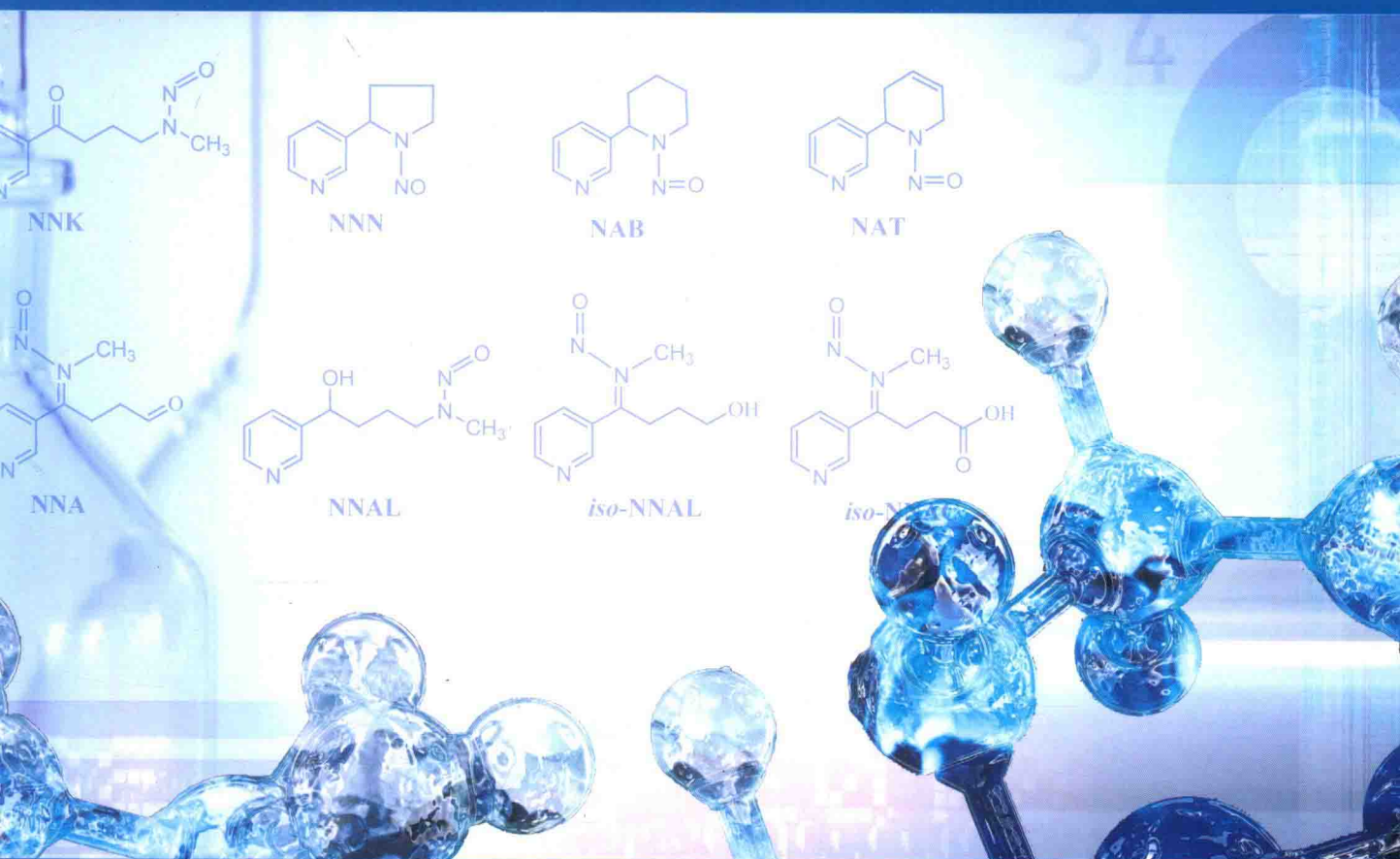


应用生物技术

降低烟草中特有 *N*-亚硝胺

周 骏 雷丽萍 刘兴余 马雁军 ● 主编



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

应用生物技术 降低烟草中特有 *N*-亚硝胺

周 骏 雷丽萍 刘兴余 马雁军 主编

 科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

应用生物技术降低烟草中特有*N*-亚硝胺 / 周骏等主编. —北京: 科学技术文献出版社, 2016. 12
ISBN 978-7-5189-2013-6

I. ①应… II. ①周… III. ①烟草—亚硝胺—研究 IV. ①TS424

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 241250 号

应用生物技术降低烟草中特有*N*-亚硝胺

策划编辑: 张 丹 责任编辑: 张 丹 王瑞瑞 责任校对: 张咧哏 责任出版: 张志平

出 版 者 科学技术文献出版社

地 址 北京市复兴路15号 邮编 100038

编 务 部 (010) 58882938, 58882087 (传真)

发 行 部 (010) 58882868, 58882874 (传真)

邮 购 部 (010) 58882873

官 方 网 址 www.stdp.com.cn

发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销

印 刷 者 北京地大彩印有限公司

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

开 本 889×1194 1/16

字 数 414千

印 张 15.25

书 号 ISBN 978-7-5189-2013-6

定 价 128.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

主编简介



周骏，1966年生，山东济南人，博士，研究员，现任上海烟草集团有限责任公司首席研究员、技术研发中心副主任，中国科协决策咨询专家，中国烟草学会常务理事，国家烟草专卖局烟草化学学科带头人，国家烟草专卖局减害降焦重大专项首席专家，国家烟草专卖局研究系列高级职称评审委员会委员，中国分析仪器学会和质谱学会会员。多年来一直从事烟草化学和卷烟减害降焦技术研究，多次在国际烟草科学研究合作中心（CORESTA）大会和烟草科学家研究大会（TSRC）上作学术报告，在国内外学术期刊上发表过 60 多篇论文，先后主持和参与了多项省部级重大专项和重点科研项目研究工作，获得国家科技进步奖二等奖 1 项，省部级科技进步奖特等奖 1 项、二等奖 3 项、三等奖 1 项，科技创新工作先进集体一等奖 2 项，主编出版烟草专著 1 部。



雷丽萍，1963年生，云南玉溪人，硕士，副研究员，1998—2001 年在美国肯塔基大学做访问学者，曾任云南省烟草农业科学研究院高新技术研究室、栽培研究室副主任，植保研究室主任，农艺研究中心副主任，安全性科研团队负责人；曾被评为云南省中青年学术技术带头人。1980 年至今，一直从事烟草微生物学、烟草育种、栽培、植物保护技术研究和推广工作。先后主持了国家自然科学基金项目 2 项，云南省烟草公司科技项目 6 项。获得云南省科技进步奖一等奖 1 项、三等奖 5 项，地厅级奖 8 项；获得授权专利 8 项；主编烟草专著 3 部，参加编写烟草专著 7 部；多次在国际烟草科学研究合作中心（CORESTA）大会和烟草科学研究会议（TSRC）上作学术报告，在《Mycology Research》和《Annals of Microbiology》期刊上发表 SCI 收录论文 8 篇，在《农业生物技术学报》《中国烟草学报》《中国烟草科学》《烟草科技》《西南农业学报》和《真菌学报》等期刊上发表学术论文 50 余篇。社会兼职：CORESTA 研究合作成员，中国烟草学会、中国微生物学会、中国菌物学会、中国植物病理学会等会员，湖南农业大学烟草农业推广硕士校外导师，湖南省烟草专卖局（公司）外聘专家。



刘兴余，1981 年生，山东日照人，博士，毕业于中国科学院大连化学物理研究所，现于上海烟草集团有限责任公司从事低危害烟草制品风险评估工作，主要研究方向为烟草及烟草制品对细胞、动物和人体健康效应的危害性评价。美国毒理学会会员、南京微生物学会副秘书长、中国烟草学会会员、中国毒理学会会员。先后参与了国家 863 计划课题、国家科技支撑计划课题和国家烟草专卖局卷烟减害技术重大专项等课题，多次获省部级科技进步奖；起草建立了国际烟草科学研究合作中心（CORESTA）推荐方法 2 项，完成多项烟草行业标准；发表 SCI 收录论文 20 篇，获得发明专利 9 项，出版英文专著 1 部、中文专著 2 部，其中，多篇论文获中国烟草学会优秀论文奖，多次获北京市青年科技论文奖励。



马雁军，1970 年生，河南长葛人，硕士，高级工程师，现在上海烟草集团有限责任公司技术中心北京工作站负责烟叶原料研究工作，现为国际烟草科学研究合作中心（CORESTA）常规化学分学组（RAC）成员，任中国仪器仪表协会近红外分会常务理事、北京烟草学会工业委员会委员。承担过多个省部级和厅局级重点科研项目，获得省部级科技进步奖二等奖 1 项、三等奖 1 项，获得厅局级科技进步奖特等奖、一等奖、二等奖各 1 项；参与研制 ISO 标准 1 项、行业标准 3 项，现主持国家标准研制项目 1 项；获得专利 2 项；主编出版烟草专著 1 部。共撰写过 13 篇学术论文，2 篇入选国际烟草学术大会，曾在烟草科学研究会议（TSRC）上作学术报告；发表 SCI 收录论文 4 篇、中文核心期刊论文 7 篇，其中，2 篇论文被中国烟草学会评为 2012 年度优秀论文，3 篇论文分别被省级烟草学会评为不同年度一等奖、二等奖、三等奖。

编写人员名单

主 编	周 骏	上海烟草集团有限责任公司
	雷丽萍	云南省烟草农业科学研究院
	刘兴余	上海烟草集团有限责任公司
	马雁军	上海烟草集团有限责任公司
副主编	夏振远	云南省烟草农业科学研究院
	吴玉萍	云南省烟草农业科学研究院
	汪安云	云南省烟草农业科学研究院
	张 杰	上海烟草集团有限责任公司
	白若石	上海烟草集团有限责任公司
	杨春雷	湖北省烟草农业科学研究院
	马 莉	上海烟草集团有限责任公司
	王金明	山东烟叶复烤有限公司诸城复烤厂
	闫洪洋	中国烟草总公司职工进修学院

前 言

人类对 *N*-亚硝胺的认识已经有了近百年的历史，烟草特有 *N*-亚硝胺 (TSNAs, Tobacco Specific *N*-nitrosamines) 是烟草特有的 *N*-亚硝基类化合物，主要有 4 种：4- (*N*-甲基-亚硝胺)-1- (3-吡啶基)-1-丁酮 [NNK, 4- (*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone]、*N*-亚硝基去甲基烟碱 (NNN, *N'*-Nitrosoanabacine)、*N*-亚硝基新烟碱 (NAT, *N'*-Nitrosoanatabine) 和 *N*-亚硝基假木贼烟碱 (NAB, *N'*-Nitrosoanabasine)。TSNAs 是卷烟烟气中特有的一类致癌性物质，是烟叶中存在的一种特有的有害成分。在烟草中 TSNAs 普遍被认为是由烟草中的生物碱和亚硝酸盐反应形成的。NNK、NNN、NAT、NAB 是烟草和烟气中主要的 TSNAs。NNK 被认为来源于烟碱，NNN 来源于烟碱和降烟碱，NAT 来源于新烟草碱，NAB 来源于新烟碱。烟叶中 TSNAs 在绿叶中的含量非常少，其形成通常被认为主要发生在调制、贮藏等阶段，卷烟烟气中 TSNAs 主要是卷烟燃烧时形成和烟叶中 TSNAs 转移而来的，其含量与烟叶中 TSNAs、硝酸盐、烟碱及其衍生物的含量，以及燃烧条件有关。

近半个世纪以来，如何降低 TSNAs 一直是世界烟草业发展中的关键问题。从一粒种子开始，到卷烟产品呈现给消费者，科学家试图在农业和工业阶段通过各种手段降低烟草中 TSNAs 的含量，从而降低烟草制品对消费者健康的影响。然而目前已有的方法适用性较低，这也导致降低甚至除掉烟草中的 TSNAs 成为世界性的难题。从 TSNAs 的生成机制可以看出，烟碱类物质是 TSNAs 生成的前体物，因此，只要烟碱存在于烟草中，TSNAs 便难以清除；而烟碱类物质是满足烟草吸食者的重要成分，不可能从烟草中完全剔除。因此，降低烟叶和烟气中 TSNAs 的含量就成为长期困扰烟草科学界的难题。

目前已有多种方法可降低 TSNAs 的含量，但大多数集中在实验室研究阶段，真正实现产业化应用的不多，且多集中于 TSNAs 生成前的控制阶段，真正从生成后阶段进行降解或减少的手段不多。本书从生物技术角度出发，叙述了酶和烟草微生物在不同烟草加工过程中的作用机制及对烟草品质的影响，并结合打叶复烤生产线和卷烟生产线的工艺质量控制要求，进行生物技术加料工艺技术研究。重点推荐了酶技术、烟草内生菌及植物源减害剂在 TSNAs 生成后阶段的减害作用，并着重介绍了卷烟工业生产过程中应用生物技术降低烟草中 TSNAs 含量的系列方法，从而为从事烟草行业减害的科技人员提供解决问题的思路和技术参考，因此是非常有益的。

本书包含七章内容和附录：第一章综述了降低烟草中 TSNAs 含量的研究历史，简要介绍了应用酶、

烟草微生物及植物源减害剂降低烟草中 TSNA_s 的含量的研究进展;第二章讲述了 TSNA_s 的生成机制、生物学作用及其检测方法;第三章讲述了酶工程及其在烟草中的应用、酶降低 TSNA_s 的作用机制、烟碱去甲基酶对 TSNA_s 前体物的影响;第四章讲述了烟草内生微生物的特性和作用、内生菌应用、烟草内生菌降低白肋烟中 TSNA_s 含量的机制;第五章讲述了烟碱的基本特性、对烟草中 TSNA_s 的影响,微生物代谢烟碱的机制及微生物降低烟碱的应用;第六章讲述了微生物技术在烟草调制和醇化过程中的作用及其对品质的影响和控制;第七章简要介绍了打叶复烤和卷烟生产线的工艺质量控制、加料工艺技术研究,重点推荐了酶技术在卷烟生产中降低 TSNA_s 的应用,典型烟草内生菌降低烟草中 TSNA_s 的应用和植物源减害剂降低烟草中 TSNA_s 的机制及应用。附录介绍了烟草中 TSNA_s 最新检测分析方法,降烟碱微生物菌剂的控制处理技术,烟草微生物分离、培养、鉴定及筛选技术。

本书用较多篇幅介绍了酶、烟草微生物及植物源减害剂 3 种生物技术降低烟草 TSNA_s 的机制和应用,这些内容均来自编者近 10 年来的最新科研成果,是众多科研项目工作的总结积累与提炼。

本书主要编写人员:第一章绪论,周骏和雷丽萍;第二章 TSNA_s 的生成、生物学作用和检测方法,刘兴余和张杰;第三章酶技术在烟草中的应用,刘兴余和白若石;第四章烟草内生微生物特性与作用,夏振远和吴玉萍;第五章降低烟草中 TSNA_s 的前体物——烟碱,白若石和张杰;第六章微生物技术在烟草调制和醇化过程中的作用,马雁军和马莉;第七章生物技术在烟草生产中的应用,杨春雷、马雁军、王金明和闫洪洋。附录 A 二维在线固相萃取 LC-MS/MS 法测定主流烟气中的 TSNA_s,张杰;附录 B 降烟碱微生物菌剂的控制处理技术规范,汪安云;附录 C 常用培养基配方,吴玉萍;附录 D 烟草微生物分离技术,雷丽萍;附录 E 烟草微生物培养技术,夏振远;附录 F 烟草微生物鉴定技术,雷丽萍;附录 G 烟草微生物的筛选技术,夏振远和吴玉萍;附录 H 烟草内生细菌的分离方法,夏振远和吴玉萍。在本书出版之际,真诚感谢所有给予帮助的老师 and 科研技术人员。本书在出版过程中,得到了科学技术文献出版社张丹编辑的大力帮助,特此诚挚感谢!

本书从酶、烟草微生物及植物源减害剂 3 种生物技术入手,直至探讨 3 种生物技术降低烟草中 TSNA_s 工业应用研究,涉及内容较多,专业性较强,资料来源渠道各不相同,尽管编委们付出了较大努力对全书做了专业术语处理,力求减少谬误,保证其科学性和准确性,但由于水平所限,书中难免存在一些疏忽与错误,有待于我们今后改进和完善。编委们以一种虔诚的科学态度对待这本书的编写,恳请同行专家、学者及广大读者对本书的错误予以批评指正。

周 骏 雷丽萍 刘兴余 马雁军

2016 年 7 月 25 日定稿于北京

目 录

第一章 绪 论.....	1
第一节 烟草特有 <i>N</i> -亚硝胺.....	1
一、烟草历史.....	1
二、 <i>N</i> -亚硝胺概述.....	2
三、降低 TSNA _s 含量的研究概况.....	4
第二节 酶技术及其在烟草中的应用.....	7
一、酶技术的发展简介.....	7
二、酶技术在烟草减害中的应用.....	7
第三节 烟草微生物的应用研究.....	8
一、烟草微生物研究史.....	8
二、烟草微生物在生产中的应用.....	12
第四节 植物源物质在烟草中的应用.....	18
第二章 TSNA _s 的生成、生物学作用和检测方法.....	20
第一节 TSNA _s 的生成.....	20
一、TSNA _s 的生成机制.....	20
二、不同品种、不同类型烟叶中 TSNA _s 的含量.....	23
三、TSNA _s 的不同生成阶段.....	23
第二节 TSNA _s 的代谢.....	40
一、NNK 代谢.....	41
二、NNN 代谢.....	54
三、NAT、NAB 代谢.....	57
四、4 种 TSNA _s 及烟碱代谢的交互作用.....	57
第三节 DNA 损伤.....	61
一、NNK 导致的 DNA 损伤.....	61

二、NNN 导致的 DNA 损伤	68
第四节 TSNA _s 的致癌性	70
一、NNK 的致癌性	70
二、NNN 的致癌性	71
三、NAT 和 NAB 的致癌性	72
第五节 烟草中 TSNA _s 含量的检测方法	72
一、概述	72
二、GC-TEA 法	73
三、GC-MS /MS 法	73
四、LC-MS/MS 法	73
第三章 酶技术在烟草中的应用	75
第一节 酶的概况及酶工程应用	75
一、酶的概况	75
二、酶的催化特性	75
三、酶工程的应用	76
第二节 酶技术在烟草中的应用	77
一、改善卷烟原料品质	77
二、提高香气、改善吃味	80
三、降低烟碱作用	81
四、病虫害防治	81
五、烟草废物利用	81
六、烟草减害	82
第三节 酶降低 TSNA _s 含量的作用机制	82
一、NNK 的降解	82
二、生物酶降解 NNK 途径	84
三、NNK 代谢的其他辅助反应	88
第四节 烟碱去甲基酶对 TSNA _s 前体物的影响	89
一、烟碱转化对 NNN 的影响	89
二、烟碱去甲基酶在烟草遗传育种中的作用	90
第四章 烟草内生微生物特性与作用	93
第一节 内生微生物的特性	93
一、内生微生物传播	93
二、内生菌的专一性	95
三、内生菌的多样性	95

四、烟草内生菌	96
第二节 内生菌对植物的作用	102
一、提高植物抗病性	102
二、提高植物抗虫性	103
三、提高植物对非生物胁迫的抗性	104
四、促进植物生长	105
第三节 内生菌的应用	106
一、内生菌用于病虫害生物防治	106
二、天然产物的用途开发	108
三、植物促进剂	109
四、生物固氮	109
五、内生菌其他方面的应用展望	110
第四节 烟草内生菌降低白肋烟中 TSNA _s 含量机制	110
一、降低烟叶中硝酸盐和蛋白质等物质含量	111
二、降低 TSNA _s 内生微生物的鉴定	112
三、内生菌还原硝酸盐和亚硝酸盐能力	112
四、内生细菌在烟草生长期和加工中对 TSNA _s 含量的影响	122
第五章 降低烟草中 TSNA _s 的前体物——烟碱	125
第一节 生物碱对烟草中 TSNA _s 的影响	125
一、生物碱与 TSNA _s 的关系	125
二、生物碱的亚硝化反应	125
第二节 烟碱的降解	128
一、降低烟碱的意义及途径	128
二、烟碱的基本特性	129
三、降解烟碱的微生物资源	131
四、微生物代谢烟碱的机制	133
第三节 微生物降烟碱在烟草行业中的应用	137
一、降烟碱微生物在烟叶中的应用	137
二、降烟碱微生物在烟草生产废弃物处理中的应用	138
第六章 微生物技术在烟草调制和醇化过程中的作用	140
第一节 烟草烘烤调制	140
第二节 微生物在烟草调制过程中的作用	141
一、烟草调制微生物主要类群	141
二、烟草调制微生物种群动态	141

第三节	微生物在烟草调制中对品质的影响及控制	142
一、烟草调制期间微生物引起的腐烂变质		142
二、烟草调制微生物对烟叶中 TSNA _s 含量的影响		142
三、微生物在烟草调制中降低白肋烟 TSNA _s 含量的应用		143
第四节	烟草醇化微生物	143
一、烟叶醇化发酵		143
二、烟叶醇化发酵对烟叶品质的影响		145
三、烟草醇化微生物的主要类群和种群动态		145
第五节	烟草醇化微生物的作用	148
一、缩短烟叶醇化发酵周期		148
二、微生物调控烟叶中主要化学成分含量		148
三、增加烟叶香气含量和改善品质		150
第七章	生物技术在烟草生产中的应用	152
第一节	打叶复烤线	152
一、打叶复烤工艺流程		152
二、打叶复烤的质量控制		155
三、加料技术研究		160
第二节	卷烟生产线	164
一、卷烟的概念及分类		164
二、卷烟生产制造基本工艺		165
三、卷烟分组均质化加工		168
四、制丝生产线施加植物源减害剂工艺		170
第三节	酶技术在卷烟生产中降低 TSNA _s 的应用	170
一、离线烟叶施加生物酶制剂		170
二、卷烟生产过程中施加生物酶制剂		171
三、生物酶制剂产业化生产工艺		173
四、生物酶制剂的安全性		174
第四节	典型烟草内生菌降低 TSNA _s 的应用	175
一、内生菌 K16、K17 和 K18 降低 TSNA _s 的效果		176
二、针对亚硝酸盐的菌株降低 TSNA _s 的效果		177
三、内生菌 WB ₅ 降低 TSNA _s 的效果		179
四、内生菌降低白肋烟 TSNA _s 的生产示范		181
第五节	植物源减害剂降低 TSNA _s 的应用	182

一、植物源减害剂材料筛选	182
二、马齿苋植物源减害剂简介	183
三、植物源减害剂在打叶复烤生产中的应用	184
四、植物源减害剂在卷烟加工生产中的应用	185
五、植物源减害剂降低 TSNA _s 的机制	187
附 录	189
附录 A 二维在线固相萃取 LC-MS/MS 法测定主流烟气中的 TSNA _s	189
附录 B 降烟碱微生物菌剂的控制处理技术规范	197
附录 C 常用培养基配方	200
附录 D 烟草微生物分离技术	202
附录 E 烟草微生物培养技术	203
附录 F 烟草微生物鉴定技术	205
附录 G 烟草微生物的筛选技术	211
附录 H 烟草内生细菌的分离方法	215
参考文献	217



第一章

绪 论

第一节 烟草特有 *N*-亚硝胺

一、烟草历史

1492年，哥伦布在发现新大陆的同时，发现了烟草。1500年前后，烟草由前往新大陆的移民大量带回西班牙。烟草最初被认为能治疗疾病，西班牙人称之为“圣草”，并传进葡萄牙。1560年，法国驻葡萄牙大使、医生让·尼科将烟草种子送回巴黎，作为观赏植物试种成功。1565年，烟草传入英国。1571年，法国人从烟草中发现了粗质烟碱，即以尼科之名将烟碱命名为“尼古丁”（nicotine 或 nicotian），此后尼古丁便成了烟草的代名词。随后数十年内，烟草迅速传遍意大利、巴尔干、中欧和俄国等地。烟草在非洲沿岸、西亚和南亚次大陆的传播主要是16世纪后期到17世纪初叶，由葡萄牙水手和商人首先传到海岸港口，然后深入内地。1605—1610年，烟草传进印度和锡兰，后传入西亚和伊朗等地。烟草在东亚和东南亚的传播，基本上是以菲律宾为中心辐射而成的，多以葡萄牙水手和商人为中介。1575年，西班牙人在墨西哥西部港城阿卡普尔科将烟草装上“马尼拉大帆船”，横渡太平洋，传入菲律宾。1590年，烟草传入日本。1600年，烟草传至澳门。1601年，烟草到达爪哇。从此，烟草在世界许多国家和地区被广泛种植和生产加工。

烟草传入中国以1600年在澳门为最早，一般认为分南北两路传入内地。南路来自吕宋（菲律宾）和交趾（越南），约在明朝万历年间。17世纪初，福建水手从吕宋将烟草种子带回，传进漳泉二州。明末浙江山阴名医张介宾在其《景岳全书》中较早提到烟草说：“烟草自古所未闻，近至我明万历时，出于闽广之间，自后吴楚地土皆种植之。”与此同时，烟草由交趾传入广东。《高要县志》记载：“烟叶出自交趾，今所在有之，茎高三四尺，叶多细毛，采叶晒干如金丝色，性最酷烈。”时称金丝烟。不久，南路二途，波及闽广，而后迅速推进到长江流域。烟草从北路传入的情况是1620年由日本传入朝鲜，大约在1625年由朝鲜商人传进沈阳。随后，烟草随清军入关，南北两路汇合，扩大大河上下，长城内外。

1999年，世界著名烟草学者左天觉对烟草科学技术研究的历史进行了回顾和展望，并再次重申他在1990年出版的专著《烟草的生产、生理与生物化学》的序言中对现在和未来的科学家的一条忠告：“烟草的使用只不过刚刚开始——请重视烟草！”

人类发现烟草虽已500多年，烟草的科学研究却起始于1918年，至今才近100年历史。Garner W W和Allard H A研究过如何使某种类型的烟草开花。当气候变冷、白昼变短时，他们将难以开花的烟株由大田移入温室，最后于1918年的圣诞节开花。由此，他们发现了通过白天与夜晚的相对长度控制植物开花

的基本原理,称这种现象为光周期现象。当时,他们均未意识到他们的发现会对农业和科学产生冲击。

1920 年后的 10 年,烟草研究大多是选择性状优良的烟株,然后培育高产并抗病的品种。先前的研究还涉及营养,尤其是微量元素和少量元素。这些研究结果后来被应用于玉米和其他几种作物。1930 年始,化学家们和植物学家们逐渐开始协作研究,分析比较不同类型、不同品种、不同部位、不同栽培方法等的烟叶品质。1940 年初,开始进行采收后的化学研究,如调制、陈化和发酵期间的化学变化。此外,还对烟叶的燃吸品质与其化学性质、物理性质和生物性质的关系进行了大量研究。此后 10 年,烟草普通花叶病成为一个重要的研究课题,该课题促成病毒学的发展,而病毒学是分子生物化学和分子生物物理学的一个分支。在此期间开始的著名的烟草组分 I 蛋白 (Fraction I protein) 的研究为分子生物学的发展铺平了道路,使人们了解了烟草组分 I 蛋白在光合和光呼吸中的作用,并确定出商品烟叶从何而生,发现了烟草具有生产食品和药品的潜力。1950 年后的 10 年,是烟草科学技术发展的关键时期,它为以后的发展奠定了基础。烟草研究在遗传学、细胞学、育种学、分类学、形态学、生理学、营养、有机代谢和栽培措施等方面都非常活跃。这些烟草研究结果被广泛应用于其他作物,如营养缺乏、培育抗病品种、微量元素生长调节及控制空气污染等方面。

在产品生产技术方面,1950 年第一次研制成作为雪茄烟内包皮用的烟草薄片,同年底卷烟滤嘴的面市使整个烟草业发生了一场革命。烟叶和烟气组分的研究及加工工艺技术的发展也与滤嘴技术结合,取得了巨大的进展,整个烟草业发生了巨大变化。近年来,烟草种植业不断更新生产技术,提高产品质量,改善生产条件,完善种植结构,为世界各国带来了广泛的就业机会,促进了烟农脱贫致富,满足了市场需求,增加了政府税收,推动了与烟草相关产业,尤其是农业的发展,创造了巨大的经济效益和社会效益。

二、*N*-亚硝胺概述

(一) *N*-亚硝胺

N-亚硝胺是一类广泛存在于环境、食品和药物中的致癌物质,其一般结构为 $R_2(R_1)N-N=O$ 。当 R_1 等于 R_2 时,称为对称性亚硝胺,如 *N*-亚硝基二甲胺 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) 和 *N*-亚硝基二乙胺 (*N*-Nitrosodiethylamine, NDEA); 当 R_1 不等于 R_2 时,称为非对称性亚硝胺,如 *N*-亚硝基甲乙胺 (*N*-Nitroso-methylethylamine, NMEA) 和 *N*-亚硝基甲苄胺 (*N*-Nitroso-methylbenzylamine, NMBzA) 等。亚硝胺由于分子量不同,可以表现为蒸气压大小不同,能够被水蒸气蒸馏出来并不经衍生化直接由气相色谱测定的称为挥发性亚硝胺,否则称为非挥发性亚硝胺。亚硝胺在紫外光照射下可发生光解反应。在通常条件下,不易水解、氧化和转为亚甲基等,化学性质相对稳定,需要在机体发生代谢时才具有致癌能力。

人类对 *N*-亚硝胺的认识已经有了近百年的历史。Freund 于 1937 年首次报道了 2 例职业接触 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 中毒案例,患者表现为中毒性肝炎和腹水,其后以 NDMA 给小鼠和小狗染毒也出现肝脏退化性坏死。随后, Bames 和 Magee 分别于 1954 年和 1956 年发现在实验动物体内, NDMA 不仅是肝脏的剧毒物质,也是强致癌物,可以引起肝脏肿瘤。自此之后,人们坚定了 200 多种 *N*-亚硝胺的致癌性。1960 年, Rodgman 指出卷烟烟气中很有可能含有 *N*-亚硝胺,引起了各国研究人员的广泛关注。4 年后, Serfontein 和 Neurath 等率先从卷烟烟气中鉴定出 *N*-亚硝胺。根据 1991 年 Hoffmann 等的报告,烟草中的 *N*-亚硝胺主要有 3 种类型,包括挥发性 *N*-亚硝胺 (Volatile *N*-nitrosamines, VNA)、非挥发性的 *N*-亚硝胺和烟草特有的 *N*-亚硝胺 (TSNAs), 它们主要是烟叶在调制、发酵和陈化期间及烟草燃烧时形成的,其含量

与烟叶中硝酸盐、生物碱、蛋白质、氨基酸的含量及工艺技术条件有关。

(二) 挥发性 *N*-亚硝胺

挥发性 *N*-亚硝胺是简单的二烷基和低分子质量的含氮杂环化合物亚硝化形成的。1964 年, Serfontein 等首次在南非卷烟烟气中鉴定出 *N*-亚硝基哌啶 (*N*-Nitrosopiperidine, NPIP)。随后, Neurath 等在卷烟烟气中鉴定出 *N*-二甲基亚硝胺 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) 和 *N*-亚硝基吡咯烷 (*N*-Nitrosopyrrolidin, NPYR)。到目前为止, 在烟草和烟气中已发现的挥发性 *N*-亚硝胺共有 15 种, 如 NDMA、NPIP、NPYR、*N*-亚硝基甲基乙基胺 (NEMA)、*N*-亚硝基二乙基胺 (NDEA)、*N*-亚硝基二丙基胺 (NDPA)、*N*-亚硝基二丁基胺 (NDBA)、*N*-甲乙基亚硝胺 (NEMA)、*N*-亚硝基吗啉 (NMOR) 等。人们普遍认为, 卷烟烟气中的挥发性 *N*-亚硝胺会对人体健康产生不利影响, 特别会引起吸烟者呼吸道内肿瘤的产生。Hoffmann 和 Hecht 所列出的 43 种烟草和烟气中致癌性化合物中包含了其中 5 种挥发性 *N*-亚硝胺: NDMA、NDEA、NEMA、NPYR 和 NMOR。有明显的证据表明挥发性 *N*-亚硝胺可以显著地被醋酸纤维滤嘴过滤掉。

(三) 非挥发性 *N*-亚硝胺

非挥发性 *N*-亚硝胺是由氨基酸及其衍生物亚硝基化产生的, 主要包括 *N*-亚硝基脯氨酸 (NPRO) 和 *N*-亚硝基二乙醇胺 (NDELA)。在实验动物的生物实验中, NPRO 是唯一一种生物活性实验结果为阴性的在烟草或烟气中存在的 *N*-亚硝胺化合物。1977 年, Schmeltz 等在烟草中分离并鉴定出 NDELA。有研究表明 NDELA 对动物的肝脏、肾脏和呼吸道都有致癌作用。烟草中的 NDELA 主要来源于烟草抑芽剂马来酰肼的二乙醇胺盐。从 20 世纪 80 年代初开始, 马来酰肼的二乙醇胺盐已经在烟草中禁用, 因此 NDELA 已经不再是烟草和烟气中的重要致癌成分。

(四) 烟草特有 *N*-亚硝胺

烟草特有 *N*-亚硝胺 (Tobacco Specific *N*-nitrosamines, TSNA) 是烟草特有的 *N*-亚硝基类化合物, 其研究最早始于 20 世纪 60 年代初, 其从分子化水平上看, 是烟草生物碱和亚硝基反应生成的复合物。目前已鉴定出的 TSNA 主要有 8 种, 分别为 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮 [NNK, 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone]、*N*-亚硝基去甲烟碱 (NNN, *N*'-Nitrosornicotine)、*N*-亚硝基新烟碱 (NAT, *N*'-Nitrosoanatabine)、*N*-亚硝基假木贼碱 (NAB, *N*'-Nitrosoanabasine)、4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁醇 [NNAL, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol]、4-(甲基亚硝胺基)-4-(3-吡啶基)-1-丁醇 [*iso*-NNAL, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol]、4-(甲基亚硝胺基)-4-(3-吡啶基)-1-丁酸 [*iso*-NNAC, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl) butyric acid]、4-(甲基亚硝胺基)-4-(3-吡啶基)-1-丁醛 [NNA, 4-(methyl-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butanal]。这些化合物结构如图 1-1 所示。其中, NNK、NNN、NAT 和 NAB 是烟草和烟气中主要的烟草特有亚硝胺, 研究最为深入。1973 年, Klus 等在由高降烟碱含量烟草制成的卷烟烟气中发现了 NNN。同年, Rathkamp 等在不滤嘴混合型卷烟中发现了 NAT。1977 年, Hecht 等在卷烟烟气中发现了 NNK 和 NNA。Hecht 等的研究表明 NNN 的含量与烟草中硝酸盐的含量成正比, 且烤烟烟叶中 TSNA 的含量最低。1987 年, Brunnemann 等在鼻烟和卷烟烟丝中鉴定出一种新的 TSNA (*iso*-NNAL), 但卷烟烟气未发现该物质的存在。两年后, Djordjevic 等在烟草和烟气中发现了 *iso*-NNAC。胺类化合物和亚硝酸盐或氮氧化物起反应形成 *N*-亚硝胺已被人们证实。烟草中含有大量的胺类化合物, 包括氨基酸、蛋白质、生物碱等, 其中烟碱是烟草中最重要的生物碱, 其含量在 0.2% (某些雪茄烟) ~ 4.5% (某些白肋烟)。另外, 比较重要的但含量较少的是降烟碱、新烟草碱和假木贼碱。烟草中还含有高达 0.5% 的硝酸盐和痕量亚硝酸盐, 因此, 在烟草中

具有潜在的亚硝胺形成前体。目前普遍认为，NNK 来源于烟碱，NNN 来源于烟碱和降烟碱，NAT 来源于新烟草碱，NAB 来源于假木贼烟碱。TSNAs 在绿叶中的含量非常少，而 TSNAs 的形成通常被认为是在采收后的调制、储存及加工过程中产生。

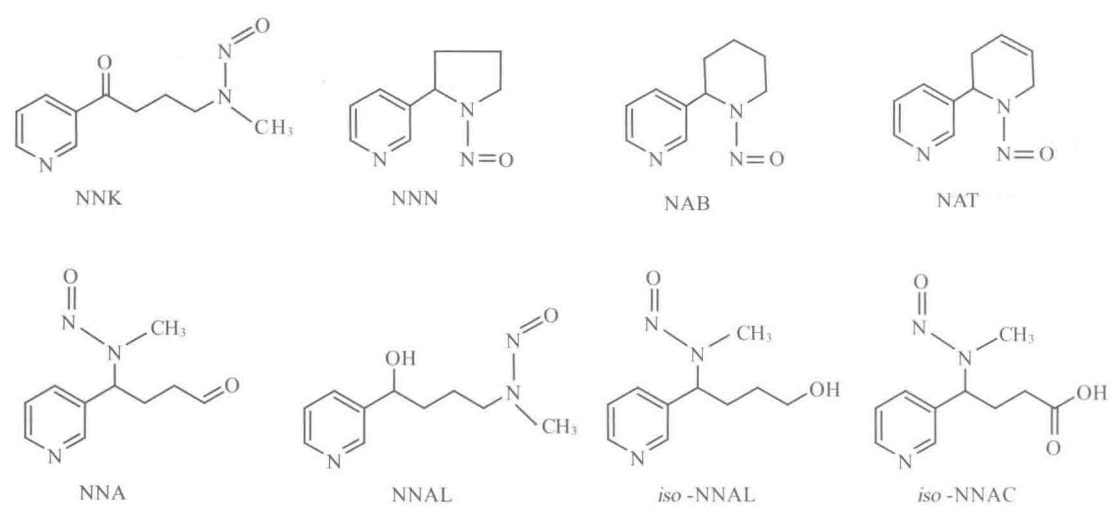


图 1-1 TSNAs 的结构式

三、降低 TSNAs 含量的研究概况

TSNAs 是卷烟烟气中的特有的一类致癌性物质，同时也是烟叶中存在的特有的有害成分。NNK、NNN、NAT、NAB 是烟草和烟气中主要的 TSNAs。在烟草中 TSNAs 的形成普遍认为是由烟草中的生物碱和亚硝酸盐反应形成的。TSNAs 在绿叶中的含量非常少，而 TSNAs 的形成通常被认为发生在调制时期。绝大多数观点认为：在调制时期，由微生物的作用所产生的亚硝化产物及其他氮氧化合物与烟草中的生物碱发生反应形成了 TSNAs。由于晾晒烟中的 TSNAs 含量明显高于烤烟，使得绝大多数科学工作者集中在晾晒烟的研究上。

近几十年来，如何降低晾晒烟烟草中的 TSNAs 的含量一直是烟草科研工作者研究的重点。目前已有多种方法可降低 TSNAs 的含量，但大多数集中在实验室研究阶段，真正实现产业化应用的不多，且各种方法各有利弊。在遗传育种阶段，可通过基因手段，培育低生物碱衍生物的品种，但代际间变异较大，遗传性差；在烟叶采后调制阶段，控制温湿度和改变烘烤条件可抑制 TSNAs 的生成，但对调制场所要求较高；在醇化阶段，控制温湿度可控制 TSNAs 含量的升高，但存在成本较高的问题；利用化学药剂（如 V_C 和 V_E ）虽可降低 TSNAs 的含量，但效果不明显，且化学药剂不稳定，易氧化失效，对烟叶的质量也有一定的影响。有学者利用沸石来催化、吸附、裂解 TSNAs，结果表明在过滤嘴中添加沸石能够降低一支香烟 TSNAs 总量的 80% 以上。另有研究通过辐照技术降低烟草及卷烟中 TSNAs 的含量，但由于辐照源的使用限制和对烟草品质的不利影响，大幅降低了辐照技术的工业应用效果。

半个多世纪以来，国际上关于如何降低 TSNAs 的含量问题一直伴随着烟草业的发展，但真正具有农业和工业生产适用性的措施较少，这也导致降低甚至除掉烟草中 TSNAs 成为世界性的难题。从 TSNAs 的生成机制可以看出，烟碱及其衍生物物质是导致 TSNAs 生成的前体物，因此，只要烟碱类物质存在于烟草中，TSNAs 便难以除掉，特别是烟碱及其衍生物在烟草中含量很高时，阻止烟碱类物质向 TSNAs 转化