

# 几种物质对亚硝酸盐清除作用的比较

艾对元<sup>1</sup>,张卫兵<sup>1</sup>,冯丽丹<sup>1</sup>,齐燕姣<sup>2</sup>,负建民<sup>1</sup>,毕阳<sup>1</sup>,郑惇元<sup>1</sup>

(1.甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070;2.西北民族大学化工学院,甘肃兰州 730030)

**摘要:**采用对氨基苯磺酸-盐酸萘乙二胺分光光度法测定了抗坏血酸( $V_c$ )、儿茶酚、葡萄糖、牛血清白蛋白4种物质对亚硝酸盐的清除率。在单因素实验基础上,确定了上述几种化合物清除亚硝酸盐的影响因素(清除剂浓度,作用时间,反应温度及反应液pH)。然后采用均匀实验设计,考察在不同处理方式下它们对亚硝酸盐的清除率。结果表明, $V_c$ 浓度0.7%、反应时间为15min、pH4、温度为4℃时,对亚硝酸盐清除效果最好;儿茶酚浓度为1%、反应时间为40min、pH2、反应温度为20℃时,其对亚硝酸盐清除效果最好;而葡萄糖、牛血清白蛋白对亚硝酸盐的清除率不到10%,没有显著的清除效果。

**关键词:**亚硝酸盐清除,抗坏血酸,儿茶酚,葡萄糖,牛血清白蛋白

## Comparisons of nitrite scavenging from several substances

AI Dui-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Wei-bing<sup>1</sup>, FENG Li-dan<sup>1</sup>, QI Yan-jiao<sup>2</sup>,  
YUN Jian-ming<sup>1</sup>, BI Yang<sup>1</sup>, ZHENG Dun-yuan<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Gansu Agriculture University, Lanzhou, 730070, china;

2.Department of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, 730030, China.)

**Abstract:** The scavenging capability of several substances such as ascorbic acid, catechol, glucose and Bovine serum albumin (BSA) on nitrite was studied by aniline-sulfonic and hydrochloride acid-napHthylamine ethylenediamine measuring through spectrophotometry. Based on the single factor experiment that explored the common effect on the scavenging rate of nitrite, a uniform design test were designed to identify the best conditions for these substances to nitrite scavenging. The results showed that the nitrite scavenging effect reached upmost while ascorbic concentration 0.7%, reaction time 15min, pH4 and temperature 4℃, respectively; Meantime, for catechol, its best scavenging rate occurred while same circumstance was 1%, 40min, pH2, 20℃ respectively. Besides, our experiment data testified that glucose and BSA performed less than 10% nitrite scavenging. They had not a significant scavenging effect on nitrition.

**Key words:** nitrite scavenging; ascorbic acid; catechol; glucose; Bovine serum albumin

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)23-0118-04

亚硝酸盐结晶为白色粉末,易溶于水。硝酸盐和亚硝酸盐在食品加工过程中主要用作发色剂、防腐剂及肉制品增香剂<sup>[1]</sup>。但亚硝酸盐具有较强的毒性,过量添加对人体有害<sup>[2]</sup>。同时其次生产物N-亚硝胺是一种致癌性很强的化合物<sup>[3]</sup>。因此,阻断亚硝胺合成<sup>[4]</sup>或消除亚硝胺的前体物质<sup>[5]</sup>是防治癌病产生的有效途径之一。目前有很多清除食品中亚硝酸盐的相关研究,最常采用的是果<sup>[6-7]</sup>、蔬品种<sup>[8]</sup>,其含有的 $V_c$ 、茶多酚、黄酮类、色素和有机硫化物等物质能有效地阻断亚硝胺类化合物的合成<sup>[9]</sup>。我们从文献中筛选出抗坏血酸( $V_c$ )、儿茶酚、葡萄糖、牛血清白蛋白(BSA)等若干具还原性的可食性化合物,采用对氨基苯磺酸-盐酸萘乙二胺分光光度法,考察其

对亚硝酸盐的清除能力。 $V_c$ 是公认的能够彻底清除亚硝酸盐的物质,它能还原亚硝酸盐<sup>[10]</sup>;儿茶酚多数以衍生物的形式存在于自然界中<sup>[11]</sup>。水果及蔬菜中通常存在的有机酚,是植物鞣质的成分,在体内可氧化成醌,因此它具有极强的抗氧化性;BSA结构中包含17个二硫键和一个巯基<sup>[12]</sup>,因此可与多种阳离子,阴离子和小分子结合<sup>[13]</sup>;D-葡萄糖是自然界广为存在的一种还原性己醛糖。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

0.4%对氨基苯磺酸溶液、0.2%盐酸萘乙二胺溶液、 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硝酸钠标准溶液、 $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硝酸钠标准使用液、 $0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH3.6~pH5.8)、 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸均为天津市光复科技发展有限公司所生产的“南开牌”分析纯药品。

UV-2450紫外可见分光光度计 SHIMAD-ZU, 日本岛津;WZ-100S数显恒温水浴锅 上海一科仪器设备有限公司;电子天平XB1200C 上海精密仪

收稿日期:2013-04-22

作者简介:艾对元(1970-),男,博士,讲师,研究方向:食品科学及发酵工程。

基金项目:兰州市科技创新人才团队培育计划项目(2011-1-144);甘肃省自然科学基金(1308RJZA243)。

器仪表有限公司;组织捣碎机 DS-1 金坛市万华实验仪器厂; pHs-3C 型酸度计 北京华瑞博远; FRESCO17 型离心机 Thermo, 赛默飞世尔中国; 恒温干燥箱 101-2 上海实验仪器厂等。

## 1.2 标准曲线

参照张婕莉等方法<sup>[14]</sup>, 测得亚硝酸钠最大吸收波长为 540nm。在此波长处亚硝酸盐浓度与吸光度值成良好的线性关系, 实际测得线性回归方程  $Y = 0.132X + 0.0092$ , 决定系数  $R^2 = 0.9976$ 。

$Y = 540\text{nm}$  下的吸光值;  $X =$  亚硝酸盐标准使用液用量

## 1.3 亚硝酸盐的清除率测定

以樊明涛<sup>[15]</sup>的对氨基苯磺酸-盐酸萘乙二胺分光光度法为准, 计算样液对亚硝酸盐的清除率公式如下:

$$R(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

$R$ : 清除率(%);  $A_1$ : 未加样液亚硝酸钠的吸光度;  $A_2$ : 加提取液后亚硝酸钠的吸光度(已减去清除物质的吸收度)。

## 1.4 实验设计

单因素实验时, 先考虑四种清除物质的浓度, 设定  $V_c$  的变动范围为 0.01%~1%; 其它三种的范围均定为 0.01%~5%, 与亚硝酸盐作用 60min 后, 观察清除效果。然后以各自最佳浓度为定值, 变动反应时间, 得出最适清除时间。以上反应均是在室温(20℃), 自然 pH 条件下进行; 均匀实验设计采用 4 因素 5 水平即  $U_5(5^4)$  均匀表头(表 1), 在单因素得到的最适因素水平附近, 共进行 5 组 10 次实验(表 2), 然后根据实验结果通过 SPSS16.0 (Release16.0.0 (Sep, 13, 2007). copyright (c). SPSS-IBM.inc., 1989-2007) 进行数学分析。

表 1 抗坏血酸  $U_5(5^4)$  均匀实验因素水平表

Table 1 The uniform design  $U_5(5^4)$  of  $V_c$

水平	因素			
	A 浓度 (g/100mL)	B 时间 (min)	C pH	D 温度 (℃)
1	0.05	5	2	4
2	0.1	10	4	14
3	0.5	15	6	20
4	0.7	20	7	37
5	1	30	8	50

表 2 儿茶酚  $U_5(5^4)$  均匀实验因素水平表

Table 2 The uniform design  $U_5(5^4)$  of catechol

水平	因素			
	A 浓度 (g/100mL)	B 时间 (min)	C pH	D 温度 (℃)
1	0.5	10	2	4
2	1	20	4	14
3	2	30	6	20
4	3	40	7	37
5	5	60	8	50

## 2 结果与分析

### 2.1 反应物浓度单因素实验

结果显示(图 1、图 2), 四种反应物浓度对亚硝酸盐清除率均有一定的影响。随着反应浓度的增大,  $V_c$  对亚硝酸盐的清除率也相应增加。当其浓度为 0.5%~1% 时, 清除率趋于平缓, 稳定在 95% 左右, 浓度 1% 时清除率最大; 儿茶酚对亚硝酸盐的清除率随其浓度呈线性增长, 达到 5% 时清除率最大, 接近 60%; 葡萄糖对亚硝酸盐的清除率成跳跃状改变, 在浓度为 5% 时达到峰值, 为 8.32%; 牛血清白蛋白对亚硝酸盐的清除率随其反应浓度呈 S 形变化。当反应物浓度为 0.5% 时清除率达到 9%, 随后出现下降。因此, 葡萄糖和 BSA 对亚硝酸盐的清除能力均小于 10%, 清除效果不理想。

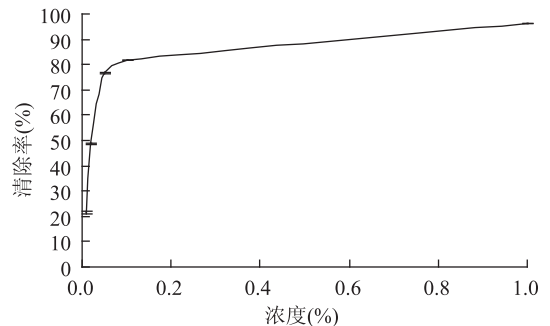


图 1 不同浓度  $V_c$  对亚硝酸盐的清除作用

Fig.1 Effect of the different concentration of on the scavenging of nitrite

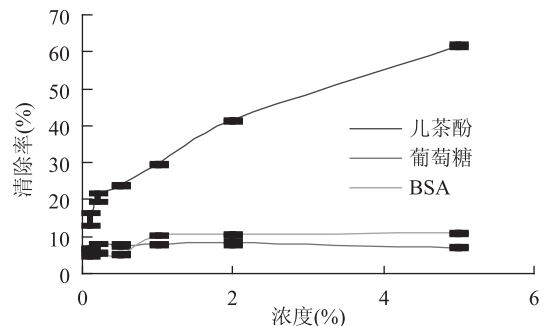


图 2 儿茶酚、葡萄糖、BSA 不同浓度对亚硝酸盐的清除作用

Fig.2 Effect of the 3 substances concentration on the scavenging of nitrite

### 2.2 反应时间单因素实验

在起始阶段, 随着反应时间的延长, 这四种物质对亚硝酸盐的清除率均逐渐增大。  $V_c$  于 60min 时清除率最大, 为 81.94%, 随后稳定在 80% 左右(图 3); 儿茶酚于 60min 时清除率最大, 为 41.59%, 随后出现下降; 葡萄糖于 120min 时清除率最大, 为 7.90%; 但是时间对 BSA 的清除率影响不大, 当 60min 时其清除率达到峰值 5.55%, 随后稳定在 5% 左右。

对在不同反应液浓度、反应时间下葡萄糖、牛血清白蛋白对亚硝酸盐的清除率在 0.01 的显著性水平下用 SPSS16.0 做独立样本 T-检验(表 3)。可以看出, 葡萄糖和 BSA 对亚硝酸盐清除率的平均值分别

表3 独立样本 T-检验统计表  
Table 3 Independent sample T-test results

实验	数目	均值	标准差	T-值	t-值	显著性	差值
葡萄糖	35	0.0578	0.0181	0.1	-13.79	1.74E-15**	-0.0422
牛血清白蛋白	35	0.0685	0.0320	0.1	-5.81	1.51E-06**	-0.0315

注：\* 表示该项因素对指标的影响显著；\*\* 表示该项因素对指标的影响极显著，表6同。

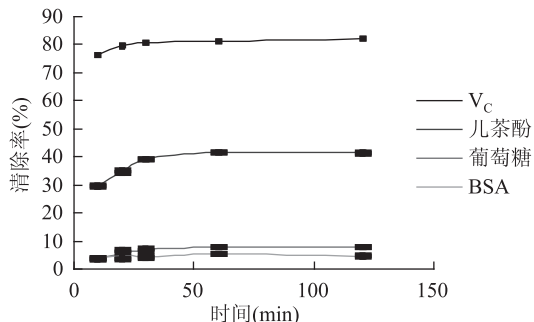


图3 四种物质不同时间对亚硝酸盐的清除作用  
Fig.3 Effect of the 4 substances reaction time on the scavenging of nitrite

为 0.0578 (5.78%) , 0.0685 (6.85%) 。根据单样本 t 检验, 设置检验值为 0.1 (10% 的清除率) 时, 它们的 T 检验值的伴随概率均都极显著的小于 0.01, 即它们的清除率期望值都不到 10%, 因此可以认为它们对亚硝酸盐无显著的清除能力。

### 2.3 均匀实验

因为葡萄糖和 BSA 对亚硝酸盐无显著的清除能力, 所以以反应液浓度 (A), 反应时间 (B), 反应 pH (C), 反应温度 (D) 4 个不同因素, 根据均匀实验要求, 结合单因素实验结果, 通过  $U_5(5^4)$  均匀表确定  $V_c$ 、儿茶酚实验方案, 得到实验结果 (表 4、表 5) 及回归方程 (表 6、表 7)。

表4  $V_c U_5(5^4)$  均匀实验结果

Table 4  $U_5(5^4)$  uniform experiment results of  $V_c$

实验号	A	B	C	D	清除率 (%)
1	1	2	3	4	68.72
2	2	4	1	3	86.86
3	3	1	4	2	98.36
4	4	3	2	1	99.45
5	5	5	5	5	99.25

表5 儿茶酚  $U_5(5^4)$  均匀实验结果

Table 5  $U_5(5^4)$  uniform experiment results of catechol

实验号	A	B	C	D	清除率 (%)
1	1	2	3	4	33.47
2	2	4	1	3	93.38
3	3	1	4	2	39.23
4	4	3	2	1	78.10
5	5	5	5	5	72.44

实验结果通过 SPSS16 分析, 确定均匀实验当中抗坏血酸对亚硝酸盐清除率的线性回归方程为:  $Y = -0.0815 - 1.0470X_1 + 0.0625X_2 + 0.2532X_3 - 0.0356X_4$ , 方程的决定系数  $R^2 = 0.9984$ , 方程的总体显著性  $p =$

$3.60 \times 10^{-7}$ , 说明此方程线性拟合很好, 具有极显著意义 (表 6); 儿茶酚对亚硝酸盐清除率的线性回归方程为:  $Y = 0.3991 - 0.0784X_1 + 0.0204X_2 - 0.0113X_4$ , 此方程  $R^2 = 0.9985$ ,  $p = 7.49E-09$ , 线性拟合很好, 且具有极显著意义 (表 7)。从以上 2 个均匀实验线性模拟来看,  $X_1$  即清除剂浓度对清除率影响极显著, 当然浓度值有一定限度, 所以其系数是负值;  $X_2$  即反应时间, 它与清除率呈正相关, 时间越长, 清除作用越彻底;  $X_3$  即 pH, 对  $V_c$  的影响极显著, 因为当溶液变成碱性时,  $V_c$  的结构将被破坏, 只有在酸性条件下, 其清除作用才最有效<sup>[16]</sup>。但 pH 对儿茶酚却没有显著影响; 最后是  $X_4$  即反应温度, 其系数是负值, 表明低温有利于清除作用。因此, 调整清除剂浓度, 延长反应时间, 控制反应液的 pH, 降低反应温度等条件, 是提高亚硝酸盐清除率的重要手段。通过模型计算, 当  $V_c$  浓度  $< 0.7\%$ , 反应时间  $> 15\text{min}$ ,  $4 < \text{pH} < 8$ , 温度  $< 4^\circ\text{C}$  时, 清除率  $> = 100\%$ , 这点不难从  $V_c$  均匀实验结果第四项得到验证, 实际清除率达到 99.45; 同理, 对于儿茶酚, 利用该线性模型预测, 其浓度  $< 1\%$ , 反应时间  $> 40\text{min}$ , 温度  $< 15^\circ\text{C}$  时, 清除率  $> = 100\%$ 。而儿茶酚均匀实验结果第 2 项显示实际清除率为 93.38%。因此, 这二种模型都是比较理想的, 可以作为  $V_c$ 、儿茶酚清除亚硝酸盐的数学表达。

表6  $V_c$  的回归方程方差分析

Table 6 Multiple linear regression analysis of  $V_c$

因素	系数	标准误差	t 值	显著性
截距	-0.0815	0.0503	-1.6201	0.1661
$X_1$ 浓度	-1.0470	7.2538	-14.4332	2.88E-05**
$X_2$ 时间	0.0625	0.0033	18.7441	7.96E-06**
$X_3$ pH	0.2532	0.0138	18.3335	8.88E-06**
$X_4$ 温度	-0.0356	0.0018	-20.3241	5.33E-06**

表7 儿茶酚的回归方程方差分析

Table 7 Multiple linear regression analysis of catechol

因素	系数	标准误差	t 值	显著性
截距	0.3991	0.0083	48.2170	5.34E-09**
$X_1$ 浓度	-0.0783	0.3166	-24.7596	2.86E-07**
$X_2$ 时间	0.0204	0.0003	60.3181	1.40E-09**
$X_4$ 温度	-0.0113	0.0003	-40.7886	1.45E-08**

注: \* 表示该项系数在方程中有显著意义; \*\* 表示该项系数在方程中有极显著意义 pH ( $X_3$ ) 由于不显著, 被儿茶酚的回归方程排除。

## 3 讨论与结论

### 3.1 讨论

根据现有的研究结果, 表明亚硝酸盐的清除主



要有两种方式,一种是酶降解途径,另一种是非酶降解途径<sup>[17]</sup>。酶降解途径可以通过细菌的亚硝酸盐还原酶将其还原成 NO, NH<sub>3</sub>。另外就是被机体的一些黄嘌呤氧化还原酶(Xanthine oxidoreductase),亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase),NO合成酶(NO synthase(NOS))等还原成 NO<sup>[18]</sup>。而 NO 可以促进血管扩张及血液循环,业已被证明是一种存在于动植物中的信号分子,而且被应用于医疗药物中。非酶降解途径是通过一些强还原性物质如 V<sub>c</sub>、黄酮类<sup>[19]</sup>及杂环类等物质,将其还原成 NO, N<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> 等物质<sup>[20]</sup>,从而降解亚硝酸盐。从实验结果来看, V<sub>c</sub>、儿茶酚对亚硝酸盐的清除效果分别达到 99.45%, 93.38%;理论预测它们可以彻底地清除亚硝酸盐。因为这两种物质都属于强还原剂。儿茶酚是邻苯二酚,属于多羟基酚;而 V<sub>c</sub> 化学官能团里含有 -NH<sub>2</sub>, -OH 及还原性羰基及酚基,所以他们可以通过非酶方式清除亚硝酸盐,而且它们的清除作用与时间正相关,这更加说明非酶反应随时间而逐步完成<sup>[21]</sup>。同时, V<sub>c</sub>、儿茶酚是大多数氧自由基的清除剂,因而能阻断亚硝酸胺的合成。而葡萄糖和 BSA 对亚硝酸盐的清除率最高只有 8.32%、10.93%(单因素实验中出现的最大值,未做算数平均),葡萄糖存在于日常饮食及机体内,而 BSA 类似于人的免疫球蛋白,它们均不能还原亚硝酸盐。因此,只有一些高还原性的生物活性物质如黄酮类、多糖、色素等<sup>[22]</sup>,才能有效清除亚硝酸盐。

### 3.2 结论

从反应液浓度、反应时间等条件看来,葡萄糖、牛血清白蛋白这两种物质,对亚硝酸盐的清除能力作用不明显,均显著低于 10%。均匀实验结果表明,抗坏血酸的浓度为 0.7%、反应时间 15min、反应 pH4、反应温度 4℃ 时,对亚硝酸盐的清除率最大,达到 99.45%;儿茶酚的反应浓度为 1%、反应时间 40min、反应 pH2、反应温度 20℃ 时,其对亚硝酸盐的清除率最大,达到 93.38%。通过均匀实验得到的线性模型表明, V<sub>c</sub>、儿茶酚都可以彻底清除亚硝酸盐。

### 参考文献

[1] 南庆贤. 肉类工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 205-210.  
 [2] Fennema O R. Food Chemistry(2nd edition)[M]. Revised and Expanded, 1985: 645-646.  
 [3] 曹会兰. 亚硝酸盐对人体的危害和预防[J]. 微量元素与健康研究, 2003, (2): 78-80.  
 [4] Jakszyn P, Gonzalez C A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence [J]. World journal of gastroenterology, 2006, 12(27): 4296-4303.  
 [5] 卢志强, 姜红祥. 植物活性成分与癌症的化学预防[J]. 中草药, 2002, 33(6): 563-566.  
 [6] Jung-Hye S, Jun-Yeal L, Jong-Chan J, et al. Chemical Properties and Nitrite Scavenging Ability of Citron(Citrus junos

[J] Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2005, 34(4): 496-502.  
 [7] 艾对元, 冯丽丹, 齐燕姣, 等. 柠檬对亚硝酸盐清除作用的研究[J]. 中国食品工业, 2013, (2): 52-55.  
 [8] 冯丽丹, 李捷, 艾对元. 几种常见果蔬对亚硝酸盐清除能力的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(2): 139-142.  
 [9] Choi S Y, Chung M J, Lee S J, et al. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic[J]. Food Control, 2007, 18(5): 485-491.  
 [10] 薛丽, 蓝红英. V<sub>c</sub> 对降低香肠亚硝酸钠残留量的研究[J]. 食品科技, 2006, (6): 65-66.  
 [11] Seung-Cheol L, So-Young K, Seok-Moon J, et al. Effect of Far-Infrared Irradiation on Catechins and Nitrite Scavenging Activity of Green Tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, 54(2): 399-403.  
 [12] Bushra H M, Munaf H Z, Ihab I A, et al. Free radical scavenging activity of silibinin in nitrite-induced hemoglobin oxidation and membrane fragility models [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2011, 19(3): 177-183.  
 [13] Pietraforte D, Salzano A M, Scorza G, et al. Scavenging of reactive nitrogen species by oxygenated hemoglobin: globin radicals and nitrotyrosines distinguish nitrite from nitric oxide reaction[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2004, 37(8): 1244-1255.  
 [14] 张捷莉, 丁博, 刘志强, 等. 几种肉制品中亚硝酸盐含量的测定[J]. 食品科技, 2006(9): 242-224.  
 [15] 樊明涛. 食品分析与检验[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1998: 204-207.  
 [16] Takahama U, Hirota S, Kawagishi S. Effects of pH on nitrite-induced formation of reactive nitrogen oxide species and their scavenging by phenolic antioxidants in human oral cavity[J]. Free Radical Research, 2009, 43(3): 250-261.  
 [17] Ivanov V M. The 125th Anniversary of the Griess Reagent [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2004, 59(10): 1002-1005.  
 [18] Kazuyasu S, Kazuki K, Hitoshi A, et al. Luteolin: A Strong Antimutagen against Dietary Carcinogen, Trp-p-2 in Peppermint, Sage, and Thyme[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(2): 410-414  
 [19] Jun L, Songyi L, Zuozhao W. et al. Supercritical fluid extraction of flavonoids from Maydis stigma and its nitrite-scavenging ability[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(4): 333-339.  
 [20] Feelisch M, Fernandez B, Bryan N, et al. Tissue processing of nitrite in hypoxia: an intricate interplay of nitric oxide-generating and-scavenging systems [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(49): 33927-33934.  
 [21] Jae S C, Si H P, Jin-Ho C. Nitrite scavenging effect by flavonoids and its structure-effect relationship [J] Archives of pharmacal Research, 1989, 12(1): 26-33.  
 [22] Jin-Hyun K, Ki-Moon P. Nitrite scavenging and superoxide dismutase-like activities of herbs, spices and curries[J]. Korean journal of food science and technology, 2000, 32(3): 706-712.