

模拟体系中 5 种酚酸抑制亚硝化反应的研究

任顺成^{1*}, 牛保清¹, 赵文红¹, 谢东东¹, 朱晓艾¹, 王申丽¹, 刘泽龙²

(¹河南工业大学 河南省天然色素制备重点实验室 郑州 450001

²北京工商大学食品营养与健康学院 北京 100048)

摘要 以模拟胃液为体系,研究没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、香草酸和丁香酸对亚硝酸钠清除率和亚硝胺合成阻断率的影响,通过单因素(酚酸浓度、反应时间、pH)和正交试验来优化酚酸的作用条件。结果表明:在酚酸质量浓度 2.5,3.0 mg/mL,反应时间 90 min,pH 3.0,3.2 时,5 种酚酸对亚硝酸钠清除效果较好,清除率均大于 75%。其中,丁香酸的清除率最高达 97%,没食子酸次之(94%)。在酚酸质量浓度 3.0 mg/mL、反应时间 60 min、pH 值分别为 2.8,3.0,3.2 时,5 种酚酸阻断亚硝胺合成的能力较强,合成阻断率均大于 50%,其中丁香酸和没食子酸的阻断效果仍为最优,分别为 97%和 93%。本研究结果为酚酸更好地应用于肉制品加工提供参考。

关键词 亚硝酸盐;亚硝胺;酚酸;正交优化

文章编号 1009-7848(2023)03-0039-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.005

亚硝酸盐可用作抑菌剂,避免腐败和致病菌的生长,如肉毒梭状芽孢杆菌^[1-2]。亚硝酸盐一般也用作发色助剂,它可与肉制品中的肌红蛋白反应,生成粉红色亚硝基肌红蛋白^[3-4]。同时,亚硝酸盐能够延缓脂质氧化,赋予产品典型的腌肉风味^[5-7]。在低氧条件下,亚硝酸盐可以还原成 NO,然后生成一系列的氮氧化物,包括亚硝基硫醇、铁-亚硝基和强致癌物 N-亚硝胺,亚硝胺可以诱发各种器官的病变,使其朝肿瘤、癌症方向演变。因此,抑制酪氨酸酶,抗氧化,阻断亚硝胺合成,清除亚硝胺前体、亚硝酸盐等致癌因子可能是一种有效的癌症预防策略^[8-10]。

多酚是天然植物基化合物,是人类饮食中最丰富的抗氧化剂。根据碳骨架的概念,多酚可以分为:类黄酮、酚酸、木脂素和二苯乙烯。流行病学研究表明,适当摄入多酚,可以通过调节与炎症相关的细胞信号通路,从而减少患慢性疾病(高血压、肺癌、冠心病、糖尿病、肿瘤)的风险^[11-13]。多酚介导的机制还包括抗氧化,抗炎活性,酶调节,基因的表达和凋亡,缝隙连接通讯上调和 P-糖蛋白活化^[14-16]。在种类繁多的多酚中,研究人员发现其

还可以通过控制体重指数(BMI)和腰围(WC)来缓解肥胖症,预防老年痴呆(认知障碍)、抑郁障碍和炎症性肠病(IBD)。这使得越来越多科研人员把工作重心转向多酚^[17-25]。对膳食多酚的调查发现,人们将其视为外源物质,对其利用率偏低。在一些常见的水果、蔬菜中,酚酸约占三分之一,黄酮类化合物约占三分之二。黄酮类化合物(如儿茶素、表儿茶素、槲皮素和芦丁等)易获取,且在绿色植物中存在广泛,研究成果颇丰。酚酸大量存在于深色植物里,像黑莓、草莓、蔓越莓、浆果、洋葱、茶、芒果皮、葡萄柚、苦荞、红枣及橄榄油、菜籽油、芥子油等^[26-30]。酚酸主要分为羟基苯甲酸(C₆~C₁型)和羟基肉桂酸(C₆~C₃型)两大类^[31]。具体见表 1。

研究发现沙棘、苹果、石榴多酚在模拟胃液体体系下与亚硝酸盐反应后,多酚含量降低,亚硝酸盐被不同程度地清除,同时生成新的亚硝基化合物^[32-34]。目前,对多酚的研究主要集中在产品(枣、葡萄、茶等)方面^[35],鲜见针对单体酚酸在亚硝化方面的研究报道。本文选取 5 种具有不同羟基数目、不同分子量、水溶性的酚酸,如图 1 所示。在模拟体系中分析这 5 种自然界广泛存在的酚酸在单因素实验及正交试验条件下对亚硝酸钠的清除效果,以及对亚硝胺合成的阻断作用,以期为肉制品中酚酸的使用提供依据。

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801584)

第一作者: 任顺成,男,博士,教授

E-mail: scren@163.com

表1 酚酸分类

Table 1 Classification of phenolic acids	
分类	代表物质
羟基苯甲酸(C ₆ -C ₁ 型)	没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、龙胆酸
羟基肉桂酸(C ₆ -C ₃ 型)	咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、芥子酸、香豆酸
其它类	绿原酸、鞣花酸、丹酚酸、迷迭香酸

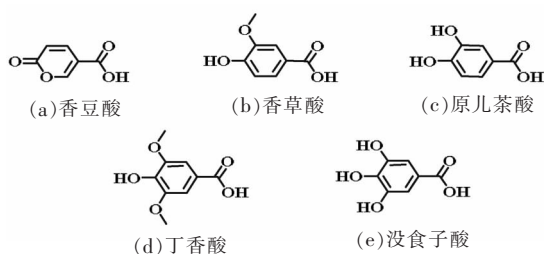


图1 5种酚酸的化学结构

Fig.1 Chemical structures of five kinds of phenolic acid

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

没食子酸(98%),南京龙源天然多酚合成厂;香豆酸(97%)、原儿茶酸(97%)、香草酸(98%)、丁香酸(98%),上海源叶生物科技有限公司;其余试剂,郑州新丰化验器材有限公司。

1.2 仪器与设备

ZF-90 暗箱式紫外透射仪,上海顾村电光仪器厂;KQ-300 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FA1004 电子分析天平,上海上平仪器有限公司;PHS-3C 雷磁酸度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;UV-1600B 紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;FXB101-1 电热鼓风干燥箱,上海树立仪器仪表有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅,金坛市华峰仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酚酸对亚硝酸钠的影响

1.3.1.1 酚酸浓度对亚硝酸钠清除率的影响 将没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、香草酸、丁香酸配成质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 的溶液。各取 5 mL 放入试管中,依次添加 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL 及 10 μg/mL 的亚硝酸钠标准溶液 5 mL,混匀。于

37 °C 反应 30 min,立即取出,加入 2 mL 4 mg/mL 对氨基苯磺酸溶液,静置 5 min,再加入 1 mL 2 mg/mL 盐酸萘乙二胺溶液,静置 15 min,于波长 540 nm 处测定吸光度。清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 ——不加酚酸组的吸光度; A_1 ——加入不同浓度酚酸组的样液吸光度; A_2 ——不加亚硝酸钠组的吸光度。

1.3.1.2 反应时间对亚硝酸钠清除率的影响 分别配制质量浓度为 2.5 mg/mL 的 5 种酚酸溶液,各取 5 mL 于试管中,依次添加 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL 及 10 μg/mL 亚硝酸钠标准溶液 5 mL,混匀。于 37 °C 反应 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min,按 1.3.1.1 节方法于波长 540 nm 处测定吸光度,计算清除率。

1.3.1.3 pH 值对亚硝酸钠清除率的影响 分别配制质量浓度为 2.5 mg/mL 的 5 种酚酸溶液,各取 5 mL 于试管中,依次添加 pH 值为 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL 及 10 μg/mL 亚硝酸钠标准溶液 5 mL,混匀,于 37 °C 反应 75 min,按 1.3.1.1 节方法于波长 540 nm 处测定吸光度,计算清除率。

1.3.1.4 酚酸清除亚硝酸钠的正交优化试验 根据单因素实验结果,以酚酸浓度(A)、反应时间(B)和 pH(C)为自变量,亚硝酸钠清除率为因变量,设计三因素三水平的正交试验。因素及水平设计见表 2。

表2 清除亚硝酸钠正交试验因素水平表

Table 2 Factor level of orthogonal test for removal of sodium nitrite

水平	因素		
	A(酚酸质量浓度)/	B(反应时间)/	C(pH)
	mg·mL ⁻¹	min	
1	2.0	60	3.0
2	2.5	75	3.2
3	3.0	90	3.4

1.3.2 酚酸对亚硝胺的影响

1.3.2.1 酚酸质量浓度对亚硝胺合成阻断率的影响 将没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、香草酸、丁香酸配成质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0,

2.5, 3.0 mg/mL 的溶液。各取 5 mL 于试管中, 依次添加 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL、1 mmol/L 二甲胺溶液 1 mL 及 1 mmol/L 亚硝酸钠标准溶液 1 mL, 混匀, 于 37 °C 反应 30 min, 取出, 倒入培养皿, 加入 5 mL 5 mg/mL 碳酸钠溶液, 于紫外透射仪下 (波长 254 nm 处) 照射 15 min。取 2 mL 反应液于试管中, 加入 2 mL 10 mg/mL 对氨基苯磺酸溶液后静置 5 min, 再加入 2 mL 1 mg/mL α -萘乙二胺溶液, 静置 15 min 后于 525 nm 处测定吸光度。阻断率计算公式:

$$\text{阻断率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 ——不加酚酸组的吸光度; A_1 ——加入不同浓度酚酸组的样液的吸光度; A_2 ——不加亚硝酸钠组的吸光度。

1.3.2.2 反应时间对亚硝胺阻断率的影响 分别配制质量浓度为 2.5 mg/mL 的 5 种酚酸溶液, 各取 5 mL 于试管中, 依次添加 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL、1 mmol/L 二甲胺溶液 1 mL 及 1 mmol/L 亚硝酸钠标准溶液 1 mL, 混匀, 于 37 °C 反应 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min, 依 1.3.2.1 节方法于 525 nm 处测定吸光度, 计算阻断率。

1.3.2.3 pH 对亚硝胺阻断率的影响 分别配制质量浓度为 2.5 mg/mL 的 5 种酚酸溶液, 各取 5 mL 于试管中, 依次添加 pH 值为 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 5 mL、1 mmol/L 二甲胺溶液 1 mL 及 1 mmol/L 亚硝酸钠标准溶液 1 mL, 混匀, 于 37 °C 反应 45 min, 依 1.3.2.1 节方法于 525 nm 处测定吸光度, 计算阻断率。

1.3.2.4 酚酸阻断亚硝胺合成的正交优化试验 根据单因素实验结果, 以酚酸浓度(A)、反应时间(B)和 pH(C)为自变量, 亚硝胺合成阻断率为因变量, 设计三因素三水平的正交试验。因素及水平设计见表 3。

1.3.3 数据处理 数据处理分析采用 SPSS25.0 软件, 作图采用 Origin2017 软件。试验重复 3 次, 结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 酚酸质量浓度对亚硝酸钠清除率的影响

在 pH 3.0、反应时间 30 min 的条件下, 考察 5

表 3 阻断亚硝胺合成正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test for blocking nitrosamine synthesis

水平	因素		
	A(酚酸质量浓度)/ mg·mL ⁻¹	B(反应时间)/ min	C(pH)
1	2.0	30	2.8
2	2.5	45	3.0
3	3.0	60	3.2

种酚酸质量浓度对亚硝酸钠清除率的影响, 结果见图 2。没食子酸、丁香酸的清除效果优于香豆酸、原儿茶酸和香草酸, 整体均是随酚酸质量浓度的增大, 清除效果增强。没食子酸、丁香酸质量浓度分别为 0.1~1.5 mg/mL 和 0.1~2.0 mg/mL 时, 清除率大幅度的增加; 其质量浓度大于 1.5 mg/mL 或 2.0 mg/mL 后, 清除率趋于平稳; 其质量浓度为 3.0 mg/mL 时清除率最大, 分别为 85.98% 和 90.78%。香豆酸、原儿茶酸和香草酸质量浓度为 0.1~2.5 mg/mL 时清除率有较大的增长幅度, 其质量浓度大于 2.5 mg/mL 后清除率无明显增加; 其质量浓度为 3.0 mg/mL 时清除率最大, 分别为 67.30%, 69.47% 和 69.20%。出现以上现象的原因可能是酚酸对亚硝酸钠的清除作用达到饱和所致; 随着酚酸浓度的增大, 酚酸的溶解性变差, 导致当酚酸质量浓度大于 3.0 mg/mL 时试验无法继续。综合考虑后选取酚酸质量浓度为 2.5 mg/mL 做后续试验。

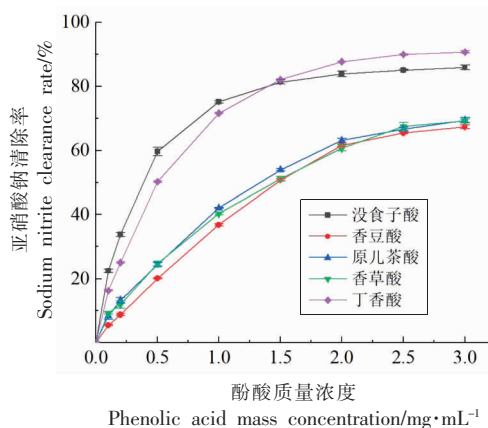


图 2 酚酸质量浓度对亚硝酸钠清除率的影响

Fig.2 Effect of phenolic acid mass concentration on sodium nitrite clearance

2.2 反应时间对亚硝酸钠清除率的影响

在 pH 3.0、酚酸质量浓度 2.5 mg/mL 的条件下,考察反应时间对亚硝酸钠清除率的影响,结果见图 3。没食子酸、丁香酸的清除效果优于香豆酸、原儿茶酸和香草酸,整体上均是随反应时间增加清除效果增强。没食子酸和丁香酸在反应时间 10~60 min 时对亚硝酸钠的清除效果显著;在 60~120 min 时清除率趋于平缓;反应时间 120 min 时清除效果最好,清除率分别为 94.92% 和 97.46%。香豆酸、原儿茶酸和香草酸在反应时间 10~75 min 时,清除率随反应时间的增加而增加;在反应时间 75~120 min 时清除率和没食子酸、丁香酸的趋势一致,均不再有大幅度的增加;反应时间 120 min 时清除效果最佳,分别达 94.52%、93.80% 和 94.22%。5 种酚酸均是反应一定时间后对亚硝酸钠的清除作用不再明显的增强,推测随着反应时间的推进,分子间碰撞几率增大,待多酚基本消耗完毕,对亚硝酸钠的清除率便不再明显的增加。综合考虑后选取反应时间 75min 做后续试验。

2.3 pH 值对亚硝酸钠清除率的影响

在酚酸质量浓度 2.5 mg/mL、反应时间 75 min 的条件下,考察 pH 值对亚硝酸钠清除率的影响,结果见图 4。5 种酚酸对亚硝酸钠的清除效果均为随 pH 值的增大先增强后减弱。没食子酸、丁香酸在 pH 2.6~3.2 时,清除率基本不变;在 pH 3.2~3.8 时,随 pH 的增大清除率明显减小;分别在 pH 3.2、3.0 时清除效果最好,清除率分别为 94.04%、97.66%。香豆酸、原儿茶酸和香草酸在 pH 2.6~3.2 时,清除效果与 pH 值呈正相关;在 pH 3.2~3.8 时,清除率和没食子酸、丁香酸的趋势一致,随 pH 值的增大而减小。这 3 种酚酸分别在 pH 3.2、3.0、3.2 时清除效果最好,清除率分别为 94.06%、94.36% 和 93.80%。

有研究^[36]表明,pH 值通过影响 5 种酚酸中羟基的解离形式,进而影响其与亚硝酸盐的反应,且羟基数目越多对 pH 值越敏感。没食子酸具有最多的羟基,香草酸和丁香酸结构中存在甲氧基,且香豆酸既不含羟基也不含甲氧基,这均影响羟基的解离,具体作用方式有待研究。丁香酸、原儿茶酸对亚硝酸钠的清除效果在 pH 3.0~3.2 间无较大差异。最终选取 pH 3.2 做后续试验。

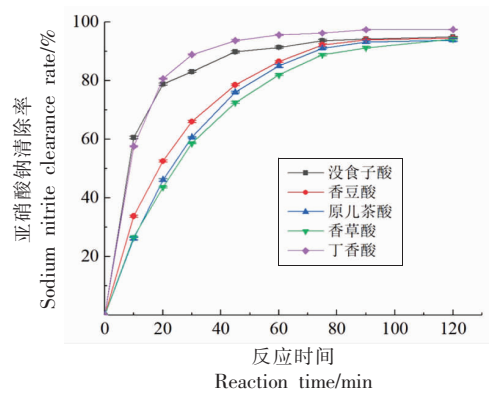


图 3 反应时间对亚硝酸钠清除率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on sodium nitrite clearance

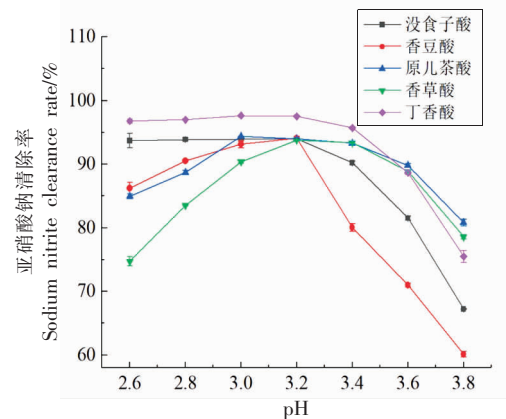


图 4 pH 对亚硝酸钠清除率的影响

Fig.4 Effect of pH on sodium nitrite clearance

2.4 酚酸清除亚硝酸钠的正交试验

由表 4 可知,对于没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、香草酸和丁香酸对亚硝酸钠的清除率,各因素的极差值分别为: $R_{CM} > R_{BM} > R_{AM} > R_{\text{误差M}}$ 、 $R_{CN} > R_{BN} > R_{AN} > R_{\text{误差N}}$ 、 $R_{BY} > R_{AY} > R_{CY} > R_{\text{误差Y}}$ 、 $R_{BC} > R_{AC} > R_{CC} > R_{\text{误差C}}$ 和 $R_{CD} > R_{AD} > R_{BD} > R_{\text{误差D}}$,说明这 5 种酚酸的 3 个因素的影响均高于试验误差,试验结果可靠。从 5 种酚酸的直观分析数据可看出,酚酸浓度、反应时间、pH 值均对亚硝酸钠的清除率有一定影响。没食子酸、香豆酸组的影响排序为 pH 值 > 反应时间 > 酚酸浓度,最优组合依次为 $A_2B_3C_{1(M)}$ 、 $A_3B_3C_{1(X)}$,即酚酸质量浓度 2.5 mg/mL、反应时间 90 min、pH 3.0 和酚酸质量浓度 3.0 mg/mL、反应时间 90 min、pH 3.0。原儿茶酸、香草酸组的影响为反应时间 > 酚酸浓度 > pH 值,最优组合均为 $A_3B_3C_2$;丁香酸组的影响为 pH 值 > 酚酸浓度 > 反应时间,最优组合

为 $A_3B_3C_2$ 。原儿茶酸、香草酸、丁香酸组的最优组合一致,即酚酸质量浓度 3.0 mg/mL、反应时间 90 min、pH 3.2。

表 4 酚酸清除亚硝酸钠正交试验结果表

Table 4 Results of orthogonal experiment on removal of sodium nitrite by phenolic acid

试验号	空列	A	B	C	亚硝酸钠清除率/%				
					M	X	Y	C	D
1	1	1	1	1	93.19	83.30	83.10	80.61	95.74
2	1	2	2	2	94.67	87.96	94.55	94.24	97.25
3	1	3	3	3	91.43	88.48	98.21	97.81	97.29
4	2	1	2	3	90.97	78.43	89.71	88.49	94.00
5	2	2	3	1	94.51	93.66	95.01	94.07	97.01
6	2	3	1	2	92.24	87.79	93.17	93.58	96.50
7	3	1	3	2	93.84	86.86	94.01	92.79	96.28
8	3	2	1	3	90.90	76.28	89.03	89.96	93.49
9	3	3	2	1	93.09	93.82	94.32	90.25	97.25
k_{11}	93.09	92.67	92.11	93.60	没食子酸组				
k_{21}	92.58	93.36	92.91	93.58					
k_{31}	92.61	92.25	93.26	91.10					
R_1	0.52	1.10	1.15	2.50					
k_{12}	86.58	82.87	82.46	90.26	香豆酸组				
k_{22}	86.63	85.96	86.74	87.54					
k_{32}	85.65	90.03	89.67	81.06					
R_2	0.97	7.17	7.21	9.20					
k_{13}	91.96	88.94	88.43	90.81	原儿茶酸组				
k_{23}	92.63	92.86	92.86	93.91					
k_{33}	92.45	95.23	95.75	92.32					
R_3	0.68	6.29	7.31	3.10					
k_{14}	90.88	87.30	88.05	88.31	香草酸组				
k_{24}	92.04	92.76	90.99	93.54					
k_{34}	91.00	93.88	94.89	92.08					
R_4	1.16	6.58	6.84	5.23					
k_{15}	96.76	95.34	95.24	96.66	丁香酸组				
k_{25}	95.83	95.92	96.16	96.67					
k_{35}	95.67	97.01	96.86	94.93					
R_5	1.09	1.67	1.61	1.75					

表中:M. 没食子酸;X. 香豆酸;Y. 原儿茶酸;C. 草酸;D. 丁香酸。

由试验数据进行方差分析,结果见表 5。5 种酚酸模型的 P 值均小于 0.01,说明模型极显著,而误差项的 P 值均大于 0.05,说明误差项不显著,对亚硝酸钠的清除作用与酚酸浓度、反应时间、pH 有关。香豆酸、原儿茶酸和香草酸组的 A 因素(酚酸浓度)对亚硝酸钠的清除率均有显著性影响($P < 0.05$),而没食子酸和丁香酸组的 A 因素无显著性影响($P > 0.05$)。香豆酸、原儿茶酸和香草酸组的 B 因素(反应时间)对亚硝酸钠的清除率分别有显著

性差异($P < 0.05$)、极显著性差异($P < 0.01$)和显著性差异($P < 0.05$),而没食子酸和丁香酸组的 B 因素无显著性差异($P > 0.05$)。没食子酸、香豆酸和原儿茶酸组的 C 因素(pH)对亚硝酸钠的清除率的影响达到显著性水平($P < 0.05$),而香草酸和丁香酸组的 C 因素未达到显著性水平($P > 0.05$)。从方差分析表中可知,丁香酸组的 3 个因素均未对亚硝酸钠的清除率有显著性影响。结合单因素的选取可以发现,丁香酸组的 3 个因素在选取时因按照

5种酚酸共同进行正交试验,在丁香酸组有转折除效果不太理想。时,香豆酸、原儿茶酸和香草酸组对亚硝酸钠的清

表5 酚酸清除亚硝酸钠正交试验方差分析

Table 5 Variance Analysis of orthogonal experiment of phenolic acid scavenging sodium nitrite

组别	来源	平方和	df	均方	F	Sig.
没食子酸	模型	77 456.120 ^a	7	11 065.160	43 217.654	**
	A	1.876	2	0.938	3.664	
	B	2.085	2	1.042	4.072	
	C	12.400	2	6.200	24.217	*
	误差	0.512	2	0.256		
	总计	77 456.632	9			
香豆酸	模型	67 298.789 ^a	7	9 614.113	10 633.512	**
	A	77.502	2	38.751	42.860	*
	B	78.887	2	39.444	43.626	*
	C	133.899	2	66.950	74.048	*
	误差	1.808	2	0.904		
	总计	67 300.597	9			
原儿茶酸	模型	76 905.694 ^a	7	10 986.528	29 729.923	**
	A	60.615	2	30.308	82.014	*
	B	81.345	2	40.673	110.061	**
	C	14.419	2	7.209	19.509	*
	误差	0.739	2	0.370		
	总计	76 906.433	9			
香草酸	模型	75 228.201 ^a	7	10 746.886	8 758.827	**
	A	74.414	2	37.207	30.324	*
	B	70.633	2	35.316	28.783	*
	C	43.684	2	21.842	17.801	
	误差	2.454	2	1.227		
	总计	75 230.655	9			
丁香酸	模型	83 113.965 ^a	7	11 873.424	11 527.223	**
	A	4.335	2	2.168	2.104	
	B	3.947	2	1.973	1.916	
	C	6.090	2	3.045	2.956	
	误差	2.060	2	1.030		
	总计	83 116.025	9			

注:**:有极显著差异($P<0.01$);*:有显著差异($P<0.05$);空白:无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 酚酸质量浓度对亚硝胺阻断率的影响

在 pH 3.0、反应时间 30 min 的条件下,考察 5 种酚酸质量浓度对亚硝胺阻断率的影响,结果见图 5。没食子酸和丁香酸随添加量的增大,阻断亚硝胺合成的效果整体优于香豆酸、原儿茶酸和香草酸。可以看出,没食子酸和丁香酸的添加量越大,阻断亚硝胺合成的效果越强,整体呈指数增长。其中,没食子酸添加量为 0.1~2.0 mg/mL 时对亚硝胺阻断率影响较大,当添加量为 2.0~3.0 mg/

mL 时亚硝胺阻断率不再明显增加,最大阻断率为 91.28%。丁香酸的影响趋势不同于没食子酸的稳步增长,在添加量为 0.1~0.2 mg/mL 和 0.5~1.0 mg/mL 时急剧增长,在其余添加量范围虽没有较大波动,但整体呈增大的趋势,最大阻断率为 93.84%。香豆酸、原儿茶酸和香草酸 3 种酚酸均随添加量的增加,阻断亚硝胺合成的效果越来越好,整体呈正比关系。3 种酚酸阻断亚硝胺合成的效果在添加量 3.0 mg/mL 时达到极致,最大阻断率分别为

86.99%, 85.25% 和 88.36%。经综合考虑, 选取酚酸质量浓度为 2.5 mg/mL 做后续试验。

2.6 反应时间对亚硝胺阻断率的影响

在 pH 3.0、酚酸质量浓度 2.5 mg/mL 的条件下, 研究反应时间对亚硝胺阻断率的影响, 结果见图 6。反应 10 min 时 5 种酚酸对亚硝胺的阻断率均超过 50%, 随着反应时间的增加, 阻断亚硝胺合成的效果也越来越好。可以看出, 在整个反应阶段, 反应时间对没食子酸、丁香酸的影响要小于香豆酸、原儿茶酸和香草酸。没食子酸和丁香酸对亚硝胺的阻断率从 10 min 时的 85.40%, 82.97% 到 120 min 时的 95.31%, 94.75%, 差值仅有 9.91% 和 11.78%。而香豆酸、原儿茶酸和香草酸对亚硝胺的阻断率从 10 min 时的 57.50%, 56.53%, 53.04% 到 120 min 时的 93.87%, 95.31%, 95.15%。5 种酚酸对亚硝胺的阻断率在反应 45 min 时已渐趋平稳, 反应时间再延长对亚硝胺的阻断率影响不大, 且浪费能源。经综合考虑, 选取反应时间 45 min 做后续试验。

2.7 pH 值对亚硝胺阻断率的影响

在酚酸质量浓度 2.5 mg/mL、反应时间 45 min 的条件下, 考察 pH 值对亚硝胺阻断率的影响, 结果见图 7。随着 pH 值的增大, 5 种酚酸对亚硝胺阻断率呈凸抛物线趋势变化。比较 5 种酚酸, 没食子酸的拐点发生在 pH 3.2 处, 而另外 4 种酚酸(香豆酸、原儿茶酸、香草酸和丁香酸)的拐点在 pH 3.0 处。丁香酸阻断亚硝胺合成的效果始终优于另外 4 种酚酸, 其最大阻断率为 91.25% (pH 3.0 处)。没食子酸在 pH 2.~3.2 时, 阻断亚硝胺合成效果没有显著性差异; 当 pH 3.2~3.8 时, pH 值越大, 阻断亚硝胺合成效果越差, 其最大阻断率为 87.85% (pH 3.2 处)。香豆酸、原儿茶酸和香草酸在 pH 2.6~3.0 时, 阻断亚硝胺合成效果随 pH 值的增大而增强; 在 pH 3.0 处阻断亚硝胺合成的效果最好, 其最大阻断率分别为 72.43%, 86.88% 和 86.12%。当 pH 大于 3.0 时, 香豆酸对亚硝胺阻断率越来越低; 原儿茶酸和香草酸对亚硝胺阻断率分别在 pH 3.0~3.4, 3.0~3.2 时无显著性差异, 当 pH 大于 3.4 或 3.2 时, 趋势同香豆酸。经综合考虑, 选取 pH 3.0 做后续试验。

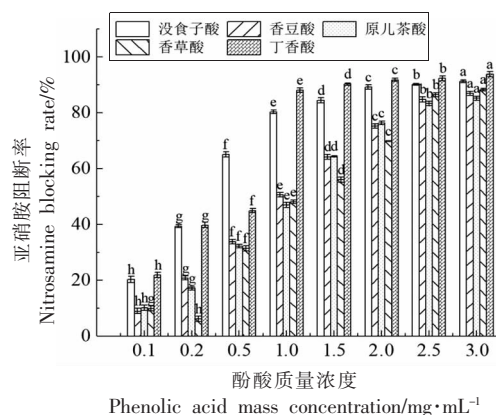


图 5 酚酸质量浓度对亚硝胺阻断率的影响

Fig.5 Effect of phenolic acid mass concentration on nitrosamine blocking rate

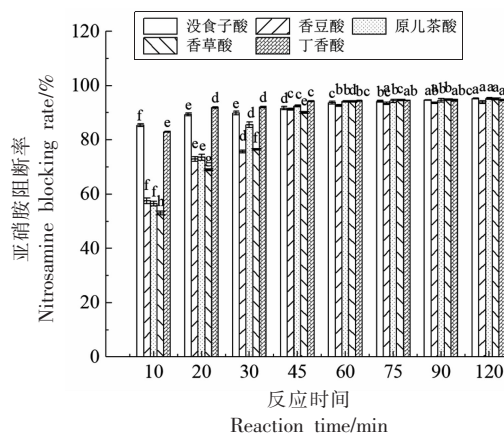


图 6 反应时间对亚硝胺阻断率的影响

Fig.6 Effect of reaction time on blocking rate of nitrosamine

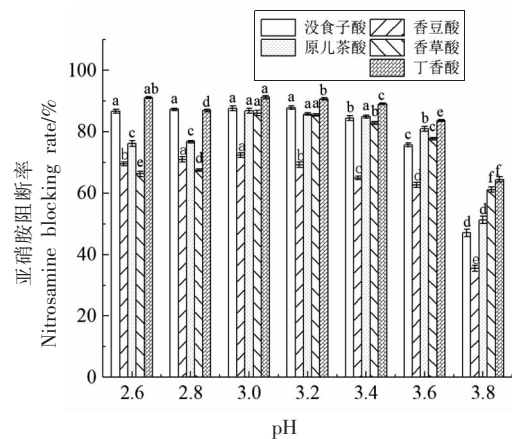


图 7 pH 对亚硝胺阻断率的影响

Fig.7 Effect of pH on blocking rate of nitrosamine

2.8 酚酸阻断亚硝胺合成的正交试验

由表6可知,没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、香草酸和丁香酸对亚硝胺的阻断率,各因素的极差值分别为: $R_{AM}>R_{CM}>R_{BM}>R_{\text{误差M}}$ 、 $R_{BX}>R_{AX}>R_{CX}>R_{\text{误差X}}$ 、 $R_{BY}>R_{AY}>R_{CY}>R_{\text{误差Y}}$ 、 $R_{BC}>R_{CC}>R_{AC}>R_{\text{误差C}}$ 和 $R_{BD}>R_{CD}>R_{AD}>R_{\text{误差D}}$,说明这5种酚酸的3个因素的影响均高于试验误差,结果可靠。从5种酚酸的直观分析数据,酚酸浓度、反应时间、pH值均对亚硝胺的阻断率有一定影响。没食子酸组的影响为酚酸浓度>pH>反应时间,最优组合为 $A_3B_3C_{3(M)}$,即酚酸质量浓

度3.0 mg/mL、反应时间60 min、pH 3.2。香豆酸、原儿茶酸组的影响为反应时间>酚酸浓度>pH,最优组合依次为 $A_3B_3C_{1(X)}$ 、 $A_3B_3C_{2(Y)}$,即酚酸质量浓度3.0 mg/mL、反应时间60 min、pH 2.8和酚酸质量浓度3.0 mg/mL、反应时间60 min、pH 3.0。香草酸、丁香酸组的影响均为反应时间>pH>酚酸浓度,最优组合依次为 $A_3B_3C_{3(C)}$ 、 $A_3B_3C_{2(D)}$ 。香草酸和没食子酸组的最优组合一致,丁香酸和原儿茶酸组的最优组合一致。

表6 酚酸阻断亚硝胺合成正交试验结果

Table 6 Orthogonal experimental results of phenolic acid blocking nitrosamine synthesis

试验号	空列	A	B	C	亚硝胺阻断率/%				
					M	X	Y	D	C
1	1	1	1	1	88.65	71.63	65.35	53.58	88.53
2	1	2	2	2	90.67	80.82	87.64	83.51	95.32
3	1	3	3	3	93.21	87.20	94.67	95.10	94.94
4	2	1	2	3	91.21	73.89	84.00	83.63	93.55
5	2	2	3	1	93.60	90.70	90.38	84.32	95.39
6	2	3	1	2	89.92	76.73	82.89	75.89	93.14
7	3	1	3	2	87.44	81.70	90.47	85.82	94.95
8	3	2	1	3	90.00	68.02	77.09	75.38	89.19
9	3	3	2	1	91.67	93.08	90.13	82.65	94.23
k_{11}	90.84	89.10	89.52	91.30	没食子酸组				
k_{21}	91.58	91.42	91.18	89.34					
k_{31}	89.70	91.60	91.42	91.47					
R_1	1.87	2.50	1.89	2.13					
k_{12}	79.88	75.74	72.13	85.14	香豆酸组				
k_{22}	80.44	79.85	82.60	79.75					
k_{32}	80.93	85.67	86.53	76.37					
R_2	1.05	9.93	14.40	8.77					
k_{13}	82.55	79.94	75.11	81.95	原儿茶酸组				
k_{23}	85.76	85.04	87.26	87.00					
k_{33}	85.90	89.23	91.84	85.25					
R_3	3.34	9.29	16.72	5.04					
k_{14}	77.40	74.35	68.28	73.52	香草酸组				
k_{24}	81.28	81.07	83.26	81.74					
k_{34}	81.28	84.54	88.41	84.70					
R_4	3.88	10.20	20.13	11.19					
k_{15}	92.93	92.34	90.29	92.72	丁香酸组				
k_{25}	94.03	93.30	94.37	94.47					
k_{35}	92.79	94.10	95.09	92.56					
R_5	1.24	1.76	4.80	1.91					

注:M. 没食子酸;X. 香豆酸;Y. 原儿茶酸;C. 香草酸;D. 丁香酸。

由试验数据进行方差分析,结果见表 7。5 种酚酸模型的 P 值均小于 0.01,说明模型极显著,而误差项的 P 值均大于 0.05,说明误差项不显著,依此反映对亚硝胺合成的阻断作用与酚酸浓度、反应时间、pH 值有关。香豆酸的 A 因素(酚酸浓度)和 C 因素(pH)对亚硝胺合成的阻断作用有显著性影响($P < 0.05$),而没食子酸、原儿茶酸、香草酸和丁香酸的 A 因素和 C 因素无显著性影响($P > 0.05$)。香豆酸、原儿茶酸和香草酸的 B 因素(反应时间)对亚硝胺合成的阻断作用分别有极显著性差异($P < 0.01$)、显著性差异($P < 0.05$)和显著性差异

($P < 0.05$), 而没食子酸和丁香酸的 B 因素无显著性差异($P > 0.05$)。从方差分析可知,没食子酸和丁香酸的 3 个因素均未对亚硝胺合成的阻断作用有显著性影响。结合单因素的选取可以发现,没食子酸和丁香酸的 3 个因素; A 因素(酚酸浓度)、 B 因素(反应时间)和 C 因素(pH)在选取的正交优化梯度里无较大波动。因是按照 5 种酚酸共同进行正交试验,故选取的梯度不一定是每种多酚都能达到最佳效果。

由以上结果可知,即使所含羟基数目最多,清除能力也不是最强。出现此现象与这 5 种酚酸中

表 7 酚酸阻断亚硝胺合成正交试验方差分析

Table 7 Variance analysis of orthogonal experiment of phenolic acid blocking nitrosamine synthesis

组别	来源	平方和	df	均方	F	Sig.
没食子酸	模型	74 077.602a	7	10 582.515	3 958.481	**
	A	11.679	2	5.840	2.184	
	B	6.395	2	3.197	1.196	
	C	8.419	2	4.210	1.575	
	误差	5.347	2	2.673		
	总计	74 082.949	9			
香豆酸	模型	58 804.125 ^a	7	8 400.589	10 147.137	**
	A	149.381	2	74.690	90.219	*
	B	332.670	2	166.335	200.918	**
	C	117.295	2	58.648	70.841	*
	误差	1.656	2	0.828		
	总计	58 805.781	9			
原儿茶酸	模型	65 238.745 ^a	7	9 319.821	868.624	**
	A	129.864	2	64.932	6.052	
	B	448.441	2	224.221	20.898	*
	C	39.410	2	19.705	1.837	
	误差	21.459	2	10.729		
	总计	65 260.203	9			
香草酸	模型	58 599.931 ^a	7	8 371.419	554.647	**
	A	161.443	2	80.722	5.348	
	B	656.140	2	328.070	21.736	*
	C	201.546	2	100.773	6.677	
	误差	30.186	2	15.093		
	总计	58 630.117	9			
丁香酸	模型	78 309.881 ^a	7	11 187.126	8 131.295	**
	A	4.658	2	2.329	1.693	
	B	40.278	2	20.139	14.638	
	C	6.747	2	3.373	2.452	
	误差	2.752	2	1.376		
	总计	78 312.633	9			

注:**:有极显著差异($P < 0.01$);*:有显著差异($P < 0.05$);空白:无显著性差异($P > 0.05$)。

另外含有的甲氧基取代基的数量相关,甲氧基取代原位置的羟基,使得清除自由基的活性增强。香豆酸既不含羟基又不含甲氧基,然而,对亚硝化反应仍有极强的抑制作用,推测与其独特的含氧五元环和双键有关。

3 结论

亚硝胺的含量同亚硝酸盐的含量呈正相关,当亚硝酸盐的含量降低时,合成亚硝胺的机会减小。本文模拟在胃液条件下5种酚酸对亚硝化反应的抑制作用。整体而言,丁香酸和没食子酸的作用效果要大于原儿茶酸、香草酸和香豆酸,其中丁香酸效果最好,最大清除率和阻断率均能达到97%;没食子酸次之,最大清除率和阻断率分别达到94%和93%;其它3种酚酸作用效果相当,最大清除率和阻断率均在75%以上。羟基数量和甲氧基取代基数量越多,清除效果越强。纵观没食子酸和丁香酸:单一羟基作用效果弱于羟基同甲氧基混合作用效果,推测甲氧基的存在使活性位点更易与亚硝酸盐反应。虽然香豆酸既无羟基又无甲氧基,但是仍有很好的作用效果,推测与其独特的含氧五元环和双键有关,具体作用机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y T, GUO K L, MENG Q, et al. Nitrite modulates aminoglycoside tolerance by inhibiting cytochrome heme-copper oxidase in bacteria[J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 269.
- [2] ZHANG Z G. Alternative to nitrites as antibacterial agents against clostridium sporogenes[J]. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 2019, 17(3): 242-248.
- [3] KURT S K. The effects of grape seed flour on the quality of turkish dry fermented sausage (sucuk) during ripening and refrigerated storage[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 36(3): 300-308.
- [4] SEO H W, SEO J K, YANG H S. Effects of injection of hydrolysis plasma protein solution on the antioxidant properties in porcine *M. Longissimus Lumborum*[J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2016, 58(1): 31.
- [5] GOVARI M, PEXARA A. Nitrates and nitrites in meat products[J]. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2015, 66(3): 127-140.
- [6] KIM H S, HUR S J. Changes of sodium nitrate, nitrite, and *N*-nitrosodiethylamine during in vitro human digestion[J]. *Food Chemistry*, 2017, 225(6): 197-201.
- [7] KAROLINA F, KAROLINA W. Reduction of nitrite in meat products through the application of various plant-based ingredients[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 711.
- [8] MOAZENI M, HEIDARI Z, GOLIPOUR S, et al. Dietary intake and health risk assessment of nitrate, nitrite, and nitrosamines: a Bayesian analysis and Monte Carlo simulation[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(36): 45568-45580.
- [9] VAN BREDA S G., MATHIJS K, SÁGI-KISS V, et al. Impact of high drinking water nitrate levels on the endogenous formation of apparent *N*-nitroso compounds in combination with meat intake in healthy volunteers[J]. *Environmental Health: a Global Access Science Source*, 2019, 18(1): 87.
- [10] LI N, LIN Z C, CHEN W, et al. Corilagin from longan seed: identification, quantification, and synergistic cytotoxicity on SKOV3ip and hey cells with ginsenoside Rh2 and 5-fluorouracil - ScienceDirect[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 119: 133-140.
- [11] RAY S K, MUKHERJEE S. Evolving interplay between dietary polyphenols and gut microbiota an emerging importance in healthcare[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 634944.
- [12] CARNAUBA RA, HASSIMOTTO NMA, LAJOLO FM. Estimated dietary polyphenol intake and major food sources of the Brazilian population[J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 126(3): 441-448.
- [13] JANTAN B, AREEFUL HAQYE M D, ARSHAD L, et al. Dietary polyphenols suppress chronic inflammation by modulation of multiple inflammation-associated cell signaling pathways[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2021, 93: 108634.
- [14] BUCCIANTINI M, LERI M, NARDIELLO P, et al. Olive polyphenols: Antioxidant and anti-inflammatory properties[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(7): 1044.
- [15] FARIAS D D P, ARAÚJO F F D, NERI-NUMA I

- A, et al. Antidiabetic potential of dietary polyphenols: A mechanistic review[J]. Food Research International, 2021, 145(2): 110383.
- [16] MARANESI M, DAL'AGLIO C, ACUTI G, et al. Effects of dietary polyphenols from olive mill waste waters on inflammatory and apoptotic effectors in rabbit ovary[J]. Animals, 2021, 11(6): 1727.
- [17] GROSSO G, STEPANIAK U, MICEK A, et al. Dietary polyphenol intake and risk of hypertension in the polish arm of the HAPIEE study[J]. European Journal of Nutrition, 2017, 57(4): 1-10.
- [18] MADUMANI A, MICHAEL J, RUPASINGHE H. Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1352.
- [19] ADRIOUCH S, KESSE-GUYOT E, FEUILLET T, et al. Total and specific dietary polyphenol intakes and 6-year anthropometric changes in a middle-aged general population cohort[J]. Int J Obes, 2018, 42(3): 310-317.
- [20] MOURA M, DONADO-PESTANA C M, RODRIGUES L, et al. Long-term supplementation with phenolic compounds from jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) reduces adiposopathy and improves glucose, lipid, and energy metabolism[J]. Food Research International, 2021, 143(6): 110302.
- [21] GODOS J, CARACI F, MICEK A, et al. Dietary phenolic acids and their major food sources are associated with cognitive status in older Italian adults[J]. Antioxidants, 2021, 10(5): 700.
- [22] LUTZ M, VARAGS C, STOJANOVA J, et al. Diet and depressive disorders[J]. Archives of Clinical Psychiatry, 2021, 48(2): 117-122.
- [23] MACHADO A P D F, GERALDI M V, NASCIMENTO R D P D, et al. Polyphenols from food by-products: An alternative or complementary therapy to IBD conventional treatments[J]. Food Research International, 2021, 140: 110018.
- [24] BAIMSON J M, PRASANTH M I, MALAR D S, et al. Role of herbal teas in regulating cellular homeostasis and autophagy and their implications in regulating overall health[J]. Nutrients, 2021, 13(7): 2162.
- [25] SERINA J J C, CASTILHO P C M F. Using polyphenols as a relevant therapy to diabetes and its complications, a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 24(5): 1-33.
- [26] ABEDI F, RAZAVI B M, HOSSEINZADEH H. A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects [J]. Phytotherapy Research, 2020, 34(4): 729-741.
- [27] KIM J S. Antioxidant activities of selected berries and their free, esterified, and insoluble-bound phenolic acid contents[J]. Preventive Nutrition & Food Science, 2018, 23(1): 35-45.
- [28] SINA C, ION T, VIOLETA N. Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(12): 3124-3134.
- [29] GU C H, HOWELL K, DUNSHEA F R, et al. LC-ESI-QTOF/MS characterisation of phenolic acids and flavonoids in polyphenol-rich fruits and vegetables and their potential antioxidant activities[J]. Antioxidants, 2019, 8(9): 405.
- [30] RÉBLOVÁ Z, FIŠNAR J, TICHOVSKÁ D, et al. Effect of temperature and oil composition on the ability of phenolic acids to protect naturally present α -tocopherol during the heating of plant oils[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2012, 30(4): 351-357.
- [31] SKRZYPCZAK-PIETRASZEK E, PIETRASZEK J. Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L. Lamiaceae)[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2012, 66: 154-161.
- [32] BEN T T, WU P, ZOU H, et al. Characterization of nitrite degradation by polyphenols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by density function theory calculations[J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 149(5): 111884.
- [33] NIU P F, WANG F R, YUAN K, et al. Alkaline-extracted thinned young apple polyphenols as an effective scavenger against nitrite in pickles: A comparative study with ethanol-extracted polyphenols[J]. Food Control, 2021, 130: 108387.
- [34] XIE Z J, LI X H, TANG R R, et al. Reactions of polyphenols in pomegranate peel with nitrite under simulated stomach conditions[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(9): 3103-3109.
- [35] 邓红, 贾洪锋, 周世忠, 等. 果疏对亚硝酸盐清除作

用的研究进展[J]. 中国调味品, 2015, 40(1): 110-114.

DENG H, JIA H F, ZHOU S Z, et al. Research progress on nitrite scavenging effect of fruits and vegetables[J]. Chinese condiments, 2015, 40(1): 110-114.

[36] 胡昭君, 李冬梅, 杜华英, 等. 绿原酸、异绿原酸 A

抑制亚硝化反应研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 59-65.

HU Z J, LI D M, DU H Y, et al. Studies on inhibition of nitrosation reaction using chlorogenic acid and isochlorogenic acid A [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(5): 59-65.

Studies on 5 Kinds of Phenolic Acids Inhibited Nitrosation in Simulated System

Ren Shuncheng^{1*}, Niu Baoqing¹, Zhao Wenhong¹, Xie Dongdong¹, Zhu Xiaoi¹, Wang Shenli¹, Liu Zelong²

(¹Henan University of Technology, Henan Provincial Key Laboratory of Natural Pigment Preparation, Zhengzhou 450001

²College of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract The effects of gallic acid, coumaric acid, protocatechuic acid, vanillic acid and syringic acid on the clearance of sodium nitrite and the blocking rate of nitrosamine synthesis were studied. The operating conditions of phenolic acid were optimized by single factor (phenolic acid concentration, reaction time, pH) and orthogonal experiment. The results showed that when the phenolic acid concentration was 2.5/3.0 mg/mL, the reaction time was 90 min and the pH was 3.0/3.2, the five phenolic acids had better scavenging effects on sodium nitrite, and the scavenging rates were more than 75%, among which the highest scavenging rate of syringic acid was 97%, followed by gallic acid (94%). When the phenolic acid concentration was 3.0 mg/mL, the reaction time was 60 min and the pH was 2.8/3.0/3.2, the five phenolic acids had a strong ability to block the synthesis of nitrosamine, and the blocking rates were more than 50%. Among them, the blocking effects of syringic acid and gallic acid were still the best, 97% and 93% respectively. This study provides a theoretical basis for the better application of phenolic acid in meat processing.

Keywords nitrite; nitrosamine; phenolic acid; orthogonal optimization