

反应条件对沙棘果提取物降解亚硝酸盐效果的影响

彭潇,陈义伦*

(山东农业大学 食品科学与工程学院 山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室,山东 泰安 271018)

摘要:以沙棘果为原料,采用溶剂提取法制取沙棘果提取物,研究添加量、反应温度、反应时间和反应 pH 值对沙棘果提取物降解亚硝酸盐效果的影响,优化了沙棘果提取物降解亚硝酸盐的反应条件。结果表明:影响沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的主要因素是反应 pH 值,其次是反应温度和添加量,反应温度和 pH 值之间的交互作用对亚硝酸盐降解率影响显著。在提取物添加量 6 mL,反应温度 50 ℃,反应时间 20 min,pH 2 的反应条件下,沙棘果提取物亚硝酸盐降解率达到 96.10 %。

关键词:沙棘;亚硝酸盐;降解;反应条件;响应面法

Effects of Reaction Conditions on Nitrite Degradation by Sea Buckthorn Fruit Extracts

PENG Xiao, CHEN Yi-lun*

(Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control in Shandong Province, College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong, China)

Abstract: Sea buckthorn fruit was used as raw material, and its extract was obtained by the method of solvent extraction. The effects of additive amount, reaction temperature, reaction time and pH value of the extract on nitrite degradation were investigated. The reaction conditions of sea buckthorn fruit extracts on nitrite degradation were optimized. The results showed that the main influencing factor on nitrite degradation was pH value, followed by reaction temperature and additive amount. In addition, the interaction between reaction temperature and pH value had a significant effect on nitrite degradation rate. When the additive amount was 6 mL, the reaction temperature was 50 ℃, the reaction time was 20 min, pH value was 2, the degradation rate of nitrite by sea buckthorn fruit extracts was up to 96.10 %.

Key words: sea buckthorn; nitrite; degradation; reaction conditions; response surface methodology

基金项目:山东省(农业)重大应用技术创新项目(2130106);山东省“双一流”奖补资金资助(SYT2017XTTD04)

作者简介:彭潇(1994—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品质量与安全。

*通信作者:陈义伦(1966—),男(汉),教授,博士,研究方向:果蔬深加工与食品安全。

digestion,intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2015, 169:320-326

[10] Lv H P,Zhang Y,Shi J,et al. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies[J]. Food Research International,2017,100(Pt 3):486-493

[11] Wu Z,Teng J,Huang L,et al. Stability,antioxidant activity and *in vitro* bile acid-binding of green,black and dark tea polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Rsc Advances, 2015,112(5):92089-92095

[12] 高玉萍,唐德松,龚淑英. 茶提取物抗氧化活性与茶多酚、儿茶素关系探究[J]. 中国食品学报,2013,13(6):40-47

收稿日期:2018-09-27

引文格式:

彭潇,陈义伦.反应条件对沙棘果提取物降解亚硝酸盐效果的影响[J].食品研究与开发,2019,40(8):70-74

PENG Xiao, CHEN Yilun. Effects of Reaction Conditions on Nitrite Degradation by Sea Buckthorn Fruit Extracts [J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 70-74

亚硝酸盐进入人体后,会将血红蛋白转变成高铁血红蛋白^[1];产生的亚硝基化合物可生成强致癌物亚硝胺^[2]。人体每天摄入亚硝酸盐 0~20 mg,主要来源于蔬菜和肉制品^[3]。降低食物和人体内亚硝酸盐的含量可预防其对人体健康的潜在危害。研究表明,维生素 C、多酚^[4]、黄酮^[5-6]、有机酸、皂苷等天然抗氧化物质及富含抗氧化活性成分的植物提取物^[7-11],可与亚硝酸盐发生氧化还原反应来降低食品中亚硝酸盐的含量^[12-13],达到有效降解亚硝酸盐的效果。

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是药食同源植物,具有抗炎、清除自由基、提高免疫功能和抗肿瘤等药理作用^[14]。沙棘不仅有多种维生素、微量元素和氨基酸等营养成分,同时富含黄酮、多糖、有机酸、原花青素等抗氧化性强的活性物质^[15-16]。其活性成分的还原性决定了沙棘具有清除亚硝酸盐的能力^[17]。

天然果蔬提取物降解食品中亚硝酸盐安全高效,沙棘具有良好降解亚硝酸盐的能力,影响沙棘果提取物降解亚硝酸盐的因素和反应条件尚不明确。本试验以沙棘果为原料,研究沙棘果降解亚硝酸盐的作用条件,探讨影响其降解效果的主要因素,以期为开发和应用高效降解亚硝酸盐的天然抗氧化物质提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘干果:泰安市金泰联药店;亚硝酸钠、盐酸、无水对氨基苯磺酸、无水乙醇(以上均为分析纯);天津市凯通化学试剂有限公司;N-(1-萘基)乙二胺盐酸盐(分析纯):天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

T6 新世纪紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;FA2104A 电子天平:上海精天电子仪器有限公司;BL25B31 搅拌机:美的集团;高速多功能粉碎机:永康市博欧五金制品有限公司;Sartorius 普及型 pH 计:赛多利斯科学仪器有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅:常州国华电器有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 沙棘果提取物的制备

将沙棘干果用粉碎机粉碎,过 40 目筛,置干燥器

中备用。准确称取 10.00 g 沙棘果干粉于锥形瓶中,按料液比 1:20 (g/mL) 加入体积分数为 50% 的乙醇溶液,打浆,于 70 °C 水浴锅中水浴 40 min,取出冷却至室温,抽滤,定容至 250 mL 容量瓶中,备用。1 mL 该提取液中含有 40 mg 样品粉末溶出物质。

1.3.2 反应条件对沙棘果提取物降解亚硝酸盐效果的影响

1.3.2.1 沙棘果提取物添加量对亚硝酸盐降解率的影响

在 25 mL 的具塞比色管中各加入 1、2、3、4、5、6、7 mL 的沙棘果提取物溶液,分别加入 1 mL 25.0 μg/mL 的亚硝酸盐溶液,在 pH 值为 2, 25 °C 水浴条件下反应 10 min。每组做 3 次平行试验,比较沙棘果提取物添加量对亚硝酸盐降解率的影响。

1.3.2.2 反应时间对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

取 25 mL 具塞比色管分别做标记,各加入 5 mL 沙棘果提取物溶液,加入 1 mL 25.0 μg/mL 的亚硝酸盐溶液,在 pH 值为 2, 25 °C 水浴条件下分别反应 10、20、30、40、50、60 min。每组做 3 次平行试验,比较反应时间对亚硝酸盐降解率的影响。

1.3.2.3 反应温度对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

取 5 mL 沙棘果提取物溶液置于 25 mL 具塞比色管中,将比色管分别置于 20、30、40、50、60 °C 的水浴锅中加热,各加入 1 mL 25.0 μg/mL 的亚硝酸盐溶液并混匀,在 pH 值为 2 条件下反应 10 min。每组做 3 次平行试验,比较反应温度对亚硝酸盐降解率的影响。

1.3.2.4 pH 值对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

取 5 mL 沙棘果提取物溶液置于 25 mL 具塞比色管中,各加入 1 mL 25.0 μg/mL 的亚硝酸盐溶液并混匀,在 pH 值分别为 2、3、4、5、6 条件下,25 °C 水浴反应 10 min。每组做 3 次平行试验,比较 pH 值对亚硝酸盐降解率的影响。

1.3.3 沙棘果降解亚硝酸盐反应条件优化

在单因素试验的基础上,固定反应时间为 20 min,选取沙棘果提取物添加量(A)、反应温度(B)、pH 值(C)进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计,以亚硝酸盐降解率为响应值,进行沙棘果提取物降解亚

硝酸盐反应条件的优化。试验的因素水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平
Table 1 Levels of Box-Behnken design

水平	A 添加量/mL	B 反应温度/°C	C pH 值
-1	4	30	2
0	5	40	3
1	6	50	4

1.4 分析测定方法

1.4.1 亚硝酸盐标准曲线的绘制

参照 GB 5009.33-2016《食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》，准确吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的 5.0 μg/mL 亚硝酸盐标准使用液，置于 25 mL 的具塞比色管中。分别加入 2 mL 浓度为 4 g/L 的对氨基苯磺酸溶液，混匀，静置 5 min，再加入 1 mL 浓度为 2 g/L 的盐酸萘乙二胺溶液，加水至刻度，混匀，静置 15 min。用 1 cm 比色杯，以零管调节零点，于波长 538 nm 处测定吸光度。以吸光度 y 为纵坐标，亚硝酸盐浓度 x (μg/mL) 为横坐标，绘制标准曲线。得到吸光度 y 与亚硝酸盐浓度 x (μg/mL) 的标准曲线方程为： $y=0.6769x+0.0072$ ， $R^2=0.9993$ ，线性关系良好。

1.4.2 沙棘果提取物降解亚硝酸盐效果的测定

取一定量的沙棘果提取物于 25 mL 具塞比色管中，与 25.0 μg/mL 亚硝酸钠溶液反应一定时间，加入 2 mL 浓度为 4 g/L 的对氨基苯磺酸溶液，混匀，静置 5 min 后加入 1 mL 浓度为 2 g/L 的盐酸萘乙二胺溶液，加水至刻度，混匀，静置 15 min。用 1 cm 比色杯，于波长 538 nm 处测定反应前后亚硝酸盐溶液的吸光度，按照下式计算亚硝酸盐降解率^[5]。

$$\text{降解率}/\% = \frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1} \times 100$$

式中： A_1 为未添加提取物时亚硝酸盐的吸光度值； A_2 为添加提取物之后反应液的吸光度值； A_0 为提取物本底吸光度值。

1.5 数据处理

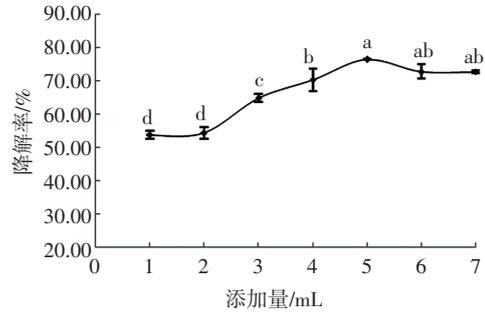
采用 Excel 2007、SPSS 22.0、Design Expert 8.0 软件对数据进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 沙棘果提取物添加量对亚硝酸盐降解率的影响

添加量对亚硝酸盐降解率的影响见图 1。

由图 1 可知，当沙棘果提取物添加量在 1 mL~5 mL 范围时，亚硝酸盐降解率增加显著。添加量为 5 mL 时，降解率达到最大值 76.41%。此后增大添加量，降解率



不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著差异。

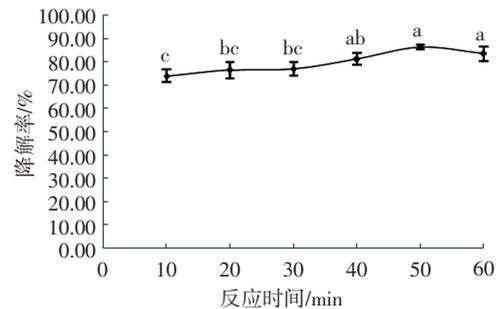
图 1 添加量对亚硝酸盐降解率的影响

Fig.1 Effects of additive amount on nitrite degradation rate

降低并趋于平稳。沙棘果提取物添加量对降解亚硝酸盐的影响显著，可以通过适当增加添加量的方式来提高其对亚硝酸盐的降解效果。

2.2 反应时间对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

反应时间对亚硝酸盐降解率的影响见图 2。



不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著差异。

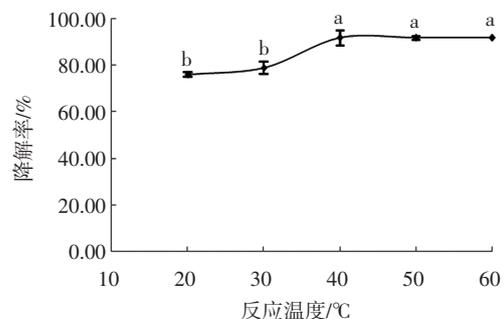
图 2 反应时间对亚硝酸盐降解率的影响

Fig.2 Effects of reaction time on nitrite degradation rate

由图 2 所示，反应时间对亚硝酸盐降解率的影响较小。沙棘果提取物与亚硝酸盐在反应 10 min 时，降解率已超过 70%，说明其在短时间内即可降解大部分亚硝酸盐，降解速度较快。反应时间在 20 min~40 min 内，降解率增加缓慢，亚硝酸盐降解为氧化还原反应，反应 20 min 可达到高效降解的效果。

2.3 反应温度对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

反应温度对亚硝酸盐降解率的影响见图 3。



不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著差异。

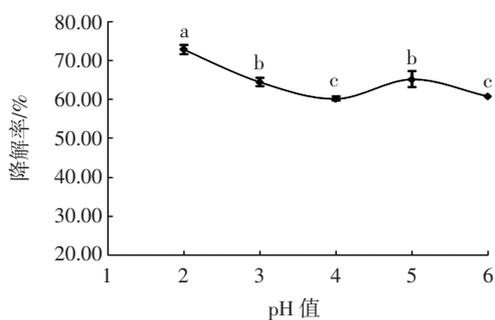
图 3 反应温度对亚硝酸盐降解率的影响

Fig.3 Effects of reaction temperature on nitrite degradation rate

由图3可以看出,随着反应温度升高,沙棘果提取物降解亚硝酸盐的能力逐渐增大,反应温度显著影响沙棘果提取物降解亚硝酸盐的效果。当温度从30℃上升至40℃时,降解率增加明显,40℃时降解率即达到91.92%,较高反应温度下分子热运动加快,有效成分与亚硝酸盐作用更充分,从而提高降解率。温度过高可能影响活性成分的存在状态,综合考虑,选择反应温度为40℃。

2.4 pH值对沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的影响

pH值对亚硝酸盐降解率的影响见图4。



不同小写字母表示在0.05水平存在显著差异。

图4 pH值对亚硝酸盐降解率的影响

Fig.4 Effects of pH value on nitrite degradation rate

由图4可知,在pH值2~6的范围内,亚硝酸盐降解率总体随着pH值的增大而降低,pH值对亚硝酸盐降解率的影响显著。在pH值从2增加到4时,降解率下降较为明显,从72.95%迅速降低到60.26%。降低反应液pH值可以增大沙棘果提取物对亚硝酸盐的降解效果,酸性环境下可促进有效成分与亚硝酸根发生氧化还原反应从而降低亚硝酸盐含量^[18-19]。此外,pH值可能影响有效成分在溶液中的解离状态,或影响其稳定性,从而影响提取物降解亚硝酸盐的效果,需要选择适宜的酸度值。

2.5 沙棘果降解亚硝酸盐反应条件优化

2.5.1 响应面试验结果

根据单因素试验结果,固定反应时间为20min,选择添加量、反应温度和pH值进行三因素三水平的响应面试验,试验结果见表2。

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A 添加量 /mL	B 反应温度/℃	C pH 值	Y 降解率 /%
1	6	50	3	89.35
2	4	40	2	77.14
3	5	30	4	65.28
4	5	40	3	75.06
5	5	40	3	78.40
6	4	30	3	74.07

续表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Continue table 2 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A 添加量 /mL	B 反应温度/℃	C pH 值	Y 降解率 /%
7	5	30	2	84.18
8	5	40	3	76.25
9	5	40	3	76.68
10	5	40	3	78.17
11	5	50	4	80.62
12	5	50	2	91.63
13	4	50	3	81.38
14	6	30	3	77.14
15	6	40	2	90.10
16	6	40	4	76.18
17	4	40	4	70.44

2.5.2 回归模型拟合及方差分析

根据表2的试验结果,以亚硝酸盐的降解率为响应值(即因变量Y),确定回归方程的系数,对该回归方程进行方差分析,结果如表3所示。

表3 回归模型系数的显著性检验

Table 3 Regression equation coefficients and F test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P > F
模型	807.29	9	89.70	62.62	<0.000 1
A	47.39	1	47.39	33.08	0.000 7
B	223.77	1	223.77	156.22	<0.000 1
C	462.08	1	462.08	322.59	<0.000 1
AB	6.00	1	6.00	4.19	0.079 9
AC	2.33	1	2.33	1.62	0.243 3
BC	15.56	1	15.56	10.86	0.013 2
A ²	18.37	1	18.37	12.83	0.009 0
B ²	9.27	1	9.27	6.47	0.038 4
C ²	17.38	1	17.38	12.13	0.010 2
残差	10.03	7	1.43		
失拟项	2.31	3	0.77	0.40	0.762 0
纯误差	7.72	4	1.93		
总离差	817.31	16			

得到亚硝酸盐降解率与添加量、反应温度、pH值的二元多次回归方程如下:

$$Y = 76.91 + 2.43A + 5.29B - 7.60C + 1.23AB + 0.76AC + 1.97BC + 2.09A^2 + 1.48B^2 + 2.03C^2$$

由表3回归模型的方差分析结果可知,该模型的P<0.01,说明建立的二元多次回归方程模型极显著。失拟项P=0.762 0>0.05,显示模型失拟不显著,本模型可信度较高,误差较小,可以用该回归方程代替试验真实点进行分析。决定系数R²=0.987 7,说明该模型可以解释98.77%的试验,表明该模型拟合情况较好。校正决定系数R²(Adj)=0.972 0,说明该模型的预测性较好、操

作可靠。综合以上情况,表明该回归模型合理,可以用于对亚硝酸盐降解率的反应条件进行预测^[20]。

从表3中可以看出,一次项A、B、C和二次项 A^2 达到了极显著水平($P < 0.01$),交互作用项BC和二次项 B^2 、 C^2 达到了显著水平($P < 0.05$),其余各项影响均不显著($P > 0.05$)。说明添加量、反应温度、pH值、添加量的二次项、反应温度的二次项、pH值的二次项、反应温度和pH值之间的交互作用对亚硝酸盐降解率有显著影响($P < 0.05$)。通过比较各因素F值的大小,得到其对亚硝酸盐降解率的影响程度大小顺序为:pH值(C)>反应温度(B)>添加量(A)。

2.5.3 验证试验结果

利用 Design Expert 8.0 软件得出沙棘果提取物降解亚硝酸盐的优化反应条件为:沙棘果提取物添加量为6 mL,反应温度为50℃,反应时间20 min,pH值为2。按照此反应条件进行3次平行试验,得到亚硝酸盐的平均降解率为96.10%,接近理论预测值96.33%,说明优化结果可靠,此回归方程能够真实地反映筛选因素对亚硝酸盐降解率的影响,具有实用参考价值。

3 结论

试验结果表明,沙棘果提取物可高效降解亚硝酸盐,影响沙棘果提取物亚硝酸盐降解率的主要因素是pH值,其次是反应温度和添加量,反应温度和pH值之间的交互作用对亚硝酸盐降解率影响显著。优化得到的沙棘果提取物降解亚硝酸盐的反应条件为:添加量为6 mL,反应温度为50℃,反应时间为20 min,pH值为2。在此条件下,沙棘果提取物亚硝酸盐降解率为96.10%,与理论预测值基本一致。沙棘果中降解亚硝酸盐的主要成分、降解途径和机理及在食品中应用效果,需进一步研究明确。

参考文献:

- [1] CHAN T Y. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia[J]. *Toxicology Letters*, 2011,200: 107-108
- [2] EVELINE D M, KATRIJN D K, HANNELORE D M, et al. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation[J]. *Meat Science*, 2014,96(2): 821-828
- [3] AMR A, HADIDI N. Effect of cultivar and harvest date on nitrate

(NO₃⁻) and nitrite (NO₂⁻) content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001,14(1): 59-67

- [4] 陈铭中,钟旭美,司园园,等.响应面法优化水果酵素、茶多酚和维生素C对亚硝酸盐的消除作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017,8(6): 2232-2237
- [5] 李佩艳,韩四海,罗登林,等.牡丹叶黄酮的酶法提取条件优化及其对亚硝酸盐的清除作用[J]. *食品科学*, 2016,37(6): 77-81
- [6] 郝教敏,杨文平,李红玉,等.黑麦类黄酮最佳提取条件及清除亚硝酸盐能力研究[J]. *中国食品学报*, 2017,17(1): 126-133
- [7] 刘星,陈义伦,张小丹,等.提取条件对洋葱提取物清除亚硝酸盐效果的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2012,38(10): 189-193
- [8] 范瑞霞,仪慧兰.葡萄果皮提取物清除自由基、亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. *营养学报*, 2017(6): 583-587
- [9] 朱艳芳,杨杰,刘东华,等.黄秋葵花体外清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2014,40(11): 100-103
- [10] 盛玮,高翔,薛建平,等.黑糯米色素清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J]. *食品科学*, 2013,34(17): 92-95
- [11] KIM D B, SHIN G H, LEE Y J, et al. Assessment and comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of commonly consumed beverages in Korea[J]. *Food Chemistry*, 2014,151: 58-64
- [12] 宁正祥,张水华,高建华,等.一些果蔬对活性自由基和亚硝酸盐的消除作用[J]. *食品与发酵工业*, 1995(2): 31-35
- [13] 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
- [14] 刘锡建.沙棘果渣总黄酮的提取、精制和抗氧化性能的研究[D]. 北京:北京化工大学,2004: 1-5
- [15] 樊旭,周鸿立.沙棘黄酮的提取和抗氧化活性的研究进展[J]. *吉林化工学院学报*, 2017,34(11): 35-39
- [16] 张程慧,祁玉霞,程康蓉,等.沙棘的综合价值研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017,38(22): 331-335
- [17] 赵二劳,梁泽,张海容.沙棘叶对亚硝酸盐清除能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2006,27(3): 81-82
- [18] ISODA N, YOKOYAMA H, NOJIRI M, et al. Electroreduction of nitrite to nitrogen oxide by a copper-containing nitrite reductase model complex incorporated into collagen film [J]. *Bioelectrochemistry*, 2010,77(2): 82-88
- [19] 邹辉,刘晓英,陈义伦,等.泡菜(白菜)腌制过程中有机酸对亚硝酸盐含量的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2013,39(11): 29-32
- [20] 宋佳敏,王鸿飞,孙朦,等.响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. *食品科学*, 2018,39(4): 275-281

收稿日期:2018-09-18