

综 述

烟草特有亚硝胺及其前体物研究进展

刘国顺, 赵春华, 崔树毅, 杨天旭

河南农业大学国家烟草栽培生理生化研究基地, 郑州市文化路 95 号 450002

摘 要: 综述了烤烟烟叶中烟草特有亚硝胺及其前体物的研究进展, 并对今后的研究方向进行了展望, 以期生产优质低害的烟叶提供参考依据。

关键词: 烟草特有亚硝胺; 前体物; 进展

中图分类号: TS416 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5708(2007)01-0044-04

Recent advances in research of TSNAs and their precursors

LIU Guo-shun, ZHAO Chun-hua, CUI Shu-yi, YANG Tian-xu

National Tobacco Cultivation, Physiological & Biochemical Research Center, Henan

Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Recent advances in research of TSNAs and their precursors were reviewed. Further studies in this field were put forward in order to make a reference basis to produce good quality and less harmful tobacco.

Key words: tobacco-specific nitrosamines; precursors; advances

随着人们对吸烟与健康问题的普遍关注, 吸烟的安全性越来越受到重视, 提高卷烟的安全性显得尤其重要。含氮化合物是烤烟烟叶中一类十分重要的组分, 它们不仅具有重要的生理功能, 还对吸烟者的健康有重要的影响。

1 烟草特有亚硝胺的前体物

烟草特有亚硝胺(TSNAs)是由硝酸盐、亚硝酸盐和烟草生物碱作为前体物质而形成的一系列致癌物质, 它主要包括: N-亚硝基去甲基烟碱(NNN), 4-(N-亚硝基甲基氮)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK), N-亚硝基假木贼碱(NAB), 和 N-亚硝基新烟草碱(NAT)。

1.1 生物碱

烟草生物碱中, 以烟碱为主, 其次是去甲基烟碱, 又称降烟碱, 还有新烟草碱和假木贼碱等。烟碱使烟草具有商品价值, 烟碱的作用是产生生理强度, 使吸食

者感觉兴奋, 但其含量过高对人体健康有影响。而烤烟中的去甲基烟碱如果含量过高, 会造成烟叶颜色不正常, 呈樱红色, 影响外观质量, 并可使烟草的香味变坏^[1]。吕作新等^[2]研究发现烟叶烤后棕红色的出现是由绿原酸氧化后与去甲基烟碱、氨基酸类物质作用形成的。烟碱主要合成于根系, 然后通过木质部向烟株地上部运输。烟草生物碱产生于须根和根瘤中而不产生于芽瘤。但芽瘤有积累生物碱并将烟碱脱去甲基转化为去甲基烟碱的能力^[3]。陆引罡等^[4]研究表明, 烤烟不同生育期烟碱的积累强度呈直线上升趋势, 合成烟碱所需的肥料氮量呈曲线上升, 而用于合成烟碱的氮主要由土壤供给。

氮素是影响烤烟烟碱积累的最重要的营养元素。作为烟碱的重要组成成分, 氮素供应对烟叶烟碱含量有极大影响, 烟叶烟碱含量与施氮量呈极显著正相关^[3, 5-7]。氮素对烟碱含量的影响不仅体现在氮素用量的多少, 氮素形态、种类和施用时期对烟碱合成和积累也有较大的影响。铵态氮与硝态氮比较, 不仅在叶片而且在根和茎中都能加速烟碱的生物合成和积累^[8]。刘泓等^[9]研究表明, 不同部位烟叶烟碱含量有

作者简介: 刘国顺, 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 烟草栽培、生理生化。E-mail: liugsh@371.net

收稿日期: 2006-06-26

明显差异,均表现为上部叶>中部叶>下部叶;不同施肥处理中,无机肥处理的上部叶烟碱含量较有机肥与无机肥配施处理高,而中部叶烟碱含量明显下降,下降幅度大于各配施处理。但是,张新要等^[10]研究表明,中上部叶片的烟碱含量随有机肥的增加呈上升的趋势。许多研究报告^[11-13]讨论了氮的吸收及打顶对烟草中烟碱含量的影响。这些作者的结论是①土壤中含氮量对植物烟碱含量的作用在打顶前不明显,但在打顶后植株的烟碱含量急剧增加,显示出土壤含氮量的作用;②烟碱合成的高峰期比氮吸收的高峰期出现要晚些;③打顶后供给用¹⁵N标记的氮,结果表明烟草植株中任何部分存在的氮不论是打顶前或打顶后吸收的都可用来合成烟碱;④打顶后吸收的氮比打顶前吸收的更有效地结合到烟碱中去。

关于烘烤对烟叶中烟碱含量的影响已有的研究并不一致,有的研究结果是烤后烟碱含量降低^[14],有的则刚好相反^[15]。张保全等^[16]的研究结果是:高温变黄烤后烟碱含量低于烤前,低温变黄烤后烟碱含量高于烤前。

1.2 硝酸盐和亚硝酸盐

硝酸盐和亚硝酸盐作为一类重要的含氮化合物,其含量的高低不仅直接影响烟叶的吃味品质,而且影响其它含氮化合物的形成^[17]。亚硝酸盐主要是在调制期间通过酶和微生物作用将硝酸盐还原而形成的。

国内外学者通过研究施用氮肥与 NO_3^- 积累的关系后认为,氮肥用量过大是造成作物积累 NO_3^- 过多的直接原因之一。土壤或栽培介质中有效氮含量与植物 NO_3^- 的吸收和积累呈线性关系,其相关系数介于0.603~0.999之间^[18-19]。在烟叶的生长过程中,适量施用氮肥,烟叶体内的蛋白质含量随之增加,而硝酸盐含量增加则较为缓慢;当施氮量达到或超过某一限度时,烟叶中蛋白质含量下降,硝酸盐含量剧增,从而导致烟叶品质的下降。磷素不仅能够促进氮的吸收和同化,而且磷是硝酸还原酶(NR)、亚硝酸还原酶(NiR)的重要组成部分,参与 NO_3^- 的还原和同化。缺磷比增氮更易引起叶片组织内硝酸盐的积累,施磷量在一定范围内对降低硝酸盐的积累具有明显的作用^[20]。有研究表明^[21]:在一定的施磷范围内,烤烟硝酸盐和亚硝酸盐含量均随施磷量的增加而呈现出下降的趋势,鲜烟叶中硝酸盐含量与烤后烟叶硝酸盐、亚硝酸盐含量均呈极显著正相关。

研究表明^[22],不同部位鲜烟叶中 NO_3^- 和 NO_2^- 含量有很大差异,但经过烘烤后差异却没有鲜烟叶明显。

NO_2^- 在鲜叶中含量较低,烘烤开始后含量逐渐上升,变黄结束时达到最大值,之后含量有所下降,但烤后含量仍比鲜叶高, NO_3^- 的变化规律与 NO_2^- 相似。不同部位烟叶烤后 NO_3^- 含量表现为中部叶>上部叶>下部叶。Burton等^[23]把一片烟叶分成41块,分析其 NO_3^- 、 NO_2^- 的分布和关系,得出 NO_2^- 最高出现在叶片基部,朝叶尖方向降低; NO_2^- 在支脉周围叶片中的含量比其它部位叶片低。

2 烟草特有亚硝胺(TSNAs)

1962年,国际上首次在科技文献中有文章报道烟草中含有亚硝胺及其有潜在的致癌作用。目前,有关TSNAs的致病机制在国内外已有大量报道,但很多都是在动物试验中得到证实,在人体中是否有同样作用还有待研究。

2.1 TSNAs的形成

TSNAs的形成过程至今尚未完全明确。目前普遍认为TSNAs在鲜烟叶中很少或几乎不产生,其形成与积累是在采收后产生的,而且大部分是产生于调制期间。烟草TSNAs的形成受生物碱有效性和亚硝酸有效性的双重影响^[24]。关于烟草特有亚硝胺的形成途径应该有两条^[25]:一条是烟草生物碱在微生物的作用下发生亚硝化作用生成TSNAs;一条是硝酸盐在微生物的作用下生成亚硝酸盐,这些亚硝酸盐和其它氮氧化物再与烟草生物碱反应生成TSNAs。

2.2 影响TSNAs积累的因素

2.2.1 氮肥与TSNAs

凡影响前体物质形成的因素,如烟草类型、采收调制、储存陈化和栽培技术等都会影响TSNAs的形成和积累。在栽培措施中,施肥对TSNAs的影响最大,肥料种类、数量及施肥时间均对TSNAs有较大的影响,尤其是氮肥。Chamberlain等人的研究表明^[26],随着施氮量增加,特别是硝态氮肥增加, NO_3^- 、 NO_2^- 、烟草生物碱及TSNAs含量亦增加。宫长荣等^[27]研究的结果表明,烟叶中硝酸盐、亚硝酸盐和烟草特有的亚硝胺(TSNAs)的含量随硝态氮含量增加而增加;不同部位的烟叶中其硝酸盐、亚硝酸盐和TSNAs的含量排序均为中部叶>上部叶>下部叶。

2.2.2 生物碱与TSNAs

烟叶中的烟碱与TSNAs有密切关系。烟碱的代谢与降解可产生次生代谢产物,主要是去甲基烟碱,其次是可替宁和假氧化烟碱。其中去甲基烟碱和假氧化

烟碱都是生成 NNN 和 NNK 的中间产物。

1984 年, Chamberlain 等^[26] 研究结果显示, 烟碱与降烟碱的比值与不同烤烟中 NNN 含量无显著的相关性, 但烟草总生物碱与调制烟草中 NNN 含量正相关, NNN 的含量随降烟碱含量的增加而增加。1989 年, Mirjana 等^[28] 发现, 烤烟 NC95 中的 NNN 量随烟草生物碱总量的增加而增加。降烟碱和 NNN 之间的相关系数为 0.95, 新烟草碱和 NAT 之间的相关系数为 0.76。2002 年, 史宏志等^[29] 报道, 我国烟叶和卷烟中的 TSNA_s 含量与降烟碱含量呈显著正相关, 其中 NNN 与降烟碱相关性最大, 相关系数达 0.8633。

2.2.3 硝酸盐、亚硝酸盐与 TSNA_s

烟草中影响亚硝胺累积的另一因素是硝酸盐。Brunnemam 等^[30] 研究显示, NNN 和 TSNA_s 总量与烟草中硝酸盐的含量存在较强的相关性 ($R^2 = 0.978$, 0.948)。Fischer 等^[31] 报道烟草中的硝酸盐和 TSNA_s 之间有显著相关。

Burton^[23] 研究表明: 烟叶中 TSNA_s 的分布更类似于亚硝酸盐而非烟草生物碱的含量分布, 引起 TSNA_s 积累的主要因素是亚硝酸盐, 而非烟草生物碱和硝酸盐。目前普遍认为, 亚硝酸盐才是 TSNA_s 最直接的中间体^[30-32]。

2.2.4 调制过程与 TSNA_s

烟叶中的 TSNA_s 几乎都是在调制过程中产生的, 因此选用适当的调制方式, 控制调制过程中的反应条件对降低 TSNA_s 含量是非常重要的。热交换式烤房燃烧产生的热气体不与烟叶接触, 因而应用热交换式烤房烘烤的烟叶中 TSNA_s 含量较低。微生物在 TSNA_s 的形成中起着重要作用, 在调制过程中改变微生物活性和数量, 也必然会影响 TSNA_s 的累积。研究证明^[33] 调制期叶片表面的湿度与微生物活性在一定范围内呈线性关系, 叶表相对湿度小, 微生物活性低, 产生的亚硝酸盐和 TSNA_s 的量少。因此, 调制时适当降低空气和叶表湿度将有利于降低烤后烟叶中的 TSNA_s 的量。另一种方式则是在调制过程中加入一些可与亚硝酸盐的分解产物 NO 和 N₂O₃ 反应的物质^[34], 如抗坏血酸、多酚、类黄酮和半胱氨酸等, 从而减少 NO 和 N₂O₃ 与烟草生物碱发生亚硝化反应的可能性。此外, 魏玉玲^[35] 综述了在烟叶的调制过程中采用微波辐射降低 TSNA_s 的原理、方法、效果和应用前景。应用美国星科技公司发明的 StarCureTM 技术烘烤烟叶, 可以使调制后的烟叶 TSNA_s 含量得到显著降低, 甚至达到难以检测出的含量^[36]。

3 研究展望

3.1 大量数据表明, 腐胺-N-甲基转移酶(PMT)是烟碱生物合成中吡咯环形成的控制酶。该酶在烟根中活性很高, 但在烟叶中很低, 几乎检测不到。烟株打顶后, 根中酶活性在 24h 内提高 2~16 倍。PMT 活性与烟叶烟碱含量呈正相关, 这无论在高生物碱含量基因型和低生物碱含量基因型植株中均表现相同的规律^[24]。因此对 PMT 进行深入的研究, 采用化学方法有针对性地酶的活性进行调控, 可以有效地调节物质代谢的方向和比例, 从而使烟叶烟碱含量更好地满足烟草工业的需求。

3.2 亚硝酸盐和烟草生物碱是 TSNA_s 的直接前体物质。亚硝酸盐含量是环境影响的结果, 而生物碱的组成和含量, 特别是降烟碱水平则主要由基因所决定。因此, 降低 TSNA_s 水平必须从环境改善和遗传改良两方面入手。此外, 在亚硝酸盐和生物碱生成 TSNA_s 的系列反应中, 亚硝化酶起着决定性的作用。也有人提出设想: 通过化学或生化手段将亚硝化酶选择性地杀死, 或使其活性降低乃至丧失, 阻断 TSNA_s 的形成途径, 从而可以极大地降低烟叶中的 TSNA_s 含量。但这一方法操作起来有相当大的难度, 是否可行还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jeffrey R N, Tso T C. Qualitative differences in the alkaloid fraction of cured tobacco[J]. J Agric Food Chem, 1955(3): 680-682.
- [2] 吕作新, 刘好宝, 刘彩萍. 烟叶烘烤过程中的酶促棕色化反应及其调控途径[J]. 中国烟草科学, 1997(2): 19-21.
- [3] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 朱尊权, 等译. 上海: 上海远东出版社, 1993.
- [4] 陆引罡, 杨婷, 杨宏敏, 等. 烤烟不同生育期蛋白质、烟碱的积累与分配研究[J]. 耕作与栽培, 1997(1): 121-122.
- [5] 胡国松, 郑伟, 王震东, 等. 烤烟营养原理[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [6] 江锡瑜, 肖吉中, 黄立栋, 等. 试论烟碱在烟株内的分布及与栽培因素的关系[J]. 中国烟草科学, 1988(1): 37-41.
- [7] 冉邦定, 刘敬业, 李天福, 等. 烤烟 K326 成熟期物质代谢与品质形成关系的研究[J]. 云南烟草, 1992(3): 48-55.
- [8] 韩锦峰, 郭培国. 不同比例铵态、硝态氮肥对烤烟某些生理指标和产质的影响[J]. 烟草科技, 1989, 26(4): 31-33.
- [9] 刘泓, 杨邦俊, 王伯毅. 有机肥与化肥配施对烤烟品质的影响[J]. 中国烟草科学, 1999(1): 18-21.
- [10] 张新要, 李天福, 刘卫群, 等. 配施饼肥对烤烟叶片含氮

- 化合物代谢及酶活性的影响[J]. 中国烟草科学, 2004 (3): 31-34.
- [11] Nyiredy S, Gross G A, Sticher O. Minor alkaloids from *Nicotiana tabacum* L [J]. *Natural Prod*, 1987, 49(6): 1156-1157.
- [12] Takahashi M, Yamada Y. Regulation of nicotine production by auxins in tobacco cultured cells in vitro [J]. *Agric Biol Chem*, 1973, 37: 1755-1757.
- [13] Yoshida D, Takahashi T. Relation between the behavior of nitrogen and the nicotine synthesis in tobacco plants [J]. *Sci Plant Nutr*, 1961, 7: 157-164.
- [14] 赵钦铭, 王瑞华. 不同烘烤条件下烟叶中有机物质含量变化的研究[J]. 河南农业大学学报, 1996, 30(3): 227-232.
- [15] Bron CW. Chemical changes in tobacco during flue-curing [J]. *Ind Eng Chem*, 1952, 44: 292.
- [16] 张保全, 刘华山, 王凌, 等. 烤烟烘烤过程中烟碱、去甲基烟碱的变化初探[J]. 河南农业科学, 2004(5): 18-20.
- [17] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [18] 李天贵, 周兆德, 黄启为. 氮肥种类对蔬菜产量和品质影响的研究[J]. 湖南农学院学报, 1991, 17(1): 17-22.
- [19] 王秀峰, 张光星, 伊东正. 菠菜收获前营养液中 Cl^- 、 SO_4^{2-} 浓度对叶内 NO_3^- 含量及叶片生长的影响[J]. 园艺学进展, 1998, 607-612.
- [20] 高祖明, 张耀栋, 张道勇, 等. 氮磷钾对叶菜硝酸盐积累和硝酸还原酶、过氧化物酶活性的影响[J]. 园艺学报, 1989, 16(4): 293-297.
- [21] 许自成, 张莉, 石俊雄, 等. 施磷对烤烟硝酸盐、亚硝酸盐含量的影响[J]. 烟草科技, 2003(2): 32-34.
- [22] 李常军, 宫长荣, 李锐, 等. 烘烤过程中烟叶蛋白质与硝态氮代谢规律研究[J]. 河南农业大学学报, 2000, 34(1): 47-49.
- [23] Burton H R, Dye N K, Bush L P. Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue: 1. Tobacco specific nitrosamines, nitrite and alkaloids [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 1050-1055.
- [24] 史宏志, 张建勋. 烟草生物碱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [25] 刘万峰, 王元英. 烟叶中烟草特有亚硝胺(TSNA)的研究进展[M]. 中国烟草科学, 2002(2): 11-14.
- [26] Chamberlain W J, Severson R F, Stephenson M G. Levels of N-nitrosornicotine in tobaccos grown under varying agronomic conditions [J]. *Tob Sci*, 1984, 28: 156-158.
- [27] 宫长荣, 王娜, 司辉, 等. 氮素形态对烤烟烟叶 TSNA 含量的影响[J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(2): 111-113.
- [28] Mirjana, Djordjevic V, Gay S L et al. Tobacco specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines [J]. *J Agric Food Chem*, 1989, 37: 752-756.
- [29] 史宏志, Lowell P Bush, 黄元炯, 等. 我国烟草及其制品中烟草特有亚硝胺含量及与前体物的关系[J]. 中国烟草学报, 2002, 8(1): 14-19.
- [30] Brunnemann K D, Masaryk J, Hoffmann D. Role of tobacco stems in the formation of nitrosamines in tobacco and cigarette mainstream and sidestream smoke [J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31: 1221-1224.
- [31] Fischer S, Spiegelhalter B, Preussmann R. Preformed tobacco specific nitrosamines in tobacco-role of nitrate and influence of tobacco type [J]. *Carcinogenesis*, 1989, 10: 1511-1517.
- [32] 赵华玲. 烟草中特有的亚硝胺化合物[J]. 烟草科技, 1998 (3): 24-26.
- [33] 张树堂, 杨雪彪, 吴玉萍, 等. 烟叶硝酸还原酶活性在烘烤过程中的变化[J]. 中国烟草科学, 2000(4): 11-14.
- [34] Rundlf T, Olsson E, Wiemik A, et al. Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of N-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 4381-4388.
- [35] 魏玉玲, 宋普球, 缪明明. 降低烟草特有亚硝胺含量的微波处理方法综述[J]. 烟草科技, 2002(3): 18-19.
- [36] 赵百东摘译. 美国 StatCureTM烟叶不含 TSNA [J]. 中国烟草学报, 2002, 8(2): 15.