

酒的辐射化学 IV.

辐照的薯干白酒浓缩物对梨形四膜虫 细胞繁殖的毒性作用

朱 燕* 戚生初

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

摘要 研究了酒的浓缩物对梨形四膜虫繁殖的影响。结果发现, d-2, 3-丁二醇和乙醇的浓度分别高达 250 和 1000 ppm 时, 未见对四膜虫繁殖有任何影响。不同批次生产的酒的浓缩物(未辐照)有不同程度的抑制作用。辐照酒的浓缩物的影响更为明显, 且随吸收剂量增加而加强, 这表明辐照酒的浓缩物对四膜虫细胞的毒性作用可能来自所使用的薯干原料, 也可能归因于辐照形成的高沸点产物。

关键词 梨形四膜虫, 2, 3-丁二醇, 乙醇, 辐照, 酒的浓缩物

在酒的辐射化学的系列研究中, 曾报道起始含氧的酒辐照时, 过氧化物(H_2O_2 和有机过氧化物)为主要辐解产物^[1]。它们被认为在人体中可能诱发细胞癌变。随着辐照过程中溶解氧的消耗, 2, 3-丁二醇光学异构体开始形成, 在缺 O_2 条件下成为主要辐解产物。2, 3-丁二醇有三种光学异构体, 即 d-、l-和 meso-2, 3-丁二醇, 其中 l-和 meso-2, 3-丁二醇是酒的天然成分。酒辐照生成的 2, 3-丁二醇是等量的 dl (外消旋体)和 meso (内消旋体)的混合物(meso/dl $\approx$ 1), 也即是说, 酒用电离辐射处理有特征辐解产物d-2, 3-丁二醇形成^[2]。众所周知, 光学异构体常常呈现不同的生理活性。

对比研究酒和乙醇水溶液的辐解, 发现酒辐照时, 水辐解形成的原初活性粒子(H , e_{aq}^- , OH)中约有 1.35 G 单位与酒中高沸点成分反应^[1]。目前, 对这些产物的理化性质及生理效应仍缺乏认识。根据上述讨论, 辐照酒的卫生安全性是亟待研究的课题。

梨形四膜虫是单细胞真核动物, 常用作药物筛选的细胞模型, 具有动物细胞基本构造, 在代谢上更接近高等哺乳动物。本工作测定了辐照前后酒的成分变化, 并以梨形四膜虫为材料研究了辐照酒的浓缩物和 2, 3-丁二醇对其繁殖的影响。

1 实 验

1.1 原料

1.1.1 薯干白酒 使用的薯干白酒为天然发酵过程生产的商品酒。酒精含量 57% (V/V), 合酒精度 57℃, pH 9.04。

1.1.2 薯干白酒浓缩物 酒的浓缩物由常压蒸馏辐照和未辐照薯干白酒得到, 馏出物的蒸汽温度控制小于 91℃。为了尽可能减少被浓缩物的受热时间, 采用分批多次浓集方法。浓缩酒样中乙醇浓度应控制在 1000 ppm 之内。不同浓集倍数的酒样用 3 次重蒸水稀释最高浓集倍数的样品制得。

1.1.3 meso/dl $\approx$ 1 的 2, 3-丁二醇配制 酒辐照形成的 2, 3-丁二醇光学异构体分布为 meso/dl $\approx$

* 现在卫生部食品卫生监督检验所

收稿日期: 初稿 1992-03-02, 修改稿 1992-07-20

[1^[3]。实验中用市售 meso/dl = 1:6 和 7:1 的 2,3-丁二醇配制 meso/dl = 1 的 2,3-丁二醇,并用它配制成 10—1000 ppm 含量的水溶液。

1.2 四膜虫实验

1.2.1 虫种 选用北京株梨形四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*) BJ 11 的无性繁殖系。细胞株于 1979 年建株,具有下列特征:细胞长 43.4 μm ,宽 28.9 μm ,含一个大核(直径 11.1 μm)和一个小核(直径 1 μm),致死温度 38℃。

1.2.2 四膜虫的培养和接种 2%聚脲培养液(含 1% d-葡萄糖)灭菌(120—1500 Pa, 117—121℃, 20 min)后,向其中移入虫种,于 28℃的培养箱中培养 24 h。

在酒精灯火焰上方将培养的四膜虫接种于 25 ml 灭菌的含待测物的培养液中,开始时控制虫口密度在 10—20 个/20 μl 之间,然后在 28℃培养箱中培养,约经 12 h 取样一次测量虫口密度。

1.2.3 虫口密度测定 从培养箱中取出样品并摇匀,在酒精灯火焰上方取出 1 ml 样品置于小试管中,取 20 μl 样品置于刻度载片上(从 1 ml 样品中取),加 1—2 滴 Lugol 溶液(即 KI + I₂ 水溶液)杀死虫群并使之着色,在显微镜下计数。每个样品平行测定两次。

1.2.4 数据处理 将每一时期测得的细胞计数定为 N,时间零时的细胞计数定为 N₀,作 lgN/N₀-(时间)图。

1.3 辐照前后薯干白酒组成的测定

用化学法测定总酸、总酯、总醛、甲醇和过氧化物^[3,4]。其它成分用气相色谱法测定,使用岛津 GC-9 A 气相色谱仪,10%PEG-20 M 玻璃填充柱(3.0 mm × 2.1 m)和 FID 检测器。测定乙酸乙酯、己酸乙酯、正丙醇、异丁醇和乙醛等,进样口温度 150℃,初始柱温 60℃,6 min 后以 5℃/min 程序升温至 125℃;测定乳酸乙酯和 2,3-丁二醇时,进样口和起始柱温分别为 200 和 100℃,程序升温至 170℃。

2 结 果

2.1 辐照前后薯干白酒成分变化

表 1 列出了薯干白酒辐照前后成分的变化,同时也给出了不同批次生产的酒组成变化。比较辐照和未辐照酒的组成及峰面积,以 5 × 10⁴ Gy 剂量辐照薯干白酒,乙醛含量明显增加,其它成分未见明显变化。值得注意的是,除了仲丁醇 t_r = 4.427 min 和 2,3-丁二醇外,还出现了保留时间 12.02 min 的新未知物。而在汤沟大曲、尖庄或西凤等市售酒中和 1 × 10⁴ Gy 剂量辐照的薯干白酒中均未检测到这种产物。不同批次生产的白酒,其组成及相对含量也不尽相同。保留时间 1.48 min 的未知物(样 A)在市售酒中可以找到;保留时间 5.366 min 和 5.878 min 的未知物(样 B),在上述市售酒中均未发现。不同批次酒中成分差异可能与使用的薯干原料不同有关。

图 1 展示了酒中诸成分的浓度与吸收剂量关系。总过氧化物和 2,3-丁二醇数据参看文献[1]和[2]。从图 1 看出,实验剂量范围内总酯、总酸、正丙醇、异丁醇、己酸乙酯和乳酸乙酯的含量几乎不随吸收剂量而变化,乙酸乙酯含量略有下降,甲醇、总醛和乙醛的浓度随吸收剂量而增加。酒中未知物(保留时间为 5.366 和 5.878 min)的含量不随吸收剂量而变化。乙醛是酒香的主要物质,但醛对肌体有害。2,3-丁二醇可以增加酒的甜味并给酒带来丰满的醇厚感,但它不是酒的天然成分,且不同光学异构体常呈现不同的生理活性,因此需研究它们的卫生安全性。

2.2 2,3-丁二醇光学异构体对梨形四膜虫繁殖的影响

实验结果显示,2,3-丁二醇异构体(meso/dl = 1)在 10—1000 ppm 浓度范围内,对四膜虫生长没

Tab 1. The composition of liquor determined by GC before and after irradiation

A			B		
Unirradiation		Irradiation (5×10^4 Gy)	Unirradiation		
Composition	Peak area	Composition	Peak area	Composition	Peak area
CH_3CHO (0.867)	791 $\pm$ 12	CH_3CHO (0.864)	13149 $\pm$ 268	CH_3CHO (0.840)	210 $\pm$ 11
Unknown(1.48)	250 $\pm$ 1	Unknown(1.473)	289 $\pm$ 1	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 + \text{CH}_3\text{OH}$ (1.984)	38789 $\pm$ 303
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 + \text{CH}_3\text{OH}$ (2.065)	$2.56 \times 10^4 \pm 785$	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 + \text{CH}_3\text{OH}$ (2.074)	27753 $\pm$ 703	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (2.425)	$2.1 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^9$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (2.525)	$2.0 \times 10^7 \pm 2.0 \times 10^5$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (2.534)	2.1×10^7	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (4.646)	2769 $\pm$ 31
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (4.882)	8704 $\pm$ 168	Unknown(4.427)	1128 $\pm$ 48	Unknown(5.336)	4936 $\pm$ 53
$\text{iso}-(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (6.998)	3321 $\pm$ 59	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (4.885)	8971 $\pm$ 223	Unknown(5.878)	57062 $\pm$ 697
$\text{iso-pentyl alcohol}$ (11.482)	950 $\pm$ 7	$\text{iso}-(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (7.045)	3447 $\pm$ 76	$\text{iso}-(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (6.752)	282 $\pm$ 10
ethyl caproate(12.683)	814 $\pm$ 27	$\text{iso-pentyl alcohol}$ (11.516)	1002 $\pm$ 27	ethyl caproate(12.421)	344 $\pm$ 11
ethyl lactate(16.116)	426 $\pm$ r3	Unknown(12.020)	448 $\pm$ 14	ethyl lactate(15.85)	10693 $\pm$ 81
		ethyl caproate (12.729)	775 $\pm$ 29		
		ethyl lactate(16.147)	468 $\pm$ 11		
		2,3-butanediol(23.224)	56448		

A and B refer to the different batch liquors

The numerical date in the parentheses represent retention time/min

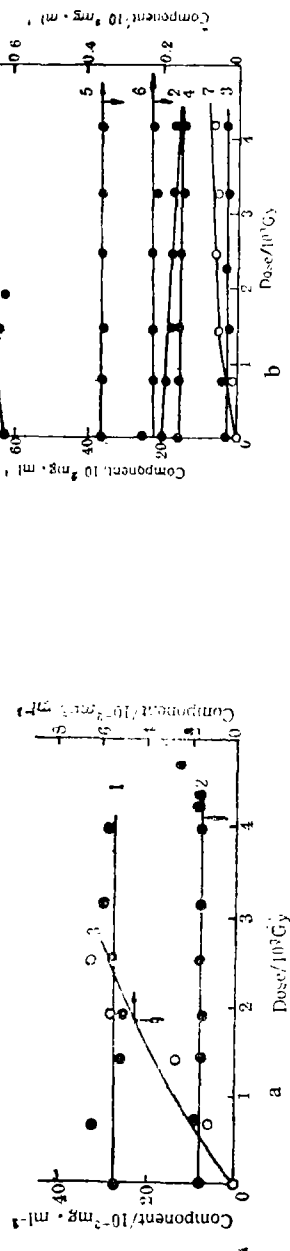


Fig 1. Relationship of the content of various composition in liquor with absorbed dose

a: (1) total ester (2) total acid (3) total aldehyde

b: (1) CH₃OH (2) CH₃CO₂C₂H₅ (3) n-C₄H₉OH (4) ethyl lactate(5) iso-(CH₃)₂CH₂CH₂OH (6) ethyl caproate (7) CH₃CHO

有影响,也即是说,d-2,3-丁二醇含量高至250 ppm时,未见对四膜虫的细胞生长有抑制作用。

2.3 乙醇对四膜虫细胞繁殖的影响

乙醇在10—1000 ppm浓度范围内,对四膜虫细胞繁殖也没有影响,因此研究酒浓缩物对四膜虫影响时,浓缩物中残留的乙醇量应控制在1000 ppm之内。

2.4 酒浓缩物对四膜虫细胞繁殖的影响

图2为未辐照薯干白酒浓缩物对梨形四膜虫细胞繁殖的影响。可以看出,不同批次生产的酒

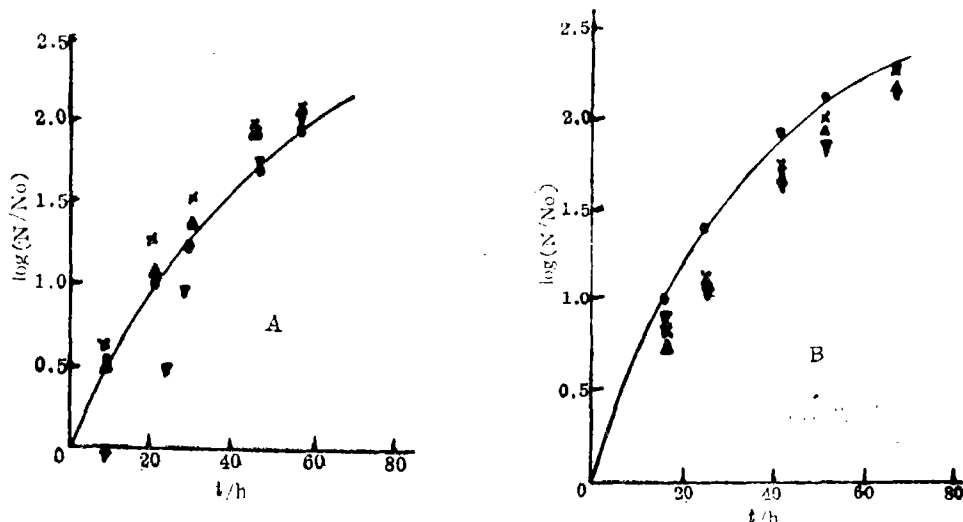


Fig 2. Effect of the concentrate of unirradiated liquors on the proliferation of tetrahymena pyriformis

A, Sample A

- (●) Blank
- (×) 1.02-fold concentrate
- (▲) 3.07-fold concentrate
- (▼) 7.18-fold concentrate

B, Sample B

- (●) Blank
- (×) 2.8-fold concentrate
- (▲) 7.0-fold concentrate
- (▼) 12.0-fold concentrate

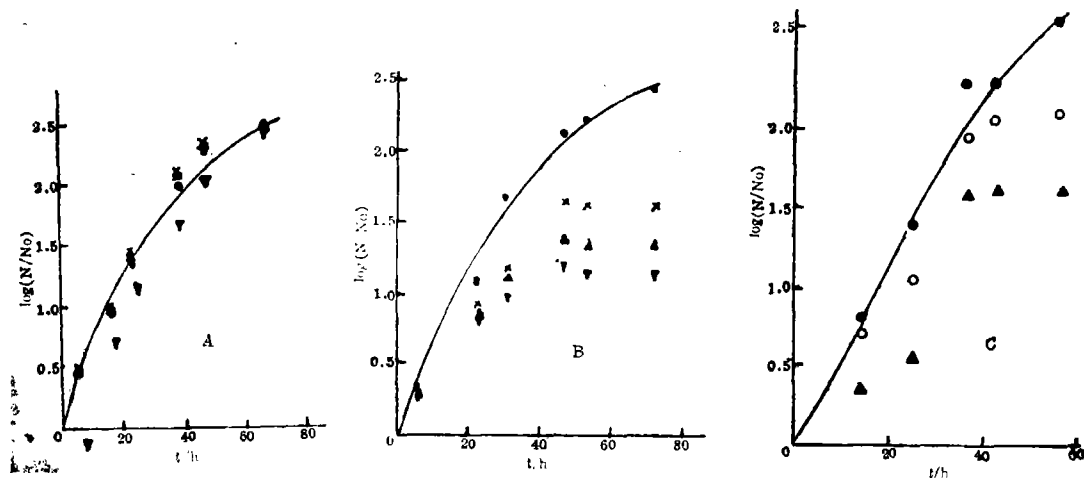


Fig 3. Effect of the concentrate of liquor irradiated by different dose on proliferation of tetrahymena pyriformis

A, Sample A

- (●) Blank
 - (×) 0.99-fold concentrate
 - (▲) 2.96-fold concentrate
 - (▼) 6.92-fold concentrate
- dose: 10^4Gy

B, Sample B

- (●) Blank
 - (×) 2.8-fold concentrate
 - (▲) 7.0-fold concentrate
 - (▼) 12.0-fold concentrate
- dose: 10^4Gy

C, Sample B

- (●) Blank
 - (○) 6.0-fold concentrate
 - (▲) 16.0-fold concentrate
- dose: $3 \times 10^3\text{Gy}$

的浓缩物对四膜虫繁殖均有不同程度的抑制作用。酒样 A 仅在浓集倍数较大(约 7 倍)时, 在培养期的初期呈现轻微的影响; 酒样 B 在研究的浓集倍数(2.8—12 倍)下均有抑制作用, 且随浓集倍数的增加而增加。

从图 3 可以看出, 酒样经 10^4Gy 剂量辐照后, 样 A 在浓缩约 7 倍时, 才对细胞繁殖产生抑制作用, 这种影响比浓缩倍数相同的未辐照酒的浓缩物明显(比较图 2 样 A)。同样剂量辐照的 B 样浓缩物对四膜虫细胞生长有强烈的抑制作用, 其影响随浓集倍数而增加。图 3 表明, 辐照酒浓缩物对四膜虫细胞繁殖的抑制作用有剂量效应, 10^4Gy 剂量辐照的酒的浓缩物比 $3 \times 10^3\text{Gy}$ 剂量辐照的酒的浓缩物呈现更强烈的抑制作用。

3 讨 论

模拟酒辐照生成的 2, 3-丁二醇光学异构体分布(meso/dl $\approx$ 1), 证明 2, 3-丁二醇的量高至 1000 ppm, 对四膜虫细胞繁殖不产生任何影响。在待测物中 d-2, 3-丁二醇浓度最高达 250 ppm, 繁此量约为酒在辐射加工剂量下产生的 d-2, 3-丁二醇量的 25 倍, 因此辐照酒浓缩物对四膜虫细胞繁殖的抑制作用不可能归因于特征辐解产物 d-2, 3-丁二醇。

不同批次生产的薯干白酒浓缩物(未辐照)对四膜虫细胞繁殖呈现不同的抑制作用(图 2), 表明在原始的薯干白酒中就存在影响四膜虫细胞正常繁殖的成分, 它们可能来源于所使用的薯干原料并可能影响白酒的卫生质量。

比较图 2 和图 3 结果, 辐照后酒的浓缩物对四膜虫细胞的毒性比未辐照的更为明显, 并随吸收剂量增加而增加, 这表明辐照形成了高沸点产物, 它们中的一些成分对四膜虫细胞呈现毒性, 这与文献[1]中观测到水的辐解产物中有 1.35 G 单位与酒的高沸点成分反应相一致。

参 考 文 献

- 1 戚生初, 范绍华, 吴季兰. 辐射研究与辐射工艺学报, 1991, 9(3): 150
- 2 戚生初, 李钟哲等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1989, 7(2): 34
- 3 上海商品检验局主编. 食品化学分析. 上海科学技术出版社, 1979
- 4 吴季兰等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1989, 7(1): 61

RADIATION CHEMISTRY OF LIQUOR IV. THE EFFECT OF THE CONCENTRATE OF IRRADIATED LIQUOR MADE FROM DRIED SWEET POTATO ON THE PROLIFERATION OF TETRAHYMENA PYRIFORMIS

Zhu Yan Qi Shengchu
(Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT In this paper, the effect of the concentrate of liquor made from dried sweet potato on the proliferation of tetrahymena pyriformis has been studied. The toxicity of d-2, 3-butanediol and ethanol have also been investigated by the tetrahymena pyriformis and it has been found that they didn't produce the effect on the propagation of the cell up to 250 and 1000 ppm, separately. The unirradiated concentrate of the different batch liquors all appear more or less the inhibition on the proliferation of tetrahymena pyriformis. The effect is more remarkable for the concentrate of the irradiated liquors and is strengthened as increase of absorbed dose. It shows that the toxicity of the concentrate of the irradiated liquor to tetrahymena pyriformis may be related to the quality of the dried sweet potato used and the formation of radiolytic products with higher boiling point.

KEYWORDS Tetrahymena pyriformis, d-2, 3-Butanediol, Ethanol, Irradiation, Concentrate of liquor