

主流卷烟烟气中气相自由基测定方法的改进

周骏^{1,3}, 吴可², 孙岳³, 丛建波², 王长振², 常翔³, 先宏², 朱永法¹

(1. 清华大学化学系, 北京 100084; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;

3. 北京卷烟厂技术中心, 北京 100024)

摘要 按照 ISO 4387标准进行吸烟, 通过自行研制的捕集装置, 以 2-苯叔丁基硝酮 (PBN)的四氯化碳溶液捕集气相自由基. 将捕集到气相自由基的溶液先用液氮冷冻, 再定时解冻以抑制其衰减, 并有效地去除氧气对气相自由基定量分析的干扰, 获得理想的测定重复性. 用电子顺磁共振波谱仪 (EPR)检测气相自由基, 以 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧 (TEMPO)作为标准样品, 以碳酸钙稀释的煤粉作为校正样品, 定量计算气相自由基. 测定方法有较好的重复性和较高的灵敏度, 可以满足日常卷烟烟气气相自由基的定量分析的需要.

关键词 主流卷烟烟气; 气相自由基; 定量分析; 电子顺磁共振

中图分类号 O657.2

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)10-1846-06

早在 20 世纪 50 年代末, 人们就已经开始了对卷烟烟气中自由基的研究^[1-3]. 目前, 对卷烟烟气中自由基检测方法已有大量的研究报道^[4-24]. 卷烟烟气中的自由基可分为固相自由基 (或称焦油相自由基) 和气相自由基两种. 固相自由基的颗粒直径一般大于 0.3 μm , 可以用普通的醋纤滤嘴有效地去除, 通过剑桥滤片 (Cambridge filter) 可以收集到, 其主要由醌/半醌类自由基组成. 它们比较稳定, 可以用电子顺磁共振波谱仪 (EPR) 直接观测. 醌/半醌类自由基在人肺中可以同氧反应生成活性氧自由基, 从而导致一系列毒理反应. 其它固相自由基也有不同程度的毒性. 气相自由基可以穿过剑桥滤片, 不能用普通的醋纤滤嘴有效地去除. 它们主要由烷基 ($\text{R}\cdot$) 和烷氧基 ($\text{RO}\cdot$) 自由基组成. 这类自由基不稳定, 不能用 EPR 直接观测, 需要用自旋捕集技术, 即将自旋捕获剂溶于溶剂中或粘附在胶体柱上, 使卷烟烟气通过溶液或胶体柱, 捕获烟气中的烷基和烷氧基自由基, 然后在 EPR 上检测自旋加合物的 EPR 波谱信号, 由得到的 EPR 波谱信号进行分析. 烷基和烷氧基可以参与脂质过氧化等重要生化反应, 从而对人体产生危害^[4-8]. Pryor 等^[4,5]认为烟气中的活性氧自由基与吸烟致癌有关. 烟气中这些高浓度的自由基会消耗生物体内的抗氧化剂, 产生氧化应激 (Oxidative stress)^[9], 导致自由基攻击不饱和脂肪酸、蛋白质、氨基酸和 DNA, 使之发生变性而产生疾病^[10-12]. 吸烟者戒烟后, 反映氧化应激水平的全血谷胱甘肽浓度显著提高^[13]. 吸烟同样是动脉粥样硬化和心肌梗塞的主要因素^[14]. 因此无论对卷烟烟气中有害成分进行日常监测的需要, 还是为降低卷烟烟气中有害自由基的技术研究提供必备手段, 研究建立一套能准确定量分析卷烟烟气中气相自由基的分析方法都是十分必要的.

$\text{RO}\cdot$ 和 $\text{R}\cdot$ 寿命虽然很短 ($<1\text{ s}$)^[12], 但在烟气中存在 5 min 后仍然能被检测到. 对于这种矛盾的现象, Pryor 等^[16]提出了吸烟过程中烟气气相自由基形成的稳态假说, 认为卷烟燃烧最初生成的 NO 与烟气流中的氧气反应生成 NO_2 , NO_2 又与烟气中的烯烃反应生成 $\text{R}\cdot$, $\text{R}\cdot$ 很容易被氧化成 $\text{RO}\cdot$, 并通过模拟试验得到的类似烟气气相自由基的 EPR 波谱证实了此假说. 文献 [12, 16, 17, 20] 中的方法和对卷烟烟气中自由基的分析主要是定性分析, 个别的定量分析方法差异很大, 甚至连卷烟的抽吸方法都不一致. 由于分析方法不统一, 造成了在判断和衡量降低卷烟烟气中自由基效果上的混乱^[23, 24]. 近年来, 对卷烟烟气中自由基的测定方法的研究已经有了新的进展^[25, 26]. 但这些方法仍然存在较大的缺陷, 均没有很好地解决气相自由基的衰减问题. 在烟气气相自由基的测定方面, 使用不同的测定方法

收稿日期: 2007-04-29.

基金项目: 国家烟草专卖局烟草科学研究与技术开发项目 (批准号: 0707-5) 和国家烟草专卖局标准化研究项目 (批准号: 2002B011) 资助.

联系人简介: 朱永法, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事材料分析研究. E-mail: zhuyf@mail.tsinghua.edu.cn

对同一样品进行测定, 结果差异很大, 有的甚至是在数量级上的差异. 造成这些问题的原因是多方面的: 有捕集方法不同的原因, 如不同的捕集装置, 不同的捕集溶液 (浓度、体积); 还有采用不同的除氧方法的原因; 有采用不同的测定条件的原因等等. 特别是在降低气相自由基的衰减和自由基捕集溶液的除氧的问题上, 一直未能兼顾两方面效果的有效方法. 另外, 定量计算方法的不一致和种种缺陷^[23, 24, 26], 使得用不同的电子顺磁共振波谱仪 (EPR) 测定同一样品, 得到的结果亦存在很大差异.

本文按照符合国际标准的卷烟的抽吸方法完善气相自由基的捕集方法, 将传统的降低气相自由基的衰减技术和自由基捕集溶液的除氧的技术结合起来, 采用 EPR 自旋信号长期稳定的煤标样作为校准样品用于卷烟烟气中气相自由基的测定, 解决了使用不同的电子顺磁共振波谱仪 (EPR) 采用同样的方法测定同一样品而结果差异很大的问题.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

己烷、苯、四氯化碳及甲苯均为分析纯; 碳酸钙 (分析纯), 粒径 200 目; 强煤粉 (Bruker 公司); 2-苯基叔丁基硝酮 (*N*-*t*-Butyl-phenylnitron, PBN, 纯度 98%, Sigma 公司); 5,5-二甲基吡咯啉氮氧化物 (5,5-Dimethyl-1-pyrroline-1-oxide, DMPO, 纯度为 97%, Sigma 公司); 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧 (2,2,6,6-Tetramethylpiperidiny-1-oxyl, TEMPO, 纯度 98%, Sigma 公司).

SM-5 直线型常规分析用吸烟机 (KC Automation); 皂膜流量计 (Cerulean 公司); 烟支重量分选仪 (Cerulean 公司); 吸阻与透气度测定仪 (Cerulean 公司); IM 1000 恒温恒湿箱 (Claison 公司); EMX-6 型电子顺磁共振波谱仪 (Bruker 公司).

1.2 实验过程

将烟支置于温度 (22 ± 1) °C, 相对湿度 (60 ± 2) % 的恒温恒湿箱中, 平衡 48 h 以上. 取出 200 支称重, 并求出烟支平均重量. 用重量分选仪选取平均烟支重量 ± 0.02 g 范围以内的烟支为重量合格烟支. 将重量分选合格的烟支进行吸阻测定, 并求出平均值. 选取平均吸阻 ± 49 Pa 范围内的烟支为抽吸卷烟, 进行烟蒂长度的标记.

将已在测试大气中调节至少 12 h 的剑桥滤片 (Whatman) 放入烟气捕集器中, 剑桥滤片的粗糙面应面对烟气进入的方向, 合上烟气捕集器, 检查烟气捕集器, 应装配严密不漏气. 用四氯化碳为溶剂配制浓度为 0.05 mol/mL 的 PBN (DMPO) 溶液, 采用自制的捕集装置捕集烟气自由基. 加入 8 mL 浓度为 0.05 mol/mL 的自由基捕集溶液到捕集装置中, 将捕集装置连接到 5 孔道吸烟机上, 按 ISO 4387 的方法进行吸烟实验^[27]. 吸烟结束后, 收集自由基与 PBN 加合物的溶液, 立即装入塑料离心管中, 置于液氮中储存. 启动 EPR, 预热 1 h, 校腔, 设置参数. 采用 EMX-6 型电子顺磁共振波谱仪测定 EPR 谱: 测试温度: 295 K; 调制频率: 100 kHz; 调制幅度: 0.10 mT; 扫场宽度: 10.0 mT; 扫描时间: 41.90 s; 中心磁场: 3512 mT; 微波功率: 10 mW; 时间常数: 10.24 ms, X 波段.

每次从液氮中取待测样品一支, 置于 30 °C 恒温水浴中解冻并开始计时. 计量解冻溶液体积, 取 200 μL 于直径为 3 mm 的高精度石英管中, 然后置于 EPR 矩形谐振腔内, 3 min 时开始检测.

1.3 标准回归曲线的制作及气相自由基的定量计算

用 CCl_4 配制浓度分别为 0.25×10^{-5} , 0.50×10^{-5} , 1.00×10^{-5} , 2.00×10^{-5} , 2.50×10^{-5} 和 5.00×10^{-5} mol/L (精确到 0.01×10^{-5} mol/L) 的 TEMPO 标准溶液. 将 TEMPO 标准溶液在 1.2 节所述条件下进行测定, 记录其双积分信号强度. 用碳酸钙稀释强煤使其 EPR 信号强度小于最高浓度的 TEMPO 标准溶液的双积分信号强度, 作为检测校准样品, 记录其双积分信号强度. 将 TEMPO 标准溶液各浓度点按式 (1) 换算为自旋数 (N).

$$N = c \times 6.023 \times 10^{23} \times V \quad (1)$$

式中, c 为 TEMPO 标准溶液浓度 (mol/L); V 为 TEMPO 标准溶液的检测体积 (200 μL).

测量各浓度 TEMPO 标准溶液与强煤的 EPR 双积分信号强度 I_1 和 I_2 . 以比值 $R = I_1 / I_2$ 对 TEMPO 标准溶液各浓度对应的自旋数 (N) 做标准回归曲线, 回归分析关系方程式如下:

$$R = cN + d \quad (2)$$

式中 c 和 d 分别为回归曲线的斜率和截距, N 的单位为 $\times 10^{14}$ 自旋数 (spins).

按 1.2 节中的条件测量气相自由基与 PBN 加合物溶液的信号强度为 I_1 , 将 I_1 与同时测量的煤样品的 EPR 双积分信号强度 I_0 的比值 $R_0 = I_1 / I_0$ 代入式 (2) 可求出 N 值. 每支卷烟烟气气相自由基的自旋数 (N_1) 可由式 (3) 计算出:

$$N_1 = N \times V_0 / V_1 \quad (3)$$

式中, V_0 为吸烟后气相自由基与 PBN 加合物的体积 (μL); V_1 为实际检测所用气相自由基与 PBN 加合物体积 ($200 \mu\text{L}$). 将抽吸的 20 支卷烟的烟气中的气相自由基含量进行平均, 则得到该种卷烟的烟气气相自由基含量, 单位为自旋数 / 支 (spins/cig).

2 结果与讨论

2.1 自由基捕获剂的确定

实验中采用的两种自旋捕获剂 PBN 和 DMPO 均可以捕获并检测到烟气中自由基信号. 从 EPR 波谱形态来分析, 气相自由基与 PBN 加合物是较为规则的三线谱, 有利于定量分析和计算. 气相自由基与 DMPO 加合物获得的是不规则波谱, 波谱成分相对较复杂 (见图 1), 且寻找与其波谱形态相似的标准样品也较困难. 考虑到上述情况, 目前 PBN 是较理想的气相自由基捕获剂.

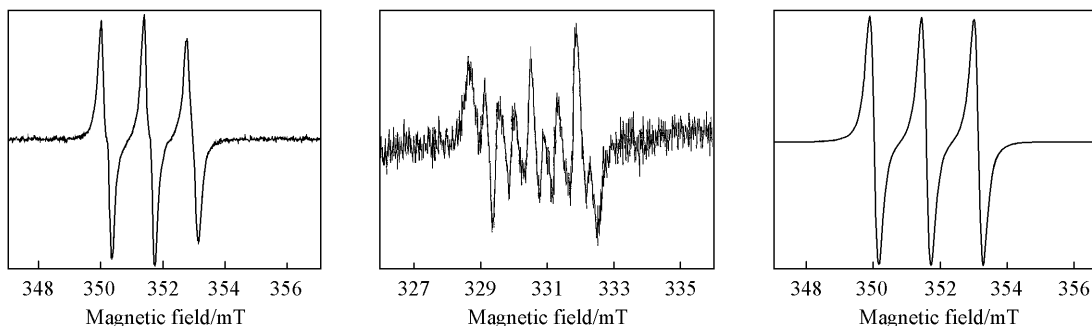


Fig 1 EPR spectra of PBN-free radical adducts(A), DMPO-free radical adducts(B) and TEMPO(C)

2.2 气相自由基捕获剂溶剂的确定

气相自由基捕获剂的常用溶剂主要是非极性溶剂, 如四氯化碳、苯、己烷、甲苯. Baum 等^[26]发现, 使用甲苯和己烷作溶剂会产生 PBN 氧化产物的碎片峰, 从而导致气相自由基浓度测定值的下降, 尤其是使用己烷作溶剂时, 此现象特别明显, 我们在实验中也发现了此现象. Muller 等^[25]使用叔丁基苯为溶剂, 认为其无毒, 但我们在实验中发现使用叔丁基苯为溶剂, 自由基捕集溶液中常常出现沉淀, 这是因为叔丁基苯的凝固点只有 10°C ; 另外, 使用叔丁基苯为溶剂, 产生的 EPR 信号较小. 苯、 CCl_4 挥发性相对较低, 比较苯溶剂与 CCl_4 溶剂的挥发性, 两者没有明显差别, 其与气相自由基加合物的稳定性也没有明显差异. CCl_4 本身无 EPR 杂质信号, 溶解 PBN 效果好, 对环境污染相对较小. 综合考虑, 四氯化碳最为理想, 因此, 选定 CCl_4 为溶剂.

2.3 气相自由基捕集溶液浓度和体积的确定

不同的分析方法使用的气相自由基捕集溶液的浓度各不相同^[25,26]. 本文采用一系列不同浓度的气相自由基捕集溶液 ($0.02 \sim 1.00 \text{ mol/L}$) 和 8 mg 中南海卷烟 (ZNH, 北京卷烟厂, $n = 20$) 进行实验, 发现在使用浓度低于 0.05 mol/L 的捕集溶液时, 不同体积 ($1 \sim 9 \text{ mL}$) 各级捕集溶液均发现干扰气相自由基测定的 PBNO_2 自由基^[26], 使用体积大于 3 mL 的浓度大于或等于 0.05 mol/L 的捕集溶液时, PBNO_2 自由基的信号在实验条件下已经检测不到. 在使用体积为 8 mL 的浓度为 0.05 mol/L 的捕集溶液时, 检测到的气相自由基的量最高, 因此, 选用浓度为 0.05 mol/L 的捕集溶液 (图 2).

使用气相自由基捕集溶液的体积随使用的捕集装置的不同而不同^[25,26]. 本文采用 1~4 级捕集装置捕集红中南海卷烟 (北京卷烟厂, $n = 20$) 烟气中的气相自由基, 按照 1.2 节中的条件进行了 EPR 测定, 发现在捕集溶液体积较小时 (1 mL), 第二级捕集溶液中气相自由基的含量可以达到 4 级捕集总量

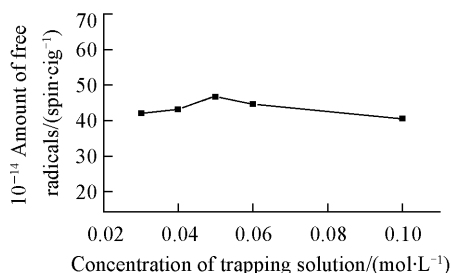


Fig 2 Comparison of different amounts of the detected gas-phase free radicals in the mainstream smoke of 8 mg ZNH cigarettes using different concentrations of PBN/CCl₄ solutions

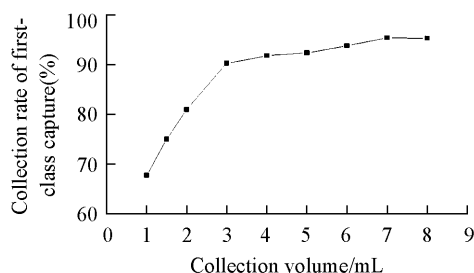


Fig 3 Comparison of the different collection rates of the detected gas-phase free radicals in the mainstream smoke of red ZNH cigarettes using different volumes of PBN/CCl₄ solutions

的 30%左右, 第三级和第四级捕集溶液中也含有少量的气相自由基, 而且在各级捕集溶液中都发现了干扰气相自由基测定的 PBNO_x自由基^[26]. 随着捕集溶液体积的逐渐增加, 第二级、第三级和第四级捕集溶液中气相自由基的含量逐渐降低, 在第一、第二和第三级捕集溶液中的 PBNO_x自由基含量逐渐降低. 实验结果表明, 使用 1 级捕集装置, 使用 7~9 mL 浓度为 0.05 mol/L 的捕集溶液, 捕集效率接近且都可以捕集到 95% 以上的气相自由基 (见图 3), 我们从操作方便和节约成本的角度考虑最终选用 8 mL 浓度为 0.05 mol/L 的捕集溶液.

2.4 气相自由基捕集溶液的稳定性及其控制方法和效果

自由基捕获剂与气相自由基形成的加合物信号强度, 在室温下会很快衰减. 红中南海卷烟 ($n=10$) 烟烟气相自由基 PBN 加合物的衰减情况见图 4. 为了确保可重复地准确测定气相自由基, Muller 等^[25]使用从卷烟点火开始后, 16 min 开始启动 EPR 进行测定的方法, 但是仍难以有效抑制气相自由基的衰减. 本文采用先将捕集了 8 mg 中南海卷烟 ($n=10$) 烟烟气相自由基的溶液冷冻, 再定时解冻进行 EPR 测定的方法, 很好地解决了此问题 (图 5), 冷冻 96 h 后, 自由基的量没有明显变化.

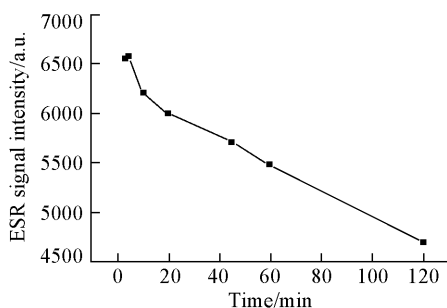


Fig 4 Declination of the EPR signal intensity of PBN-gas-phase free radical adducts at (22 ± 2)

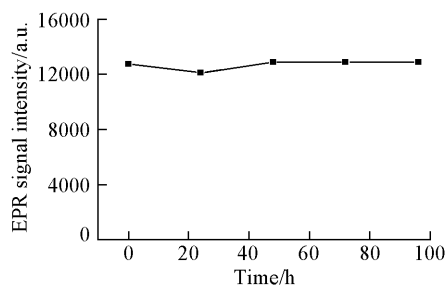


Fig 5 Change of the EPR signal intensity of PBN/gas-phase free radical adducts in 96 h after the adducts had been stored in liquid nitrogen

2.5 气相自由基测定方法的优化

氧气会导致气相自由基的 EPR 波谱峰变宽, 难以得到气相自由基的 EPR 波谱峰的超精细裂分结构. 虽然对于一般的自由基定量测定, 并不要求进行除氧操作, 但因为烟气自由基测定方法的灵敏度相对于气相自由基测定的要求并不是很高, 所以除氧对于气相自由基的准确测定是必要的. 通常的除氧方法是采用多次循环通惰性气体 冷冻 抽真空的方式, 这样虽然除氧的效果较好, 但费时费力, 并会导致自由基的损失. 本文采用通入氩气 冷冻 解冻 的除氧方法和通入氩气除氧的方法对同一种卷烟 (红中南海) 测定的平均值 ($n=9$) 分别为 $(30.1 \pm 1.92) \times 10^{14}$ spin/cig 和 $(30.5 \pm 3.28) \times 10^{14}$ spin/cig, 用上述两种方法测定得到的两组数据的 $F_{\text{计算}}(2.94) < F_{\text{表}}(3.44)$, 说明使用这两种实验方法的精密密度无显著性差异; 在 95% 的置信度下, $t_{\text{计算}}(1.25) < t_{\text{表}}(2.09)$, 说明使用这两种实验方法的测定结果的平均值无显著性差异. 因此, 我们决定采用捕集后不充氩气直接冷冻, 然后定时解冻, 并开始测定的方法. 采取上述两种方法测定得到的 2R4F 参比卷烟烟气气相自由基的 EPR 波谱图见图 6 从图 6

可见,两者差异不大 ($g=2.0069$, $a_{\text{H}}=1.39$ mT, $a_{\text{N}}=0.20$ mT).

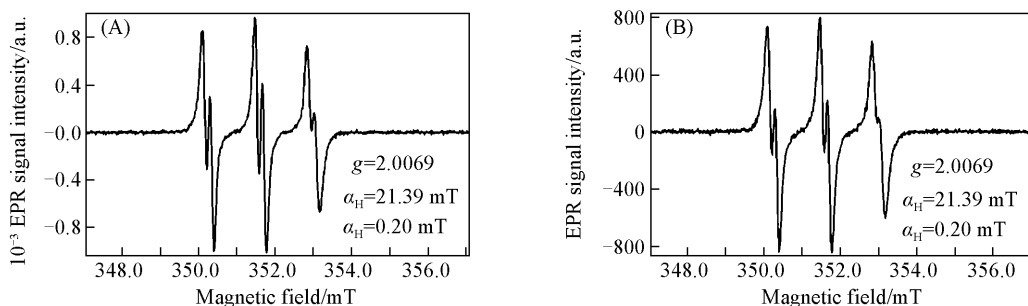


Fig 6 EPR spectra of PBN-gas-phase free radical degassed by bubbling argon and frozen in liquid nitrogen (A) and only by frozen in liquid nitrogen (B)

以往采取不同的计算方法测定烟气气相自由基^[23,24,26],往往导致用不同的电子顺磁共振波谱仪采用相同的方法测定同一卷烟样品时,得到不一致的结果.本文采用以在相同条件下测得的TEMPO的EPR信号强度与强煤的EPR信号强度相比得到的相对EPR信号强度与自由基的自旋数分别为纵横坐标建立校准曲线的方法计算烟气气相自由基的量,消除了使用不同的电子顺磁共振波谱仪导致的测定结果差异.实验中我们还发现,使用不同的石英管对测定结果的重复性有影响.为了获得好的重复性,应采用高精度石英管,最好在实验中采用同一支石英管.

2.6 气相自由基测定方法的验证

本文实际测量得到的 $R-N$ 标准回归关系方程为: $R=7.505E-16N+0.0159$ ($R^2=0.9999$, $n=5$),其中, R 为相对EPR信号强度, N 为TEMPO各浓度对应的自旋数,范围为 $3.01 \times 10^{14} \sim 6.02 \times 10^{15}$ spin.对此分析方法的组内和组间重复性(Intra-assay和Inter-assay)进行了评估.将同一个卷烟样品(红中南海)的气相自由基与PBN的加合物均分成5份,按照1.2节中所叙述的方法,在同一天中测定,采用这种方法连续测定3 d ($n=15$),得到组内评估的相对标准偏差RSD为6.22%;取同一个卷烟样品(红中南海)15支,按照1.2节中所述的方法,每天测5支,连续测3 d ($n=15$),得到组间评估的相对标准偏差RSD为8.34%.上结果说明此测定方法有很好的重复性.测定最低浓度的TEMPO标准样品时,以5次重复测定得到的对应于气相自由基浓度的标准偏差的3倍,作为测定方法的检出限,实际测得的检出限为 3.1×10^{14} spin/cig,远小于焦油量最低的参比卷烟1R5F(University of Kentucky, USA,焦油量为1 mg/cig)的大约 28×10^{14} spin/cig,说明此方法的灵敏度较高.

由于目前没有卷烟烟气气相自由基的标准样品,因此,所有对于卷烟烟气气相自由基测定方法的研究中都没有提供方法回收率的实验结果.

2.7 部分市售卷烟烟气中气相自由基的测定结果

采用本文的气相自由基测定方法对市场上销售的50个牌号的卷烟进行了检测,这些卷烟包括了35种国产烤烟型卷烟,8种国产混合型卷烟,1种国外产烤烟型卷烟,6种国外产混合型卷烟,每种卷烟的检测数量都是20支,具体结果见表1.

Table 1 Gas-phase free radical amount in the smoke of 50 selected commercial cigarettes ($n=20$)

Cigarette	Average tar amount/(mg · cig ⁻¹)	10^{-14} Average gas-phase free radical amount/(spin · cig ⁻¹)
US blend ($n=6$)	10.5	72.85
UK virginia ($n=1$)	12.0	43.81
Chinese blend ($n=8$)	6.8	38.73
Chinese virginia ($n=35$)	14.8	21.74

参 考 文 献

- [1] Lyons M. J., Gibson J. F., Ingram D. J. E. Nature [J], 1958, 181: 1003—1004
- [2] Ingram D. J. E. Acta Med Scand (Suppl) [J], 1961, 369: 43—62
- [3] Forbes W. F., Robison J. C., Wright G. F. Can. J. Biochem. [J], 1967, 45: 1847
- [4] Pryor W. A., Church D. F., Evans M. D., et al. Free Radical Biol Med [J], 1990, 8(3): 275—279

- [5] Pryor W. A. . J. Cancer Suppl [J], 1997, **8**: 19—23
- [6] Chow C. K. , Ann N. Y. Acad Sci [J], 1993, **686**: 289—298
- [7] Church D. F. , Pryor W. A. . The Lung [J], 1991, **2**: 1975—1979
- [8] Culcasi M. , Muller A. , Mercier A. , *et al.* Chem. Biol Interact [J], 2006, **164** (3): 215—231
- [9] Cross C. E. , Traber M. G. , Eiserich J. , *et al.* Brit Med Bull [J], 1999, **55**: 691—704
- [10] Frei B. , Forte T. M. , Ames B. N. , *et al.* Biochem. J. [J], 1991, **277**: 133—138
- [11] Reznick A. Z. , Cross C. E. , Hu M. L. , *et al.* Biochem. J. [J], 1992, **286**: 607—611
- [12] Pryor W. A. , Hales B. J. , Premovic P. I. , *et al.* Science [J], 1983, **220**: 425—427
- [13] James D. L. , Emmanuel C. O. , Jed E. R. , *et al.* Physiology Behavior [J], 1996, **60** (5): 1379—1381
- [14] Alexander R. W. . Hypertension [J], 1995, **25**: 155—161
- [15] Blum A. L. , Weinstein J. , Sousa J. A. . Nature [J], 1971, **229**: 500
- [16] Church D. F. , Pryor W. A. . Environ Health Perspect [J], 1985, **65**: 111—123
- [17] Pryor W. A. , Tamura M. , Church D. F. J. Am. Chem. Soc [J], 1984, **106** (18): 5073—5079
- [18] Shinagawa K. , Tokimoto T. , Shirane K. . Biochem. Biophys. Research Commun. [J], 1998, **253**: 99—103
- [19] Tokimoto T. , Shinagawa K. . Biol. Chem. [J], 2001, **382**: 1613—1619
- [20] Zhou Jun, Dong Jian-xin, Qi Wei-cheng, *et al.* Proceedings of CORESTA Congress [C], Yokohoma, 1996
- [21] Flicker T. M. , Green S. A. . Environ Health Perspect [J], 2001, **109** (8): 765—771
- [22] Delicostantinos George, Villiotou Vassiliki, Stavrides John C. . Anticancer Research [J], 1994, **14**: 2717—2726
- [23] Pryor W. A. , Terauchi K. , Davis W. H. . J. Environ Health Perspect [J], 1976, **16**: 161—176
- [24] Blakley R. L. , Henry D. D. , Smith C. J. . Food Chem. Toxicol [J], 2001, **363**: 281
- [25] Muller C. , Introp M. . Proceedings of CORESTA ST Group Joint Meeting [C], Freiburg, 2003
- [26] Baum S. L. , Anderson I. G. M. , Baker R. R. , *et al.* Analytica Chimica Acta [J], 2003, **481**: 1—13
- [27] Cigarettes-determination of Total and Nicotine-free Dry Particulate Matter Using A Routine Analytical Smoking Machine, ISO 4387: 2000 (E) [S], 2000

Development of a Quantitative Method for Analyzing Gas-phase Free Radicals in Mainstream Cigarette Smoke

ZHOU Jun^{1,3}, WU Ke², SUN Yue³, CONG Jian-Bo², WANG Chang-Zhen²,
CHANG Xiang³, XIAN Hong², ZHU Yong-Fa^{1*}

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;

3. Technology Center, Beijing Cigarette Factory, Beijing 100024, China)

Abstract An improved method was developed for the determination of the gas-phase free radicals in mainstream cigarette smoke. A trap device for the gas-phase free radicals was developed, which could be easily attached to and removed from a commercial linear smoking machine. *N*-*t*-Butyl-phenylnitron (PBN) was used to trap the gas-phase free radicals and the formed adduct was detected with EPR technique. The adduct was immediately frozen in liquid nitrogen for degassing and stabilization of the adduct. 2, 2, 6, 6-Tetramethyl-piperidinyl-1-oxyl (TEMPO) and strong pitch was used as calibration samples to quantitatively analyze the gas-phase free radicals. The sampling, conditioning and selection of cigarettes in the test were accordant with ISO 4387. It was proved that the established method was highly sensitive, reproducible, practicable and accurate for the detection of the gas-phase free radicals in routine tests.

Keywords Main-stream cigarette smoke; Gas-phase free radicals; Quantitative analysis; Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

(Ed : V, D)