Food Science*, 2020, 41(17): 315-324.]
- [15] 林文轩, 敖灵, 董蔚, 等. 白酒风味物质前处理方法的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(15): 307-314. [LIN W X, AO L, DONG W, et al. Research progress on pretreatment methods of Baijiu flavor substances[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(15): 307-314.]
- [16] 夏磊. 浅谈白酒检测中存在的问题及对策[J]. *食品安全导刊*, 2021(24): 63-64. [XIA L. Discussion on the problems and countermeasures in Baijiu testing[J]. *Food Safety Guide*, 2021(24): 63-64.]
- [17] 吴成林, 胡家艺, 张惟广. 白酒风味物质研究进展及关键技术分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(3): 207-215. [WU C L, HU J Y, ZHANG W G. Research progress and key technologies of Baijiu flavor substances[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(3): 207-215.]
- [18] YAN Y, CHEN S, HE Y X, et al. Quantitation of pyrazines in Baijiu and during production process by a rapid and sensitive direct injection UPLC-MS/MS approach[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 128: 109371.
- [19] 范三红, 李颖星, 白宝清. 涡旋辅助分散液液微萃取-气相色谱法测定清香型白酒中 5 种高级醇[J]. *中国酿造*, 2020, 39(4): 194-200. [FAN S H, LI Y X, BAI B Q. Determination of five higher alcohols in clear flavor Baijiu by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography[J]. *China Brewing*, 2020, 39(4): 194-200.]
- [20] 郭云霞, 李娜, 程伟, 等. 液液萃取与顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱法分析金种子馥合香白酒香气成分的比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(23): 9056-9061. [GUO Y X, LI N, CHENG W, et al. Comparison of aroma components in Jinzhongzi Fuhexiang Baijiu by liquid-liquid extraction and headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(23): 9056-9061.]
- [21] WANG M Y, ZHANG Q, YANG J G, et al. Volatile compounds of Chinese strong flavor Baijiu distilled from grains fermented in 100 to 300 year-old cellars[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2020, 126(1): 116-130.
- [22] 孙文佳, 汪廷彩, 雷毅, 等. 基于静态顶空-气质联用法分析酱香型白酒空杯香气成分[J]. *中国酿造*, 2021, 40(11): 93-97. [SUN W J, WANG Y C, LEI Y, et al. Lingering aroma composition in empty glass of sauce-flavor Baijiu by SHS-GC/MS[J]. *China Brewing*, 2021, 40(11): 93-97.]
- [23] WANG Z, WANG S, LIAO P F, et al. HS-SPME combined with GC-MS/O to analyze the flavor of strong aroma Baijiu Daqu[J]. *Foods*, 2022, 11(1): 116.
- [24] ZHU J C, NIU Y W, XIAO Z B. Characterization of important sulfur and nitrogen compounds in Lang Baijiu by application of gas chromatography-olfactometry, flame photometric detection, nitrogen phosphorus detector and odor activity value[J]. *Food Research International*, 2020, 131: 109001.
- [25] YANG L, FAN W L, XU Y. GC×GC-TOF/MS and UPLC-Q-TOF/MS based untargeted metabolomics coupled with physicochemical properties to reveal the characteristics of different type daqus for making soy sauce aroma and flavor type Baijiu[J]. *LWT*, 2021, 146: 111-416.
- [26] 王双. 利用高效液相-三重四极杆质谱分析中国传统酿造白酒中的芳香酯类物质[J]. *酿酒*, 2019, 46(6): 84-85. [WANG S. Analysis of aromatic esters in traditional Chinese Baijiu by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry]

- try[J]. *Wine*, 2019, 46(6): 84–85.]
- [27] MA H C, CHEN Y T, HE Z Z, WEI Y H. Facile fluorescent glucose detection based on the Maillard reaction[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 640: 128–339.
- [28] 吴建峰. 白酒中四甲基吡嗪全程代谢机理研究[D]. 镇江: 江南大学, 2013. [WU J F. Study on metabolism mechanism of tetramethylpyrazine in Baijiu[D]. Zhenjiang: Jiangnan University, 2013.]
- [29] RIZZ G P. Mechanistic study of alkylpyrazine formation in model systems[J]. *Agric Food Chemistry*, 1972, 20(5): 1081–1085.
- [30] AMRANIHEMAIMI M, CERNY C, FAY L B, Mechanisms of formation of alkylpyrazines in the Maillard reaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(11): 2818–2822.
- [31] DENG S B, CUI H P, HAYAT K, et al. Comparison of pyrazines formation in methionine/glucose and corresponding amadori rearrangement product model[J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132500.
- [32] 陈亨业. 山西老陈醋对晚期糖基化终末产物形成的抑制及产苯乳酸醋酸菌的发现[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. [CHEN H Y. Inhibition of late glycation end product formation by Shanxi aged vinegar and discovery of phenyllactate acetic acid producing bacteria[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.]
- [33] DICKSCHAT J S, WICKEL S, BOLTE C J, et al. Pyrazine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Eur J Org Chem*, 2010, 14: 2687–2695.
- [34] 张颖, 李霄霄, 李景辉, 等. 高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的筛选及其对酱香型白酒堆积过程的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(2): 142–149. [ZHANG Y, LI X X, LI J H, et al. Screening of *Bacillus* tetramethylpyrazine with high yield and its effect on the accumulation process of sauce flavor Baijiu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(2): 142–149.]
- [35] 梁慧珍, 卢廷想, 刘正, 等. 高温大曲中高产吡嗪类物质芽孢杆菌的筛选与应用[J]. *中国酿造*, 2022, 41(1): 116–122. [LIANG H Z, LU Y X, LIU Z, et al. Screening and application of high yield pyrazine *Bacillus* in high temperature Daqu[J]. *China Brewing*, 2022, 41(1): 116–122.]
- [36] FREY, CARL; ROUSEFF, RUSSELL, et al. Chocorom pyrazine: A remarkable pyrazine for flavors and fragrances[J]. *ACS Symposium Series*, 2005, 908: 189–202.
- [37] 范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. *酿酒*, 2011, 38(4): 80–84. [FAN W L, XU Y. Determination of olfactory threshold of 79 flavor compounds in Baijiu[J]. *Wine*, 2011, 38(4): 80–84.]
- [38] HE Y X, LIU Z P, QIAN M, et al. Unraveling the chemosensory characteristics of strong-aroma type Baijiu from different regions using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry and descriptive sensory analysis[J]. *Food Chemistry*, 2022, 331: 127335.
- [39] 熊小月, 李利利, 马宇, 等. 酱香白酒酿造轮次醇甜典型基酒风味解析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 261–267. [XIONG X Y, LI L L, MA Y, et al. Flavor analysis of typical body base Baijiu in sauce-fragrant Baijiu brewing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(13): 261–267.]
- [40] 孙宝国, 李贺贺, 胡萧梅, 等. 健康白酒的发展趋势[J]. *中国食品*, 2021, 2021(S1): 11–14. [SUN B G, LI H H, HU X M, et al. Development trend of healthy Baijiu[J]. *Chinese Food*, 2021, 2021(S1): 11–14.]
- [41] 孙宝国, 黄明泉, 王娟. 白酒风味化学与健康功效研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 1–13. [SUN B G, HUANG M Q, WANG J. Research progress on flavor chemistry and health efficacy of Baijiu[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2021, 21(5): 1–13.]
- [42] 罗强, 刘杰, 刘志刚. 酱香型白酒中吡嗪类物质体外抗炎作用研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(7): 156–160. [LUO Q, LIU J, LIU Z G. Anti-inflammatory effect of pyrazines in sauce flavor Baijiu *in vitro*[J]. *China Brewing*, 2019, 38(7): 156–160.]
- [43] 罗强, 刘杰, 刘志刚. 酱香型白酒中生物活性物质抗幽门螺杆菌代谢物诱导的人胃上皮细胞炎症作用研究[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(4): 11–17. [LUO Q, LIU J, LIU Z G. Effect of bioactive substances in sauce flavor Baijiu on human gastric epithelial cell inflammation induced by *Helicobacter pylori* metabolites[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2020, 56(4): 11–17.]
- [44] ROBERT W, HUIGENS II I, BEAU R, et al. Pyrazine and phenazine heterocycles: Platforms for total synthesis and drug discovery[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1112.
- [45] BAZZANO L A, GU D F, REYNOLDS K, et al. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease among Chinese men[J]. *International Journal of Cardiology*, 2009, 135(1): 78–85.
- [46] WANG X X, JIA M, MAO Y F, et al. Very-light alcohol consumption suppresses breast tumor progression in a mouse model[J]. *Food and Function*, 2022, 13(6): 3391–3404.
- [47] ZHANG Y Q, WU J B, YIN W, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of ligustrazine/resveratrol hybrids as potential anti-ischemic stroke agents[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2020, 18(8): 633–640.
- [48] HAN X K, CHEN X, CHEN S L, et al. Tetramethylpyrazine attenuates endotoxin-induced retinal inflammation by inhibiting microglial activation via the TLR4/NF- κ B signalling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110–273.
- [49] CHEN L J, PANG X, HAO C S, et al. Prevention of neointimal formation after angioplasty using tetramethylpyrazine-coated balloon catheters in a rabbit iliac artery model[J]. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2019, 9(5): 472–480.
- [50] JIA J, ZHANG X, HU Y X, et al. Protective effect of tetraethylpyrazine against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: Therapeutic time window and its mechanism[J]. *Thrombosis Research*, 2019, 123(5): 727–730.
- [51] TENG F M, SHEN M H, WANG L, et al. Ultrasound/microbubble-mediated tetramethylpyrazine for neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion-injured rat brain[J]. *Applied Acoustics*, 2021, 183: 108330.
- [52] ZHAI L, JIA Y L, JI Y Q, et al. Protective effects of tetramethylpyrazine analogue Z-11 on cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 844: 156–164.
- [53] ZHU T, FANG B Y, MENG X B, et al. Folium ginkgo ex-

- tract and tetramethylpyrazine sodium chloride injection (Xingxiong injection) protects against focal cerebral ischaemia/reperfusion injury via activating the Akt/Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2022, 60(1): 195–205.
- [54] ZHANG C B, SHEN M H, TENG F M, et al. Ultrasound-enhanced protective effect of tetramethylpyrazine via the ROS/HIF-1A signaling pathway in an *in vitro* cerebral ischemia/reperfusion injury model[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2018, 44: 1786–1798.
- [55] HAIDY E M, ESTHER T M. Tetramethylpyrazine guards against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats through inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B and activating Nrf2 and PPAR- γ signaling pathways[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 857: 172–422.
- [56] MENG Z Y, CHEN H Z, MENG S X. The roles of tetramethylpyrazine during neurodegenerative disease[J]. *Neurotoxicity Research*, 2021, 39(5): 1665–1677.
- [57] ZHOU Y, WU R M, WANG X Q, et al. Activation of UQCRC2-dependent mitophagy by tetramethylpyrazine inhibits MLKL-mediated hepatocyte necroptosis in alcoholic liver disease [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 179: 301–316.
- [58] LI Y J, LIU R P, DING M N. Tetramethylpyrazine prevents liver fibrotic injury in mice by targeting hepatocyte-derived and mitochondrial DNA-enriched extracellular vesicles[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43: 2026–2041.
- [59] LI J, GONG X Z. Tetramethylpyrazine: An active ingredient of chinese herbal medicine with therapeutic potential in acute kidney injury and renal fibrosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 820071.
- [60] YANG S J, WU S D, DAI W L, et al. Tetramethylpyrazine: A review of its antitumor potential and mechanisms[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 764331.
- [61] REN J, CAI J P, WANG C F. Tetramethylpyrazine inhibits the proliferation, invasiveness and migration of cervical cancer C33A cells by retarding the Hedgehog signaling pathway[J]. *Oncology Letters*, 2022, 23(2): 66.
- [62] HU S, WANG S, HE J, et al. Tetramethylpyrazine alleviates endoplasmic reticulum stress-activated apoptosis and related inflammation in chondrocytes[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 25(1): 12.