

N° : T - 307
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 9

1 PORTÉE DES APPLICATIONS

- 1.1 La méthode s'applique au dosage de la teneur en B[a]P du tabac entier et du tabac à priser, par chromatographie liquide haute pression (CLHP) avec détection dans l'UV.

2 MÉTHODES APPLICABLES

- 2.1 Méthode d'essai de Santé Canada T-115 - Dosage du goudron, de la nicotine et du monoxyde de carbone dans la fumée principale de tabac, 1999-12-31.
- 2.2 *American Society for Testing and Materials (ASTM) D 1193-77 - Standard Specification for Reagent Water, Version 1977.*
- 2.3 Méthode d'essai de Santé Canada T-402 - Préparation des cigarettes, du tabac à cigarettes, des cigares, des kreteks, des bidis, du tabac en feuille, du tabac à pipe et du tabac sans fumée aux fins d'essais, 1999-12-31.

3 RÉSUMÉ DE LA MÉTHODE

- 3.1 Cette méthode est une modification de la méthode 973.30 de l'AOAC, « *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Benzo[a]pyrene in Food - Spectrophotometric Method* ». Pour cette méthode, l'analyse par CLHP est précédée d'une extraction de l'échantillon, des étapes initiales de purification pour le fractionnement et d'un traitement sur florisil. La taille de l'échantillon et le volume des réactifs utilisés sont adaptés aux exigences analytiques, à la quantité d'échantillon et à la disponibilité de l'équipement.
- 3.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont extraits après saponification de l'échantillon de tabac broyé avec une solution alcoolique de KOH et fractionnement à l'isooctane. L'extrait est ensuite complètement asséché, puis redissous dans 2 mL d'isooctane. Cette dernière solution est passée sur une cartouche de 1 g (6 mL) de florisil et lavée avec 15 mL d'isooctane. Le B[a]P est élué avec 15 mL de benzène, évaporé jusqu'à siccité, puis redissous dans 2 mL d'acétonitrile. L'échantillon est alors dosé par chromatographie liquide en phase inverse avec détection par fluorescence.
- 3.3 Quelques matrices peuvent s'avérer trop complexes pour permettre un dosage précis par cette méthode de nettoyage par extraction. Ces types d'échantillons peuvent nécessiter un nettoyage sur CLHP, par chromatographie en phase normale sur une colonne de silice, permettant de récupérer la fraction renfermant le B[a]P. Cette fraction est alors concentrée, puis analysée par CLHP en phase inverse.

Nota : L'analyse et l'évaluation de certains produits à l'aide de cette méthode peuvent nécessiter l'utilisation de substances ou d'équipement potentiellement dangereux. Le présent document n'entend pas répondre à tous les aspects concernant la sécurité de son utilisation. Avant d'utiliser cette méthode normalisée, toute personne a la responsabilité de consulter les autorités

compétentes et de prendre des mesures de protection de la santé et des mesures de sécurité qui tiennent compte des règlements en vigueur.

4 ÉQUIPEMENT

- 4.1 Système Visi-Prep pour extraction en phase solide de Supelco (système à 24 cartouches) ou l'équivalent.
- 4.2 Condensateur – de type Friedrich.
- 4.3 Bouteille d'argon avec branchements multiples pour la purge des flacons lors de la saponification.
- 4.4 Pipettes en verre (2, 20, 40 et 50 mL).
- 4.5 Micropipette (1000 mL).
- 4.6 Tubes à culture de 16 X 125 mm (20 mL).
- 4.7 Ballons à fond rond de 250 mL.
- 4.8 Ampoule à décanter de 1000 mL.
- 4.9 Turbo-évaporateur Zymark ou l'équivalent.
- 4.10 Évaporateur rotatif Buchi ou l'équivalent.
- 4.11 Balance précise à la quatrième décimale.
- 4.12 Pipettes Pasteur.
- 4.13 Filtre en nylon de 0,45 : L.
- 4.14 Cartouches de 1 g de florisol (capacité de 6 mL).
- 4.15 Flacons de 2 mL pour échantillonneur automatique, avec bouchons vissants revêtus de téflon.
- 4.16 Chromatographe liquide haute pression comprenant :
 - 4.16.1 Échantillonneur automatique.
 - 4.16.2 Pompe ternaire.
 - 4.16.3 Détecteur de fluorescence.
 - 4.16.4 Système de collecte des données.
 - 4.16.5 Colonne de CLHP Merck de 250 X 4 mm, RP-18^e, avec garniture de 5 : m.
 - 4.16.6 Colonne de garde Lichrocart 4-4 garnie de Lichrosphere 100 RP-18 de 5 : m, à extrémité coiffée.

5 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Nota : Tous les réactifs doivent être au moins de qualité analytique.

- 5.1 Benzo[a]pyrène (B[a]P).
- 5.2 2,2,4-triméthylpentane.
- 5.3 Benzène.
- 5.4 Acétonitrile.
- 5.5 Hydroxyde de potassium.
- 5.6 Sulfate de sodium anhydre.
- 5.7 Argon – UHP.
- 5.8 Alcool de qualité réactif.
- 5.9 Eau de type I (conforme aux spécifications de l'ASTM).
- 5.10 Chlorure de sodium (NaCl (en solution saturée)).
- 5.11 Isopropanol (IPA).
- 5.12 Tétrahydrofurane (THF).

6 PRÉPARATION DE LA VERRERIE

- 6.1** La verrerie doit être lavée et séchée de façon à s'assurer qu'elle ne causera aucune contamination.

7 PRÉPARATION DES SOLUTIONS ET DES ÉTALONS

7.1 Préparation des étalons dilués et des solutions dopées

7.1.1 Solution mère primaire (1^e) de B[a]P : Dissoudre 10 mg de B[a]P solide dans 50 mL d'acétonitrile.

7.1.2 Solution mère secondaire (2^e) : Mettre 100 µL de solution 1^e dans 50 mL d'acétonitrile.

7.1.3 Étalons dilués :

N° d'étalon	Volume d'étalon (µL)	Volume final (mL)	Concentration [ng/mL]
1	40	25	0,6400
2	175	25	2,800
3	350	25	5,600
4	600	25	9,600
5	900	25	14,40
6	2 mL d'étalon n° 1	10	0,1280
7	4 mL d'étalon n° 1	10	0,2560

Nota : Toutes les masses, tous les volumes et toutes les puretés doivent être notées et utilisées pour calculer exactement la concentration des étalons. Ces concentrations ne sont que des exemples des concentrations étalons utilisées pour tracer une courbe d'étalonnage.

8 ÉCHANTILLONNAGE

8.1 L'échantillonnage des produits du tabac doit se faire conformément aux spécifications de la publication T-115.

9 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

9.1 Le tabac entier doit être préparé pour les essais conformément aux spécifications de la publication T-402.

10 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

10.1 Extraction - Saponification

10.1.1 Peser exactement 2 g de tabac préparé dans un ballon de 250 mL à fond rond.

10.1.2 Ajouter 60 mL d'alcool de qualité réactif.

10.1.3 Ajouter 4,5 mL de solution de KOH.

10.1.4 Purger le ballon avec de l'argon.

10.1.5 Mettre en place un système de reflux, de telle manière qu'il soit continuellement purgé avec un faible débit d'argon.

10.1.6 Faire bouillir à gros bouillon au reflux pendant deux heures.

Nota : Pour prévenir la formation de mousse, augmenter graduellement la température pendant les 5-10 premières minutes.

10.1.7 Laisser refroidir à la température ambiante tout en continuant de purger avec de l'argon.

10.1.8 Boucher le ballon et le conserver dans le noir jusqu'au moment du fractionnement.

10.2 Extraction - Fractionnement

10.2.1 Transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décanter de 1000 mL.

Nota : Une certaine portion du solide peut cependant passer dans l'ampoule à décanter et rendre difficile le soutirage de la couche inférieure en bouchant le robinet.

10.2.2 Laver le ballon avec 2 X 20 mL d'eau de type I et transvaser ces portions dans l'ampoule à décanter (I).

10.2.3 Laver le ballon avec 2 X 15 mL d'alcool, de qualité réactif, et transvaser ces portions dans l'ampoule à décanter (I).

10.2.4 Laver le ballon avec 25 mL d'isooctane et transvaser cette portion dans l'ampoule à décanter (I).

10.2.5 Agiter l'ampoule à décanter pendant trois minutes et laisser aux couches le temps de se séparer.

10.2.6 Soutirer avec précaution la couche inférieure et la recueillir dans une deuxième ampoule à décanter (II).

10.2.7 Répéter l'extraction en ajoutant 20 mL d'isooctane dans le ballon à fond rond et transvaser cette portion dans l'ampoule à décanter (II).

10.2.8 Agiter l'ampoule à décanter pendant trois minutes et laisser aux couches le temps de se séparer.

10.2.9 Soutirer avec précaution la couche inférieure et la recueillir dans une troisième ampoule à décanter (III).

10.2.10 Répéter l'extraction en ajoutant 20 mL d'isooctane dans le ballon et transvaser cette portion dans l'ampoule à décanter (III).

10.2.11 Agiter l'ampoule pendant trois minutes et laisser aux couches le temps de se séparer.

10.2.12 Soutirer avec précaution la couche inférieure et la jeter.

10.2.13 Laver chaque couche d'isooctane (ampoules à décanter I, II et III) trois fois avec 50 mL d'eau de type I chaude additionnée de 500 µL de solution saturée de NaCl.

Nota : Laver en faisant tourner. Une agitation trop vigoureuse rendrait la phase aqueuse « savonneuse » et nuirait à la séparation, d'où un taux de récupération faible.

- 10.2.14** Jeter la couche aqueuse (inférieure) après chaque lavage.
- 10.2.15** Après avoir complété le lavage, laisser s'écouler les couches d'isooctane dans un entonnoir contenant du sulfate de sodium anhydre, puis recueillir les fractions réunies dans un ballon à fond rond de 250 mL (commencer par l'ampoule I, puis la II et enfin la III).
- 10.2.16** Rincer la troisième ampoule à décanter (III) avec 25 mL d'isooctane, puis agiter.
- 10.2.17** Transvaser l'isooctane dans la deuxième ampoule à décanter (II), puis agiter.
- 10.2.18** Transvaser l'isooctane dans la première ampoule à décanter (I), puis agiter.
- 10.2.19** Transvaser l'isooctane de la première ampoule à décanter (I) dans le ballon de 250 mL contenant les fractions précédentes d'isooctane.
- 10.2.20** Répéter ce processus de rinçage avec 25 mL d'isooctane, en commençant de nouveau par l'ampoule à décanter (III).
- 10.2.21** Laver le sulfate de sodium anhydre avec 2 X 5 mL d'isooctane.
- 10.2.22** Sur évaporateur rotatif à environ 55 °C, évaporer jusqu'à siccité la solution d'isooctane contenue dans le ballon à fond rond de 250 mL.
- 10.2.23** Dissoudre de nouveau l'échantillon dans 2 mL d'isooctane.

10.3 Nettoyage sur le florisil

- 10.3.1** Conditionner la cartouche de florisil en y ajoutant environ 1 g de sulfate de sodium anhydre, puis en y faisant passer 2 X 5 mL d'isooctane (laisser le solvant s'écouler par gravité à une vitesse d'environ 1 goutte/seconde).
- 10.3.2** Verser tout l'échantillon ainsi obtenu (dans 2 mL d'isooctane) sur la cartouche en laissant éluer par gravité. Jeter l'éluat.
- 10.3.3** Laver le ballon avec 3 X 5 mL d'isooctane, en versant chaque fraction sur la cartouche et en laissant s'écouler par gravité. Jeter l'éluat.
- 10.3.4** Placer un tube à culture jetable en verre de 20 mL sous chaque cartouche.
- 10.3.5** Éluer par gravité le B[a]P retenu sur les cartouches en y ajoutant 3 X 5 mL de benzène.
- 10.3.6** Ajouter 1 mL de THF dans chaque tube.

10.3.7 Placer les tubes contenant les 16 mL d'éluat sur un turbo-évaporateur Zymark.

Nota : Le turbo-évaporateur est réglé pour une température de 40 °C et une pression d'azote de 7,5 lb/po².

10.3.8 Évaporer les échantillons jusqu'à siccité.

Nota : Ceci nécessite une évaporation initiale de 30 minutes sous un courant d'azote qui peut graduellement augmenter jusqu'à un maximum de 10,0 lb/po², de manière à éviter les pertes d'échantillon dues aux éclaboussures.

10.3.9 À l'aide d'une pipette, mettre 1000 µL d'acétonitrile dans chacun des tubes secs pour dissoudre l'analyte et tout résidu présent.

10.3.10 Agiter l'échantillon pendant environ 15 secondes sur agitateur magnétique à grande vitesse.

10.3.11 Avec une pipette en verre, laver les parois du tube cinq fois avec l'échantillon, puis transvaser le liquide dans une fiole jaugée de 2 mL.

10.3.12 Laver encore le tube avec 500 µL d'acétonitrile, comme ci-dessus, puis transvaser le liquide dans la fiole jaugée de 2 mL.

10.3.13 Remplir la fiole au trait avec de l'acétonitrile.

10.3.14 Transvaser l'échantillon dans un flacon de 2 mL pour échantillonneur automatique, muni d'un bouchon vissant et d'un septum revêtu de téflon.

10.3.15 Les échantillons sont prêts pour l'analyse par CLHP et peuvent être conservés ainsi à 4 °C.

11 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PREFORMANCE EN PHASE INVERSE

11.1 Conditions pour le détecteur de fluorescence Jasco

Longueur d'onde d'excitation : 365 nm.
Longueur d'onde d'émission : 425 nm.
Gain : X 1 000.
Atténuation : 32.

Nota : Un détecteur de fluorescence d'un autre fabricant peut devoir être programmé différemment afin de conserver la même gamme d'étalonnage. Une légère modification de la longueur d'onde d'excitation ou de la longueur d'onde d'émission peut s'avérer nécessaire, en fonction de la marque du détecteur (p. ex., 366 et 424 nm).

11.2 Échantillonneur automatique : volume injecté

11.2.1 Faire les analyses avec une boucle d'échantillonnage de 50 µL en réglant le volume d'injection à 75 µL, pour assurer une vidange complète de la boucle à échantillon.

11.3 Phase mobile et gradient (système de gradient ternaire)

Solvant A : Acétonitrile/1 % d'IPA dans de l'eau de type I (dégazée et passée sur un filtre de 0,45 µm), en proportions 55:45.
 Solvant B : Méthanol.
 Solvant C : Acétonitrile.
 Débit : 1,5 mL/minute.
 Gradient : Des réglages mineurs peuvent s'avérer nécessaires en fonction de la condition de la colonne et de la résolution de l'analyte.

Temps (minutes)	Composition		
	% A	% B	% C
0,00	55	0	45
20,00	75	0	25
25,0	100	0	0
28,00	100	0	0
30,00	0	100	0
32,00	0	100	0
34,00	100	0	0
35,00	100	0	0
35,00	Fin du dosage :		Équilibrer

Temps d'équilibrage : 8,00 minutes.

12 CALCULS

12.1 Détermination du facteur de réponse

12.1.1 Réaliser un étalonnage initial en analysant des étalons, par ordre décroissant de concentration (injecter le premier étalon au moins deux fois, jusqu'à l'obtention d'une réponse et d'un temps de rétention identiques deux fois de suite).

12.1.2 Tracer une courbe d'étalonnage en rapportant la hauteur du pic obtenu avec un détecteur de fluorescence en fonction de la concentration de B[a]P dans l'étalon.

12.1.3 Le facteur de réponse est égal à la pente de la droite calculée par régression linéaire (hauteur de pic/concentration).

12.2 Calcul de la teneur en B[a]P [ng/g]

$$12.2.1 \quad \text{B[a]P [ng/g]} = \frac{\text{hauteur de pic} \times \text{vol. final (mL)}}{[\text{FR} \times \text{poids d'échantillon (g)}]}$$

Nota : Le cas échéant, toute dilution supplémentaire doit être prise en considération dans les calculs.

13 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

13.1 Chromatogramme typique

13.1.1 Non fourni.

13.2 Paramètres de contrôle typiques

13.2.1 Chaque série d'analyses doit contenir au moins un échantillon de chacun des groupes suivants :

13.2.1.1 Blanc de réactif (BR) : pour déterminer la contamination de fond due aux solutions, à la verrerie ou aux matières utilisées lors de l'analyse.

13.2.1.2 Blanc fortifié (BF) : pour déterminer s'il y a perte d'analyte lors de l'analyse.

13.2.1.3 Matrice fortifiée (MF), en dopant une des cigarettes témoins : pour déterminer s'il y a perte d'analyte lors du processus d'analyse et pour déterminer les effets potentiels de la matrice.

13.2.1.4 Un échantillon de référence (minimum de deux par série de 20 analyses) : pour déterminer la reproductibilité, d'une expérience à l'autre, de toute la méthode d'analyse.

13.2.1.5 Échantillons en double : pour déterminer la reproductibilité du dosage lors d'une même expérience ou d'une même série d'analyses.

13.3 Taux de récupération et niveaux de contamination

13.3.1 Les taux de récupération typiques des BF et des MF se situent entre 75 et 95 %, lorsqu'une solution dopée (ou un échantillon) subit le processus d'extraction en entier.

13.3.2 Des taux de récupération inférieurs à 65 % indiquent que soit l'élution du B[a]P lors de l'extraction en phase solide est insuffisante, soit le facteur de réponse (FR) du détecteur de fluorescence a changé. Il faut d'abord vérifier le FR du détecteur de fluorescence avant de recommencer le traitement des échantillons.

13.3.3 Les valeurs obtenues avec des BR typiques se situent dans la gamme de à 0,0-0,3 ng/g. Une contamination de cet ordre est, en général, attribuée à une contamination du tampon filtre lors de son conditionnement ou à un mauvais lavage de la verrerie.

13.4 Limite de détection de la méthode (LDM) et limite de dosage (LD)

13.4.1 La LDM est déterminée en analysant, comme s'il s'agissait d'un inconnu, l'étalon de plus faible concentration au moins 10 fois pendant une période de plusieurs jours. La LDM est égale à trois fois l'écart-type de ces résultats.

13.4.2 La LDM (exprimée en ng/g) peut être modifiée en faisant varier la quantité de tabac soumise à l'extraction ou les volumes de solvant utilisés pour l'extraction et le nettoyage.

13.4.3 La LD pratique est déterminée en analysant l'étalon, comme s'il s'agissait d'un inconnu, de plus faible concentration au moins 10 fois pendant une période de plusieurs jours. La LD est égale à 10 fois l'écart-type de ces résultats.

13.5 Stabilité des réactifs et des échantillons

13.5.1 Les solutions mères et les étalons doivent être conservés au congélateur.

13.5.2 Les étalons mères et les solutions mères dopées sont stables jusqu'à 6 mois. Bien qu'il ne produise aucune perte d'analyte, l'évaporation (perte) du solvant peut poser un problème.

13.5.3 De nouveaux étalons de travail doivent être préparés tous les deux mois.

13.5.4 Les échantillons sont stables à 4 °C pour trois semaines après l'extraction.

14 RÉFÉRENCES

- 14.1** Méthode 973.30 de l'AOAC, « *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Benzo[a]pyrene in Food - Spectrophotometric Method* », AOAC 1995, volume II, 48.1.01., p. 1176-1178.
- 14.2** Tomkins, B.A.; Jenkins, R.A.; Griest, W.H.; Reagen, R.R. « *Liquid Chromatographic Determination of Benzo[a]pyrene in Total Particulate Matter of Cigarette Smoke.* » *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 68, 5, 1985. p. 935-940.