

降低卷烟烟气中自由基含量的技术研究*

曲志刚 周 骏 朱茂祥 吴 可 田宁亚

摘 要

本文建立了卷烟烟气中的气相自由基和固相自由基的检测方法,系统地研究了卷烟烟气气相和固相自由基的测定方法和降低卷烟烟气中自由基含量的工艺和技术,系统地进行了低自由基卷烟及其对照样品的生物医学评价工作。研究表明:以 PBN 为自旋捕捉剂捕集气相自由基用 ESR 检测的方法和以剑桥滤片捕集固相自由基用 ESR 检测的方法来分别检测气相自由基和固相自由基的方法是可行的。对研制的活性碳复合滤嘴卷烟烟气自由基进行了测定,结果表明:同对照卷烟相比,试验卷烟烟气气相自由基清除率最高时可达 69.1%;优化了自由基清除剂配方,确定了在增塑剂中加入 1.50% 的 SRM 溶液制成醋纤活性炭复合滤嘴再制成卷烟的工艺方法生产低自由基低焦油 5mg 中南海卷烟,其烟气气相自由基清除率一般可稳定达到 41.2%。系统地进行了低自由基卷烟及其对照样品的生物医学评价工作,包括急性中毒试验、生殖毒性试验、免疫功能试验、致突变性试验等,所检测的各项功能指标均表明,低自由基卷烟的毒性明显低于同品牌的普通卷烟。

关键词: 卷烟烟气 自由基 固相自由基 气相自由基 测定方法

中图分类号:TS411.2 文献标识码:A 文章编号:1004-5708(2003)03-0008-10

卷烟烟气中的自由基一般分为两类,即气相自由基和固相自由基。气相自由基性质非常活泼,寿命很短,以烷基自由基和烷氧基自由基为主。固相自由基的性质比较稳定,寿命较长,以醌类和半醌类、稠环芳烃类自由基为主。由于卷烟烟气固相自由基可以用普通的醋纤滤嘴有效地祛除,国内外对祛除卷烟烟气中自由基的研究大都集中在气相自由基方面。近年来祛除卷烟烟气中自由基的研究取得了许多成果,其中比较成功的有北京卷烟厂和中国科学院生物物理研究所利用绿茶提取物和维生素的混合物祛除卷烟烟气中气相自由基的研究和希腊雅典大学的 Stavridis 领导的课题组用血红蛋白祛除烟气中气相自由基和其它有害物质的研究,而且利用研究成果分别生产出了 ENJOY 和 BF 两个比较成功的卷烟产品。由于这些技术大多采用抗氧化剂,因而卷烟长期放置后抗氧化剂对自由基的祛除效果会受到影响,这些产品的气相自由基祛除率最高仅在 30% 左右,而产品的成本又较普通卷烟增加较多。因此,寻找新型廉价的非抗氧化剂祛除卷烟

烟气中气相自由基是非常必要的。

本文系统研究了卷烟烟气气相和固相自由基的测定方法以及降低卷烟烟气中自由基含量的工艺和技术。系统地进行了低自由基卷烟及其对照样品的生物医学评价

1 卷烟烟气中自由基测定方法的研究

1.1 卷烟烟气中气相自由基的测定方法

1.1.1 试验

1.1.1.1 试验装置

主吸烟机采用 KC 公司的 5 孔道吸烟机,加以改造形成气相自由基捕集装置(见图 1)。

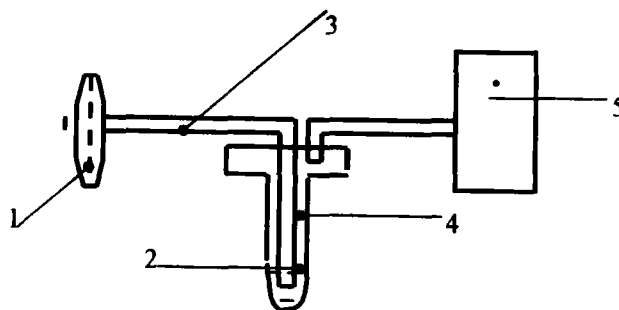


图1 气相自由基捕集装置

1—卷烟夹持器;2—自旋捕捉剂;3—导气管(35cm);
4—捕集管;5—吸烟机

* 曲志刚,男,37岁,研究生,工程师,北京卷烟厂,北京,100024

周骏,田宁亚,通讯地址同第一作者

朱茂祥,吴可,军事医学科学院,北京,100850

本研究由国家经济贸易委员会和国家烟草专卖局资助

收稿日期:2003-06-27

1.1.1.2 自旋捕捉剂

PBN (N-t-butyl- α -phenylnitron, 即 2-苯叔丁基硝酮, 纯度 98%), DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide, 5,5-二甲基吡咯啉氮氧化物, 纯度 97%), 为 Sigma 公司产品; $(\text{MGD})_2\text{Fe}^{2+}$ 为中科院研究生院合成。

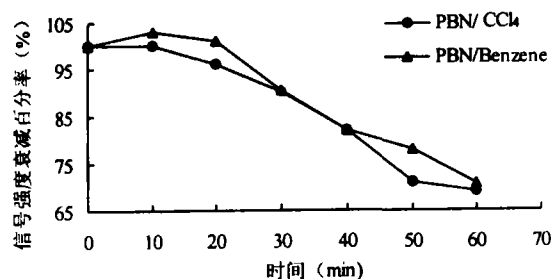
1.1.1.3 捕捉方法

采用特殊的玻璃器皿收集烟气自由基。加一定浓度的自由基捕捉剂溶液到收集器中, 将收集器连到吸烟机上, 以抽吸容量为 35.0mL, 抽吸时间为 2s, 抽吸间隔为 60s 的标准抽吸速率抽吸卷烟。吸烟后定容收集到烟气自由基溶液, 而后放入液氮中冷冻。检测体积为 200 μL 。

1.1.2 结果与讨论

1.1.2.1 溶剂的确定

分别用水溶剂和苯, 四氯化碳、二甲苯(以上试剂都为分析纯)等有机溶剂对上述捕捉剂的捕捉效率和加合物稳定性进行了比较研究。结果水溶剂的稳定性好, 但对烟气中自由基捕捉效率过低。RO $\cdot$ 、R $\cdot$ 为脂溶性, PBN 为脂溶性捕捉剂, 所以溶剂选用有机溶剂, 通过比较: CCl_4 、甲苯、苯等溶剂, 苯、 CCl_4 挥发性相对较低, 苯溶剂与 CCl_4 溶剂挥发性比较: 两者没有明显差别, 见图 2。 CCl_4 较稳定且本身无 ESR 杂质信号, 溶解 PBN 效果好, 对环境污染较小。综合考虑, CCl_4 最为理想, 因此选定 CCl_4 做溶剂。



不同时间检测烟气气相自由基信号强度变化(衰减)

图 2 不同有机溶剂对捕捉剂的捕捉效率和加合物稳定性的比较

1.1.2.2 不同类型捕捉剂性能比较

3 种类型捕捉剂均可捕捉并检测到烟气中自由基信号。从波谱形态来分析, PBN 加合物是较为规则的三线谱, 利于定量分析和计算。DMPO 加合物可获得

七线不规则波谱, 波谱成份相对较复杂, 且寻找相似的标准定标样品也较难。 $(\text{MGD})_2\text{Fe}^{2+}$ 也可获得规则的宽三线谱, 且可以在水溶剂中形成加合物, 所以操作上和稳定性上有优势, 但目前烟气中某些成份对加合物有干扰, 使波谱稳定性受影响, 还待深入研究。综上所述, PBN 是较理想的捕捉剂。

1.1.2.3 捕捉剂浓度和体积的确定

通过对不同浓度和体积的捕捉剂的试验结果(图 3 和图 4), 确定选用 0.03mol/L 浓度, 0.4mL 体积效果最佳。取 0.4mL 体积完全可以使烟气与捕捉剂在容器中充分混合反应, 这样既保证了捕集效率也不浪费捕捉剂。

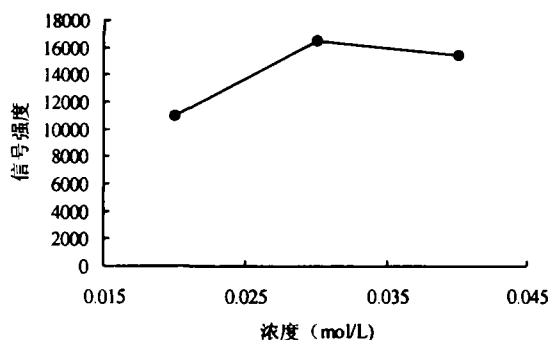
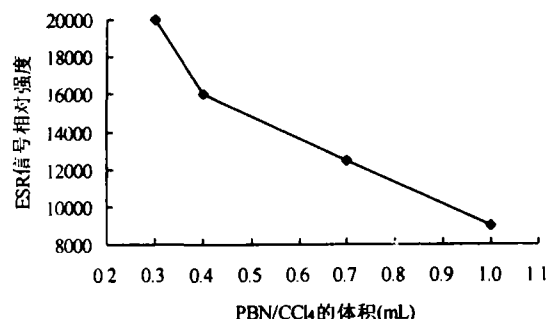


图 3 不同浓度捕捉剂对试验结果的影响



不同体积的捕捉剂捕捉烟气气相自由基的信号强度变化

图 4 不同体积捕捉剂对试验结果的影响

1.1.2.4 信号稳定性及其控制方法

捕捉剂与自由基形成的加合物信号强度, 在室温下均会自然衰减。其中 PBN 自旋加合物的衰减情况如图 5 所示。

为克服这种衰减产生的检测误差, 建立了冷冻停留方法来稳定自旋加合物, 并增加了检测时间的可控

性。

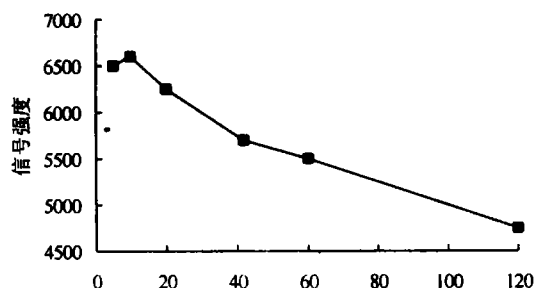


图 5 PBN 自旋加合物的衰减情况

表 1 说明冷冻停留后可使加合物在连续观测的 5 天内没有明显改变。

表 1 冷冻停留后加合物连续观测的 5 天内的变化

天数	1	2	3	4	5	变异系数
信号强度	12766	12147	12896	—	12896	5.4%

1.1.2.5 自由基浓度的确定

首先选取一系列具有氮氧自由基结构的化合物, 通过波谱比较, 选择与 PBN 自旋加合物波谱结构最接近的且信号稳定的化合物 TEMPO (2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidiny-1-oxy), 即 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧, 纯度 95%~98% 为标准样品。TEMPO 的浓度相关标准曲线为(见图 6)。

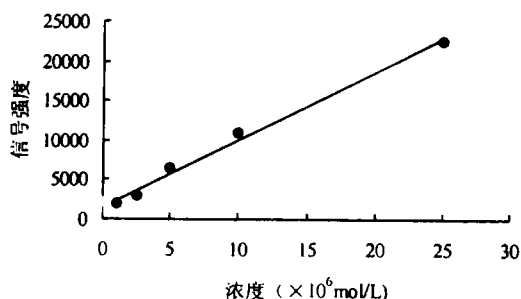


图 6 TEMPO 的浓度相关标准曲线

烟气中自由基浓度的确定按下面公式计算:

$$\text{自由基数} = \frac{\text{样品峰高}}{\text{TEMPO 峰高}} \times \frac{0.2\text{mL} \times 10^{-5}\text{mol/L}}{1000\text{mL}}$$

$$\begin{aligned} & \times \frac{0.32\text{mL}}{0.20\text{mL}} \times 6.02 \times 10^{23} \\ & = 1.926 \times 10^{15} \times \frac{\text{样品峰高}}{\text{TEMPO 峰高}} \end{aligned}$$

1.1.2.6 检测分散度:

以相同规格的烟为一个样品组, 进行了 3 次试验。结果如表 2 所示。

表 2 检测分散度

试验序号	样品数	均值	标准偏差	变异系数(%)
1	7	12765.9	1021.5	8
2	8	12147.1	2246.0	18
3	9	12896.3	2247.5	18

1.2 卷烟烟气固相自由基检测方法的研究

1.2.1 试验

1.2.1.1 低温冷凝法

在 5 孔烟道机上改造加入液氮冷凝装置, 使烟气直接经过冷凝管道在液氮中冻凝。而后取管中沉积物 ESR 检测。

1.2.1.2 剑桥滤片直接收集法

吸烟后将剑桥滤片取下, 裁下十分之一(图 7)的滤片装入 3mm 直径石英管中进行 ESR 检测。

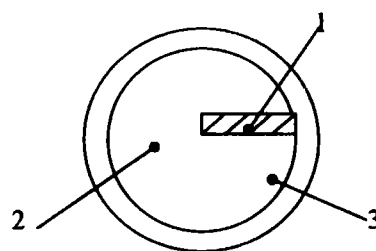


图 7 剑桥滤片直接收集法

1—测量部分 0.5×2cm², 2—烟斑, 有效面积, 面积为: 10.17cm²,
3—膜边缘, 无效面积

1.2.1.3 浓度校正方法

用 DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl), 即 1, 1-二苯基-2-苦基肼基, 纯度 90% 做校正标准样品。DPPH 为购自 Sigma 公司的标准品, 用大于等于 200 目的 CaCO₃ (分析纯) 为稀释剂进行充分研磨稀释。制

成 $1.5, 3.0, 6.0 \times 10^{15}$ Spin 的系列标准样品,以进行检测结果的浓度确定和校正。

1.2.2 结果与讨论

1.2.2.1 低温冷凝法

经试验,低温冷凝法可以收集到部分沉积物。但沉积物粘于管道内壁,其量值难以确定。而且仍有部分烟气通过冷凝系统,所以收集率也难以准确评估。最终影响自由基的准确定量。且这种检测方法是在低温(77K)下进行,检测过程受季节和环境影响因素大,信噪比和检测灵敏度难以控制,也影响了最终的自由基量的确定。

1.2.2.2 直接检测剑桥滤片法

采用直接检测剑桥滤片的方法,可检测到较稳定的自由基信号,其信号特征为单线峰。g 因子为 2.0030,波谱线宽为 4.66Gs。

通过对谱线位置进行二重积分,并对用同样条件和方法得到的 DPPH 标准样品二重积分,经过计算,可以得到每一检测样品的自由基浓度。

剑桥滤片本底信号的确定:试验中发现剑桥滤片具有较强的本底。为了克服其对试验影响,我们对剑桥滤片的本底进行了试验确定。对国产滤片(Filter-C),英国产滤片(Filter-E)和两批不同批次的德国 Borgwaldt 滤片(Filter-G1),(Filter-G2)的本底信号进行了测量对比。结果国产滤片(Filter-C)本底信号一致性差,呈现多种不规则波谱,难以进行积分计算和统计处理,不适于做为固相自由基收集材料。另外 3 种进口滤片虽都有不同强度的本底信号,但信号较规则,没有其它杂波,易于分析计算,因此均可做为固相自由基收集材料。但不同产地的滤片以及相同产地不同批次的滤片的本底信号强度有较大的差别,所以在使用中应针对每次试验所采用的滤片本底,来计算烟气中的固相自由基。表 3 是 4 种不同滤片的信号强度比较。

表 3 不同滤片本底信号强度比较

滤片	积分值($\times 10^7$)	变异系数(%)
Filter-G ₁	1.40 ± 0.093	6.7
Filter-G ₂	1.12 ± 0.029	2.6
Filter-E	0.65 ± 0.084	13.0
Filter-C	—	—

最终采取随机取 10 只滤片,按检测烟的同样条件

和方法检测求出 10 只滤片的平均信号双积分强度然后以此值为固定本底值,对已捕集固相自由基滤片的信号强度进行本底扣除,则可得到烟气固相自由基的净信号强度。

卷烟自由基浓度的确定方法:

$$\text{自由基数} = \frac{I_{\text{样}} - I_{\text{片}}}{I_{\text{DPPH}}} \times \frac{C_{\text{DPPH}}}{S_{\text{滤片}}}$$

I 样:样品双积分强度; I 片:滤片双积分强度;

I_{DPPH}: DPPH 样品双积分强度; C_{DPPH}: 所采用 DPPH 标准样的自旋数;

S_{滤片}:裁下滤片的面积与滤片总面积之比(此试验中为 1/10.17)。

检测分散度:取相同规格卷烟,同样条件下分组检测,其分散度见表 4。

表 4 检测分散度

试验序号	样品数	均值	标准差	变异%
1	13	1.855	0.188	10.1
2	13	1.821	0.233	12.8
3	13	1.768	0.224	12.7
4	13	1.881	0.123	6.5
5	13	1.734	0.146	8.4

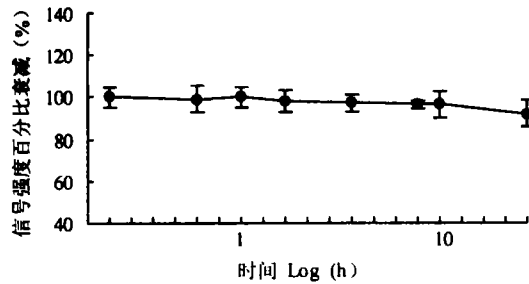
固相自由基的稳定性:将吸烟后的滤片在室温下保存,不同时间测量的信号强度如表 5。

表 5 卷烟烟气中固相自由基稳定性(n=5)

放置时间(h)	烟气固相自由基积分值(A)($\times 10^7$)		COAL 积分值(B)($\times 10^7$)		A/B 百分比衰减
	($\bar{X} \pm SD^*$)	变异系数(%)	($\bar{X} \pm SD^*$)	($\bar{X} \pm SD^*$)	
0.3	1.09 ± 0.05	4.6	1.54 ± 0.055		100.0 ± 4.6
0.7	1.08 ± 0.06	5.0			99.0 ± 5.6
1.0	1.09 ± 0.05	5.0			100.0 ± 4.6
1.5	1.07 ± 0.05	5.1			98.1 ± 3.3
3.0	1.06 ± 0.04	4.2			97.2 ± 3.8
7.0	1.05 ± 0.02	1.8			96.3 ± 1.9
9.0	1.03 ± 0.06	6.1			94.5 ± 5.8
23.0	1.00 ± 0.06	6.2			91.7 ± 6.0

将各时间点数据对表中第一点(0.3h)数据做归

一处理后,得到信号强度的百分比衰减规律如图 8。



烟气中固相自由基随时间的变化 (T=23℃)

图 8 信号强度的百分比衰减规律

可见在所观测的 23h 内信号衰减不明显,而通常试验可控制在吸烟后 3h 内检测完毕,则其衰减量小于 3%。

不同滤片对自由基的收集率比较:表 6 是 3 种不同滤片的试验结果。

表 6 不同滤片对自由基的收集率比较

类 别	空白滤膜	吸烟后	净增量
Filter-G ₁	1.269±0.142	1.805±0.106	0.54
Filter-G ₂	1.050±0.042	1.458±0.083	0.41
Filter-E	0.562±0.038	1.337±0.025	0.77

可见对于不同的滤片收集率差别较大。而且用同一种膜片重复的 5 批试验,收集率基本一致(表 7)。

表 7 不同时间检测不同批次各组间的分散度

组 号	样品数	信号强度
1	13	1.855±0.188
2	13	1.821±0.233
3	13	1.768±0.224
4	13	1.881±0.123
5	13	1.734±0.146
组间变异系数: 3.4%(n=5)		

所以实际使用时,为避免这种收集率的不确定性。在每次试验中,应选用同批次同规格的滤片。

1.3 检测过程进行样品校正和自旋数浓度计算标准的确定

1.3.1 材料和方法

对于非专用的 ESR 谱仪,仪器状态会随不同的试

验而有所改变,为了校正仪器状态,并对检测过程进行校正,需借助长期稳定的顺磁性样品,作为检测过程的校正样品。试验发现,DPPH 和 TEMPO 溶液(气相)室温下长期稳定性都不好,不宜做为检测过程校正样品。为更准确地确定烟气中自由基的实际浓度,根据煤在室温下的长期稳定性优于 DPPH 和 TEMPO 的特点,通过试验,确定用煤粉和 CaCO₃(分析纯)的混合物(大于等于 200 目)来做为检测过程的校正样品。并分别配制两组浓度已知的 DPPH(用于固相自由基测定)和 TEMPO(用于气相自由基测定)样品,来做为烟气自由基浓度计算的标准样品。将 DPPH 和 TEMPO 样品与上述煤样品同时检测,用二者信号强度的比值对自旋浓度做直线回归分析的方程做为确定烟气自由基浓度的标准关系方程。

2.3.2 结果

利用上述方法,对烟气气相和固相自由基的浓度计算标准方程进行了重新确定。其线性响应规律仍为良好的线性相关。结果如下:

以比值 $\delta_{\text{气}} = \frac{I_{\text{TEMPO}}}{I_{\text{煤}}}$ 对 N 值的回归分析关系方程为计算浓度的标准关系式。实际测量计算结果为: $\delta_{\text{气}} = 4.4N - 0.0057$, ($r = 0.9999$)。以比值 $\delta_{\text{固}} = \frac{I_{\text{DPPH}}}{I_{\text{煤}}}$ 对各浓度(N)的回归分析关系方程为浓度计算的标准关系式。实际测量和计算结果为: $\delta_{\text{固}} = 3.32N + 0.102$, ($r = 0.9989$)。

在检测烟气自由基时,也同时测量煤样品。用二者比值代入上述标准关系方程求出烟气的自由基浓度。用上述这种两种标样联合使用的方法,既可克服 DPPH 和 TEMPO 的长期稳定性差的缺点,又可避免每次试验都重新测定 DPPH 和 TEMPO 浓度曲线的过程。而每次试验只需将煤标样品与烟样品同时检测即可。

从以上的试验结果来看,以 PBN 为自旋捕捉剂捕集气相自由基用 ESR 检测的方法和以剑桥滤片捕集固相自由基用 ESR 检测的方法来分别检测气相自由基和固相自由基的方法是可行的。

2 降低卷烟烟气中自由基含量的技术研究

2.1 降低卷烟烟气中自由基含量的基础研究

在多年来对卷烟烟气中自由基的性质及其清除技

术研究的基础上,对一些作用明显的抗氧化物清除活性氧(ROS)自由基的效果进行观察,包括纳米硒、亚硒酸钠、茶多酚、甘露醇、血红蛋白(HGB)和SRM等。从检索到的资料来看,希腊雅典大学用血红蛋白清除自由基的效果最好,在试验中发现SRM清除自由基的效果最好。

2.1.1 SRM 体外清除 ROS 效果及与 HGB 比较

2.1.1.1 试验材料和方法

用黄嘌呤氧化酶(Sigma, 99%)和黄嘌呤氧化酶(XO, Sigma, 0.5U/mg 蛋白)产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)活性氧体系,用鲁米诺(氨基苯二酰肼, Sigma, 95%~97%)增强的化学发光(CL)法检测SRM和HGB对

X-XO 产生的 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢(Sigma, 30%)诱发的CL的抑制效果。CL用SHG-1生物化学发光仪(上海)进行测定,测量条件为:30℃,间隔30s测定10s的CL,连续测定30min,用CL峰值或30min内CL曲线积分面积表示CL值,以单纯X-XO或 H_2O_2 (不加SRM或HGB时)的CL值为100%,计算SRM或HGB对 $O_2^{\cdot-}$ 或 H_2O_2 诱发CL的抑制率,以CL抑制率为纵坐标,以SRM或HGB浓度为横坐标,绘制剂量效应曲线。用SLIDE分析软件进行线性范围分析和曲线拟合,并计算半数CL抑制浓度(IC_{50})。

2.1.1.2 结果

试验结果如图9和表8所示。

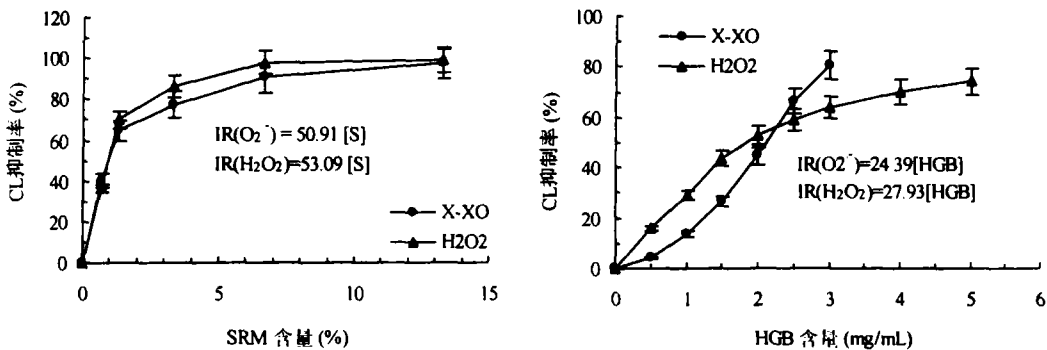


图9 SRM 和 HGB 对 ROS 的清除效果

测量体系总体积为 1 mL; $O_2^{\cdot-}$ 用 X-XO 反应产生,其中,X 浓度为 0.1 mmol/L,XO 活性为 0.01 U; H_2O_2 浓度为 0.1 mmol/L; Luminol 浓度为 0.1 mmol/L;HGB 由牛血中提取,MW:64 500,1 mg/mL 相当于 15 μ mol/L,约与 1%SRM 相当,IR:抑制率

表 8 SRM 和 HGB 对 ROS 的清除效果比较

	$O_2^{\cdot-}$	[X-XO]	H_2O_2
SRM	线性范围	0~2%	0~2%
	IC_{50}	0.98%	0.94%
HGB	线性范围	0~2.5mg/mL	0~2 mg/mL
	IC_{50}	2.05mg/mL	1.79 mg/mL

从以上试验结果可以看出,SRM 对 ROS 的清除效果明显强于 HGB,表现在 50%的 CL 抑制浓度(IC_{50}),SRM 比 HGB 约降低 2 倍。

2.1.2 SRM 对内源性 ROS 诱发人类 11 号染色体基因突变的保护效果及与其他抗氧化物的比较

2.1.2.1 试验材料和方法

用包含单条人类 11 号染色体(11,Hchr 11)的人-中国仓鼠卵巢细胞(A_L 细胞系,从美国哥伦比亚大学

放射生物研究中心 Dr. Hei TK 处引进)为靶,用人 CD₅₉表面抗原抗体筛选突变细胞克隆,研究 12-十四酸佛波酯-13-乙酸盐(简称佛波醇酯,PMA,sigma,纯度>99.8%)刺激人外周血多型核白细胞(PMN,从健康自愿者外周血分离获取)模拟炎症条件下产生的内源性 ROS 的基因突变作用,以及 SRM 的保护效果,以超氧化物歧化酶(SOD,清除 $O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢酶(CAT,清除 H_2O_2)鉴定。

2.1.2.2 结果

PMA (50ng/mL)能刺激 PMN 产生很强的 CL (图 10),经超氧化物歧化酶(SOD,清除 $O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢酶(CAT,清除 H_2O_2)鉴定,此条件下 PMA 刺激 PMN 产生的 ROS 以 $\cdot OH/H_2O_2$ 为主,而 SRM 对 PMA 刺激 PMN 产生的 CL 有明显的抑制作用,表明 SRM 对内源性 ROS 有良好的清除效果,且总体效果

优于 CAT、SOD 等公认的抗氧化物酶。

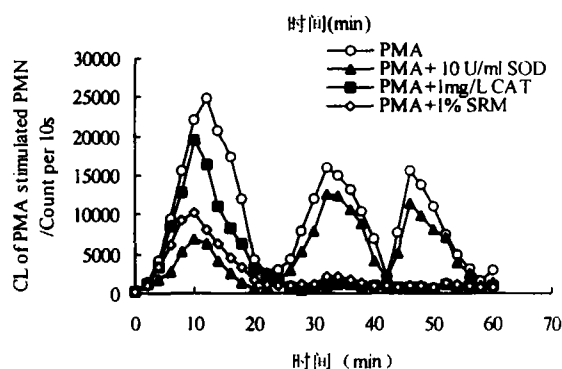


图 10 SRM 对 PMA 刺激 PMN 产生的内源性 ROS 的清除效果

CL 测量体系总体积为 1 mL, 其中含 0.1 mmol/L 的发光增强剂 Luminol; PMA 终浓度为 50 ng/mL; PMN 数量为 1×10^5 个; CL 测量条件为: 温度 30℃, 间隔 3 min 测量 10 s 计数, 连续测量 60 min

PMN(与 A_L 细胞比值为 50:1)和 PMA(50 ng/mL)诱发 Hchr 11 基因突变率(扣除 A_L 细胞的自发突变率)分别为 131 ± 35 和 $298 \pm 67/10^5$ 活细胞, 二者合并诱发的基因突变率增高到 $643 \pm 127/10^5$ 活细胞, 明显高于两者之和, 表明 PMA 刺激 PMN 产生的 ROS 有显著诱发基因突变作用。CAT(10 μ g/mL)、SOD(10 U/mL)和 SRM(1%)分别使 PMA+PMN 诱发的基因突变率降低到 163 ± 132 、 341 ± 135 和 $148 \pm 95/10^5$ 活细胞。

该研究结果表明, PMA 刺激 PMN 产生的内源性 ROS 可诱发 Hchr 11 基因突变, 一些抗氧化物酶如 CAT、SOD 等可通过清除 ROS 作用对染色体基因突变具有保护效果。SRM 对 PMA 刺激 PMN 产生的 CL 及其诱发的 Hchr 11 基因突变均有显著抑制作用, 且效果明显优于 CAT、SOD 等抗氧化物酶。

从以上试验结果可以看出 SRM 对自由基的清除效果要远远好于血红蛋白、多种抗氧化物酶等自由基清除剂。因此选用 SRM 为自由基清除剂来清除烟气中的自由基。

2.2 降低卷烟烟气中自由基含量的工艺研究

2.2.1 材料和方法

采取选用不同浓度的 SRM 溶液处理活性炭, 干燥后制成醋纤活性炭复合滤嘴再制成卷烟和将不同浓度的 SRM 溶液加入增塑剂制成醋纤活性炭复合滤嘴再制成卷烟两种工艺路径来进行试验, 用同样烟丝和

普通的醋酸滤嘴制成的卷烟做为对照样。将以上卷烟样品送到中科院生物物理所检测其烟气中的自由基的含量并组织北京卷烟厂卷烟评吸委员会和北京市烟草公司卷烟评吸委员会成员对上述样品进行评吸。

2.2.2 结果

将以上卷烟样品送到中科院生物物理所检测其烟气中的自由基的含量并计算上述样品烟对于对照样的烟气自由基清除率结果见表 9。

表 9 SRM 降低卷烟烟气中自由基含量效果

样品名称	自由基清除率(%)
1#	26.2
2#	28.1
3#	41.2
4#	49.3

注: 2#、4# 分别为用 0.25%、1.00% 的 SRM 溶液处理活性炭得到的卷烟样品, 1#、3# 分别为将 0.5%、1.50% 的 SRM 溶液加入增塑剂制成醋纤活性炭复合滤嘴再制成的卷烟样品。

从上述结果可以看出用 SRM 降低卷烟烟气中自由基含量效果显著。

另外, 对上述样品进行了感官评吸, 结果是上述样品与对照样相比没有异味。

2.2.3 自由基清除剂配方的优化

2.2.3.1 材料和方法

采取选用不同浓度的 SRM 溶液按以上两种工艺方法试制卷烟样品, 测定卷烟样品的烟气自由基清除率, 选出 1~2 个样品, 在军事医学科学院二所进行自由基清除效果试验和毒理试验, 在国家烟草质检中心进行卷烟质量的全项检测, 依据上述试验结果并考虑成本因素确定最终自由基清除剂的配方和工艺方法。

2.2.3.2 结果

在前期工作的基础上, 选定 1.50% 的 SRM 溶液加入增塑剂制成醋纤活性炭复合滤嘴的工艺方法并且试制了卷烟样品。经军事医学科学院二所测定其气相自由基清除率分别为 60.0%; 毒理试验表明与对照样品相比该卷烟的安全性明显提高; 经国家烟草质检中心检测此样品感官质量得分达 87.3 分; 经测算, 此样品与未加自由基清除剂的样品相比每大箱只增加 28 元, 因此选定 1.50% 的 SRM 溶液加入增塑剂制成醋纤活性炭复合滤嘴的工艺方法为最终的工艺方法。

3 低自由基卷烟及其对照样品的生物医学评价研究

对低自由基卷烟进行了小鼠吸烟急性毒性试验、吸烟急性致死小鼠肺组织病理形态学改变试验、细胞毒性试验、小鼠吸烟生殖毒性试验、小鼠吸烟致突变试验、吸烟对小鼠免疫功能的影响、小鼠慢性暴露卷烟烟气的毒性试验、小鼠吸烟急性毒性试验结果表明：与对照烟组比较，吸低自由基烟组的小鼠平均活存时间均明显延长，是对照烟组的 4.2 倍；平均致死剂量显著增高，是对照烟组的 2.25 倍。吸烟急性致死小鼠肺组织病理形态学改变试验结果表明：与对照烟和同品质空白烟比较，低自由基烟组急性致死动物的肺组织病变明显减轻。细胞毒性试验结果表明：与对照烟比较，低自由基及其同品质空白烟的细胞毒性明显降低，半数细胞死亡剂量(IC₅₀)分别约是对照烟的 4.0 倍和 2.0 倍。小鼠吸烟生殖毒性试验结果表明：小鼠吸烟后，体重明显减轻，睾丸和附睾重量也低于正常对照组，吸烟对小鼠生殖功能有不良影响，低自由基烟能明显降低吸烟所致的小鼠生殖毒性。小鼠吸烟致突变试验结果表明：各吸烟组骨髓细胞微核发生率均明显增高，反应骨髓红系造血功能的多染红细胞(PCE)与正成红细胞(NCE)的比值明显下降，说明吸烟有致突变作用。各吸烟组比较，微核发生率低自由基烟组最低。吸烟对小鼠免疫功能的影响结果表明：低自由基烟组免疫毒性明显降低。小鼠慢性暴露卷烟烟气的毒性试验结果表明：吸烟对动物体重有影响，随吸烟后时间延长，与未吸烟的正常小鼠比较，体重下降越明显。3 个吸烟组比较，对照烟组小鼠体重下降最显著，低自由基烟组小鼠体重降低最少，同品质空白烟组居中；吸烟对动物外周血白细胞数有影响，1~2 个月内增高，3 个月后降低。3 个吸烟组比较，对照烟组小鼠白细胞数变化最明显，低自由基烟组小鼠变化最小，同品质空白烟组居中；吸烟对动物外周血小板数有一过性影响，1~2 个月内降低，3 个月后恢复。3 个吸烟组比较，仅对照烟组小鼠血小板数在吸烟 1 个月时降低明显，而此时低自由基组变化并不明显；吸烟对动物外周血红细胞数有影响，1~2 个月内影响尚不明显，3 个月后增加。3 个吸烟组比较，对照烟组和空白烟组小鼠红细胞数在吸烟 3 个月后增高明显，而此时低自由基组变化并不明显；吸烟对动物外周血血红蛋白含量的影响与红细

胞变化相似，1~2 个月内影响尚不明显，3 个月后增加。3 个吸烟组比较，对照烟组小鼠血红蛋白含量在吸烟 9 个月后增高明显，而此时低自由基组变化并不明显，表明吸烟的慢性毒性反应，低自由基烟明显轻于对照烟和同品质空白烟。综上所述，低自由基卷烟的危害明显降低。

4 国内外卷烟烟气中固相和气相自由基含量的分析比较

对国内外各种类型的有一定代表性的 20 个品牌的卷烟进行了烟气中自由基含量的检测，结果见表 10。

表 10 20 种卷烟自由基的检测结果

样品名称	固相自由基 ($\times 10^{14}$ spin/支)	气相自由基 ($\times 10^{14}$ spin/支)	焦油量 (mg/支)
国外混-1	2.788 $\pm$ 0.209	24.110 $\pm$ 4.214	6.48
国外混-2	5.072 $\pm$ 0.381	40.320 $\pm$ 6.742	9.58
国外混-3	4.287 $\pm$ 0.981	41.460 $\pm$ 10.62	118.00
国外混-4	3.600 $\pm$ 0.669	31.350 $\pm$ 6.791	8.08
国外烤-1	3.282 $\pm$ 0.266	21.400 $\pm$ 4.362	10.88
国内混-1	2.382 $\pm$ 0.196	14.250 $\pm$ 3.067	6.16
国内混-2	2.435 $\pm$ 0.531	11.570 $\pm$ 4.141	5.62
国内混-3	4.766 $\pm$ 1.393	18.490 $\pm$ 6.086	10.35
国内混-4	3.126 $\pm$ 0.575	16.210 $\pm$ 3.212	10.58
国内烤-1	5.197 $\pm$ 0.390	5.321 $\pm$ 0.911	12.28
国内烤-2	3.890 $\pm$ 0.375	10.330 $\pm$ 1.565	13.27
国内烤-3	2.854 $\pm$ 0.184	4.643 $\pm$ 1.311	8.35
国内烤-4	4.592 $\pm$ 0.884	11.240 $\pm$ 2.699	12.82
国内烤-5	536.000 $\pm$ 1.242	8.442 $\pm$ 1.869	12.20
国内烤-6	2.808 $\pm$ 0.688	13.070 $\pm$ 3.163	10.44
国内烤-7	3.809 $\pm$ 0.980	6.976 $\pm$ 1.754	8.54
国内烤-8	4.483 $\pm$ 0.869	9.467 $\pm$ 2.515	12.33
国内烤-9	4.159 $\pm$ 0.893	11.770 $\pm$ 2.736	13.69
国内烤-10	100.000 $\pm$ 1.056	6.065 $\pm$ 1.703	10.61
国内烤-11	150.000 $\pm$ 0.861	4.481 $\pm$ 1.357	8.38

从以上结果可以看出：混合型卷烟的烟气气相自由基含量高于烤烟型卷烟；国外卷烟的烟气气相自由基含量远高于国内卷烟；混合型卷烟的烟气固相自由基含量略高于烤烟型卷烟，且烟气固相自由基含量随着焦油量的增加而增加；国外卷烟的烟气固相自由基含量略高于国内卷烟。

参考文献

- 1 Ahrendt S A, Decker P A, Alawi E A et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 2001, 92(6): 1525~1530.
- 2 Bagchi D, Hassoun E A, Bagchi M et al. Protective effects of free radical scavengers and antioxidants against smokeless tobacco extract (STE)-induced oxidative stress in macrophage J774A. 1 cell cultures. *Arch Environ. Contam. Toxicol.*, 1995, 29(3): 424~428.
- 3 Baldwin C I, Calvert J E, Todd A et al. Smoking and immune responses in pigeon fanciers' lung. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997, 25(2): 325S.
- 4 Bridges A B, Scott N A, Parry G J et al. Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur. J. Med.*, 1993, 2(4): 205~208.
- 5 Bullock A E, Barke K E, Schneider A S. Nicotine tolerance in chromaffin cell cultures; acute and chronic exposure to smoking-related nicotine doses. *J. Neurochem.*, 1994, 62(5): 1863~1869.
- 6 Carrillo T, Rodriguez de Castro F, Cuevas M et al. Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fanciers. *Allergy*, 1991, 46(4): 241~244.
- 7 Chow J Y, Ma L, Cho C H. An experimental model for studying passive cigarette smoking effects on gastric ulceration. *Life Sci.*, 1996, 58(26): 2415~2422.
- 8 Church D F, Pryor W A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.*, 1985, 64: 111~126.
- 9 Cunningham A J and Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detection single antibody-forming cells. *Immunology*, 1968, 14(4): 599~600.
- 10 DeMarini D M, Shelton M L, Levine J G. Mutation spectrum of cigarette smoke condensate in *Salmonella*: comparison to mutations in smoking-associated tumors. *Carcinogenesis*, 1995, 16(10): 2535~2542.
- 11 Dixon R L. *Reproductive Toxicology*. New York: Raven Press, Ltd, 1985.
- 12 Doolittle D J. Active and passive smoking and pathological indicators of lung cancer-a report of limited value? *JAMA*, 1993, 270(14): 1690.
- 13 Ecobichon D J. *The Basis of Toxicity Testing*. Boca Raton: CRC Press, 1992.
- 14 Flicker T M, Green S A. Comparison of gas-phase free-radical population in tobacco smoke and model systems by HPLC. *Environ. Health Perspect.*, 2001, 109(8): 765~771.
- 15 Hayes A W. *Principles and Methods of Toxicology* 2nd. New York: Raven Press, Ltd, 1989.
- 16 Kanaoka T, Miyakawa M, Yoshida O. Study on influence of cigarette smoking on the mutagenicity of urine (II) Animal experimental model of passive smoking. *Hinyokika Kyo*, 1990, 36(4): 395~399.
- 17 Kodama M, Kaneko M, Aida M et al. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer Res.*, 1997, 17(1A): 433~437.
- 18 Leonard M B, Lawton K, Watson I D et al. Cigarette smoking and free radical activity in young adults with insulin-dependent diabetes. *Diabet Med.*, 1995, 12(1): 46~50.
- 19 Leonard M B, Lawton K, Watson I D et al. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *J. Clin. Pathol.*, 1995, 48(4): 385~387.
- 20 Maranzana A, Mehlhorn R J. Loss of glutathione, ascorbate recycling, and free radical scavenging in human erythrocytes exposed to filtered cigarette smoke. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 350(2): 169~182.
- 21 Nulsen A, Holt P G, Keast D. Cigarette smoking, air pollution, and immunity: a model system. *Infect Immun.*, 1974, 10(6): 1226~1227.
- 22 Paranipe M S and Boone C W. Delayed hypersensitivity to simian virus 40 tumor cells in BALB/c mice demonstrated by a radioisotopic footpad assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1972, 48: 563~566.
- 23 Pessina G P, Paulesu L, Corradeschi F et al. Production of tumor necrosis factor alpha by rat alveolar macrophages collected after acute cigarette smoking. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1993, 41(5-6): 343~348.
- 24 Phull P S, Price A B, Thorniley M S et al. Plasma free radical activity and antioxidant vitamin levels in dyspeptic patients: correlation with smoking and *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*, 1998, 10(7): 573~578.
- 25 Pryor W A, Church D F, Evans M D et al. A comparison of the free radical chemistry of tobacco-burning cigarettes and cigarettes that only heat tobacco. *Free Radical Biol. Med.*, 1990, 8(3): 275~279.
- 26 Pryor W A. Cigarette smoke and the involvement of free radical reaction in chemical carcinogenesis. *Br. J.*

- Cancer, 1997, 8(Suppl): 19~23.
- 27 Rajpurkar A, Dhabuwala C B, Jiang Y et al. Chronic cigarette smoking induces an oxidant/antioxidant imbalance in the testis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000, 19(4): 369~373.
- 28 Raphael J W. *Reproductive Toxicology*. New York: Raven Press, Ltd. 1995.
- 29 Richter A M, Abboud R T, Johal S S et al. Acute effect of smoking on superoxide production by pulmonary alveolar macrophages. *Lung*, 1986, 164(4): 233~342.
- 30 Ronald D H. *Development Toxicology: Risk Assessment and the Future*. New York: Raven Press, Ltd. 1989.
- 31 Schaberg T, Lauer C, Lode H et al. Increased number of alveolar macrophages expressing adhesion molecules of the leukocyte adhesion molecule family in smoking subjects. Association with cell-binding ability and superoxide anion production. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, 146(5 Pt 1): 1287~1293.
- 32 Scialli A R. *A Clinical Guide to Reproductive and Developmental Toxicology*. Boca Raton: CRC Press. 1992.
- 33 Stone K K, Bermudez E, Pryor W A. Aqueous extracts of cigarette tar containing the tar free radical cause DNA nicks in mammalian cells. *Environ. Health Perspect.*, 1994, 102(Suppl 10): 173~178.
- 34 Suleimanova G G, Petrovich Iu A, Ratner K V. Effect of tobacco, herpes simplex virus and antioxidants on free-radical oxidation in the mucosa. *Stomatologiya (Mosk)*, 1988, 67(4): 12~14.
- 35 Swartz H M. 电子自旋共振的生物学应用. 北京: 科学出版社, 1978.
- 36 Vrieling H, Thijssen J C, Rossi A M et al. Enhanced hprt mutant frequency but no significant difference in mutation spectrum between a smoking and a non-smoking human population. *Carcinogenesis*, 1992, 13(9): 1625~1631.
- 37 White K L Jr, Sanders V M, Barnes D W et al. Immunotoxicological investigations in the mouse: general approach and methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 1985, 8(5): 299~331.
- 38 李寿棋. 毒理学基本原理和方法. 成都: 四川科学技术出版社, 1987.

Studies on the removal of free radicals in cigarette smoke

Qu Zhigang¹ Zhou Jun¹ Zhu Maoxiang² Wu Ke² Tian Ningya¹

1 Beijing Cigarette Factory, Beijing 100024

2 Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

Abstract

The determination methods for the gas-phase free radicals and solid-phase free radicals in cigarette smoke were systematically studied. A new technology to eliminate free radicals in cigarette smoke was also developed. A low-free-radical cigarette and its comparative sample cigarette were evaluated systematically by biomedical tests. PBN was finally selected to trap the gas-phase free radicals and the formed adduct was detected with ESR in the determination of gas-phase free radicals in cigarette smoke. In the technology for the elimination of free radicals in cigarette smoke, a new free radical eliminator, SRM was used. The gas-phase free radicals in the smoke of the cigarettes made with the above technology can be eliminated up to 69.1%. The gas-phase free radical elimination efficiency of 5mg low-free-radical Zhongnanhai was up to 41.2%. Biomedical experiments such as acute toxicity, chronic toxicity, immune function, mutation test and reproductive toxicity for this low-free-radical experiments and its comparative samples were shown that the toxicity of the low-free-radical cigarettes were considerably lower than that of the control ones.

Key Words Cigarette smoke, Free radicals, Gas-phase free radicals, solid-phase free radicals, Determination method