

CTQTC

国家烟草质量监督检验中心实验室方法

Q/CTQTC 125—2021

电子烟雾化物添加剂 茶多酚的测定

Additive in E-atomization Material —Determination of Total Polyphenols

国家烟草质量监督检验中心

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由国家烟草质量监督检验中心提出。

本文件起草单位：国家烟草质量监督检验中心。

电子烟雾化物添加剂 茶多酚的测定

1 范围

本文件规定了电子烟雾化物中茶多酚的测定分析方法。

本文件适用于电子烟雾化物中茶多酚的测定。

2 规范性引用文件

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 紫外可见分光光度法

4.1 原理

用70%的甲醇溶液萃取雾化物，紫外可见分光光度法测定萃取液中的目标化合物含量。

4.2 试剂与材料

除特别要求以外，均应使用分析纯级或以上试剂。

4.2.1 水，应为蒸馏水或至少应达到 GB/T 6682 三级水的水平。

4.2.2 乙腈，色谱纯。

4.2.3 甲醇，色谱纯。

4.2.4 碳酸钠 (Na_2CO_3)。

4.2.5 没食子酸 (GA) 标准品，纯度不低于 95%。

4.2.6 福林酚 (Folin-Ciocalteu): 1mol/L。

4.2.7 10%福林酚 (Folin-Ciocalteu) 溶液: 将 20 mL 福林酚 (Folin-Ciocalteu) (4.2.6) 转移至 200 mL 容量瓶中，用水定容。现配现用。

4.2.8 7.5%碳酸钠溶液: 称取 37.5g 碳酸钠 (4.2.4)，加适量水溶解，转移至 500 mL 容量瓶中，用水定容。现配现用。

4.2.9 没食子酸标准储备溶液 (1mg/mL): 称取 0.1g 没食子酸 (4.2.5) 于 100 mL 容量瓶中，精确至 0.1mg，用水定容。-18℃及以下避光储存，有效期为 3 个月。

4.2.10 没食子酸标准工作溶液: 将标准储备液 (4.2.9) 逐级稀释，制备至少 6 级标准工作溶液，质量浓度范围宜为 0.001mg/mL~0.1 mg/mL。-18℃及以下避光储存，有效期为 3 个月。

4.3 仪器设备

4.3.1 分析天平，感量为 0.1 mg。

4.3.2 紫外分光光度计。

4.3.3 超声波发生器。

4.3.4 离心机，转速不小于 3500 转/分钟。

4.4 样品前处理

称取 0.5 g 样品于 15 mL 具塞离心管，精确至 0.1 mg，加入 5 mL 70%甲醇溶液，加入 0.5g 分散固相萃取净化试剂，超声萃取 60 min。移取电子烟烟液样品萃取液 1.0 mL 于 5 mL 容量瓶中，用水定容；移取固态雾化物样品萃取液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水定容。

4.5 样品测定

分别移取没食子酸工作液 (4.2.10) 和萃取液 (4.4) 各 1.0 mL 于刻度试管内，在每个试管内分别加入 5.0 mL 的 10%福林酚 (Folin-Ciocalteu) 溶液 (4.2.7)。反应 3-8 分钟，加入 4.0 mL 7.5%碳酸钠溶液 (4.2.8)，用水定容，室温下放置 60 分钟。用 10 mm 比色皿、在 765 nm 波长条件下用紫外分光光度计测定吸光度。

4.6 结果计算与表述

雾化物中茶多酚的含量按式 (1) 计算。

$$X = \frac{C \times V}{m} \times d \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——雾化物中目标化合物的含量，单位为毫克每克（mg/g）；

C ——样品溶液中目标化合物的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V ——样品溶液的体积，单位为毫升（mL）；

d ——稀释因子；

m ——雾化物质量，单位为克（g）。

以两次平行测定结果的算术平均值为最终测定结果，精确至0.01 mg/g。

当测定结果小于1.00 mg/g时，两次平行测定结果的绝对差值不应大于0.10 mg/g；当测定结果为1.00～10.00 mg/g时，两次平行测定结果的相对偏差不应大于10%；当测定结果大于10.00 mg/g时，两次平行测定结果的相对偏差不应大于5%。

当测定结果超出最大使用量时采用高效液相色谱法测定。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

用70%的甲醇溶液萃取雾化物，高效液相色谱法测定萃取液中的目标化合物含量。

5.2 试剂与材料

除特别要求以外，均应使用分析纯级或以上试剂。

5.2.1 水，应为蒸馏水或至少应达到 GB/T 6682 三级水的水平。

5.2.2 甲醇，色谱纯。

5.2.3 乙腈，色谱纯。

5.2.4 乙酸。

5.2.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）溶液：10 mg/mL，现配现用。

5.2.6 抗坏血酸溶液：10 mg/mL，现配现用。

5.2.7 稳定溶液：将25 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（5.2.5），25 mL抗坏血酸溶液（5.2.6）和50 mL乙腈（5.2.3）加入500 mL容量瓶中，用水定容。现配现用。

5.2.8 标准品：表儿茶素（EC）、表没食子儿茶素（EGC）、表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）、表儿茶素没食子酸酯（ECG）和儿茶素（C），纯度不低于 95%。

5.2.9 标准溶液

5.2.9.1 标准储备液

称取 0.05 g 表儿茶素（EC）、表没食子儿茶素（EGC）、表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）、表儿茶素没食子酸酯（ECG）和 0.10 g 儿茶素（C）于 50 mL 棕色容量瓶中，精确至 0.1 mg，用甲醇定容。-18℃及以下避光储存，有效期为 3 个月。

5.2.9.2 标准工作溶液

用稳定溶液（5.2.7）将标准储备液（5.2.9.1）逐级稀释，制备至少 5 级标准工作溶液。儿茶素（C）质量浓度范围宜为 0.0003 mg/mL~0.15 mg/mL，表儿茶素（EC）、表没食子儿茶素（EGC）、表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）和表儿茶素没食子酸酯（ECG）质量浓度范围宜为 0.00015 mg/mL~0.075 mg/mL。-18℃及以下避光储存，有效期为 3 个月。

5.3 仪器设备

常用实验仪器及下述各项：

5.3.1 分析天平，感量为 0.1 mg。

5.3.2 高效液相色谱仪，配紫外或二极管阵列检测器。

5.3.3 超声波发生器。

5.3.4 离心机，转速不小于 3500 转/分钟。

5.4 分析步骤

5.4.1 样品前处理

称取 0.5 g 样品于 15mL 离心管中，精确至 0.1 mg，加入 5 mL 70%甲醇溶液，加入 0.5 g 分散固相萃取净化试剂后超声萃取 60 min。

移取1 mL萃取液于10 mL容量瓶中，用稳定溶液（5.2.7）定容至刻度，采用0.45 μm有机相滤膜过滤于色谱瓶中待测。

5.4.2 高效液相色谱条件

以下分析条件可供参考，采用其他条件应验证其适用性：

——色谱柱：C18色谱柱，150 mm（长度）× 4.6 mm（内径），5 μm（粒径），或等效柱；

——流动相 A：移取 90 mL 乙腈（5.2.3），20 mL 乙酸（5.2.4），2 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（5.2.5）于 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

——流动相B：移取800 mL乙腈（5.2.3），20 mL乙酸（5.2.4），2 mL乙二胺四乙酸二钠溶液（5.2.5）于1000 mL容量瓶中，用水定容。

——流速：1 mL/min；

——色谱柱温度：40℃；

——进样体积：10 μL；

——洗脱方式：梯度洗脱；

——检测器：紫外或二极管阵列检测器，波长278 nm。

表1 高效液相色谱仪淋洗梯度

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	96	4
17	70	30
19	96	4
20	96	4

5.4.3 标准工作曲线绘制

按照高效液相色谱条件（5.4.2）测定标准工作溶液（5.2.9.2），以目标化合物峰面积和浓度建立标准工作曲线。

每20次样品测定后应加入一个中等浓度的标准工作溶液，如果测得的值与原值相差超过5%，则应重新制作标准工作曲线。

5.4.4 样品测定

按照高效液相色谱条件（5.4.2）测定样品溶液（5.4.1）。

若样品溶液（5.4.1）测定浓度超出标准工作曲线范围，则用稳定溶液（5.2.7）适当稀释后重新进样。每个样品平行测定两次。

5.5 结果计算与表述

雾化物中茶多酚的含量按式（2）计算。

$$X = \frac{C \times V}{m} \times d \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X——雾化物中目标化合物的含量，单位为毫克每克（mg/g）；

C——样品溶液中目标化合物的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V——样品溶液的体积，单位为毫升（mL）；

d ——稀释因子；
 m ——雾化物质质量，单位为克（g）。

茶多酚含量以表没食子儿茶素（EGC）、儿茶素（C）、表儿茶素（EC）、表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）和表儿茶素没食子酸酯（ECG）的总和计。

以两次平行测定结果的算术平均值为最终测定结果，精确至0.01 mg/g。

当测定结果小于1.00 mg/g时，两次平行测定结果的绝对差值不应大于0.10 mg/g；当测定结果为1.00～10.00 mg/g时，两次平行测定结果的相对偏差不应大于10%；当测定结果大于10.00 mg/g时，两次平行测定结果的相对偏差不应大于5%。

5.6 回收率、检出限和定量限

本方法回收率、检出限和定量限见表2。

表2 方法回收率、检出限和定量限结果

化合物	回收率 %	检出限 mg/g	定量限 mg/g
表没食子儿茶素(EGC)	97.1~102.3	0.0012	0.0040
儿茶素(C)	99.7~102.9	0.0012	0.0041
表儿茶素(EC)	99.1~100.4	0.0005	0.0016
表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)	99.1~104.3	0.0015	0.0049
表儿茶素没食子酸酯(ECG)	96.0~102.7	0.0007	0.0024

6 试验报告

- 试验报告应包括以下内容：
- 识别被测样品需要的所有信息；
 - 依据本试验方法；
 - 试验结果；
 - 试验日期；
 - 试验人员。

附录 A
(资料性)

目标化合物中文英文名称对照索引

目标化合物中文英文名称对照索引见表 A.1。

表 A.1 目标化合物中文英文名称对照索引

序号	中文名	英文名	CAS 编号
1	表儿茶素	(-)-epicatechin	490-46-0
2	表没食子儿茶素	(-)-epigallocatechin	970-74-1
3	表儿茶素没食子酸酯	(-)-epicatechin gallate	1257-08-5
4	表没食子儿茶素没食子酸酯	(-)-epigallocatechin gallate	989-51-5
5	儿茶素	(+)-catechin	154-23-4
6	没食子酸	Gallic acid	5995-86-8

附录 B
(资料性)
标准工作溶液色谱图示例

标准工作溶液色谱图示例见图 B.1。

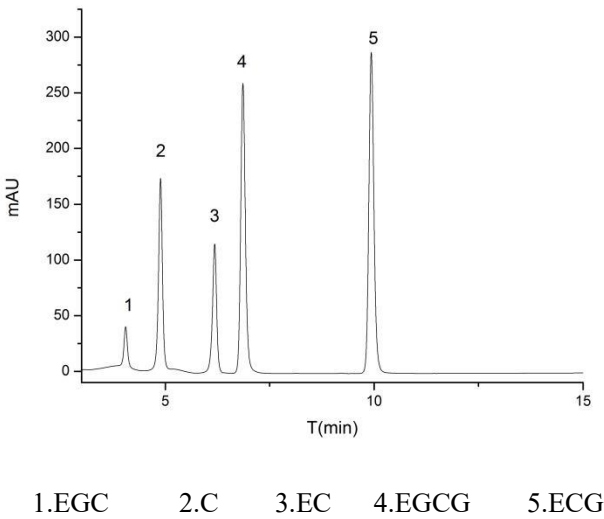


图 B.1 标准工作溶液色谱图示例
