
N° : T - 314
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 8

1 PORTÉE DES APPLICATIONS

- 1.1 Cette méthode décrit la séparation et l'identification de l'eugénol dans un extrait éthanolique de tabac entier et de cigarettes au clou de girofle sans préparation poussé de l'échantillon. L'extrait est filtré et analysé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse avec détecteur ultraviolet (UV). Cette méthode a plusieurs avantages : elle est précise et rapide et peut servir pour l'analyse de routine. De plus, comme l'analyse peut se faire à la température ambiante, les risques de réarrangement et de décomposition thermiques associés à la chromatographie en phase gazeuse sont éliminés.
- 1.2 La méthode est conçue pour servir d'analyse de routine sans nécessiter la formation d'un dérivé. Elle s'applique aux cigarettes traitées (*kreteks*), au tabac et au tabac de fine coupe.
- 1.3 Cette méthode ne doit servir qu'à doser la quantité d'eugénol ajoutée au tabac et comme flaveur.
- 1.4 Cette méthode ne fait pas la distinction entre l'eugénol ajouté et l'eugénol naturel (le cas échéant) dans le tabac entier.

2 MÉTHODES APPLICABLES

- 2.1 *American Society for Testing and Materials (ASTM) : Méthode D 1193-77 - Standard Specification for Reagent Water, Version 1977.*
- 2.2 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.

3 RÉSUMÉ DE LA MÉTHODE

- 3.1 Deux grammes de tabac entier conditionné sont pesés exactement dans un tube à culture de 75 mL à bouchon vissant et 50 mL d'éthanol y est ajouté.
- 3.2 Le tube est scellé et le tabac est extrait pendant deux heures à 50 °C.
- 3.3 Une portion de la solution est filtré dans une seringue et recueilli dans un flacon à échantillonneur ambré de 1,5 mL et analysée par CLHP avec détection dans l'UV.
- 3.4 L'eugénol présent dans le tabac entier est dosé par la méthode de l'étalon externe, c'est-à-dire par comparaison de la réponse pour l'échantillon en comparaison d'une courbe d'étalonnage à six points.

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 APPAREILLAGE ET ÉQUIPEMENT

- 4.1 Appareil de traitement en lot Robot Coupe RS1 de 2 V.
- 4.2 Sonicateur.
- 4.3 Pipette automatique type flacon de 10 – 50 mL.
- 4.4 Balance précise à la quatrième décimale.
- 4.5 Centrifugeuse.
- 4.6 Agitateur magnétique.
- 4.7 Fiole jaugée ambrée de 100 mL, de classe A.
- 4.8 Fiole jaugée ambrée de 10 mL, de classe A.
- 4.9 Cylindre gradué en verre de 50 mL.
- 4.10 Tubes à culture/à centrifuger de 200 X 25 mm à bouchon vissant.
- 4.11 Bouchons en polypropylène blanc sans revêtement.
- 4.12 Micropipettes de 10 : L, de 100 : L, de 500 : L, de 1000 : L, de 2000 : L et de 5000 : L pour la préparation des étalons d'analyse.
- 4.13 Pipettes de classe A de 2 mL, de 5 mL et de 50 mL.
- 4.14 Seringue filtre de 0,45 : mL en PVDF.
- 4.15 Seringues jetables de 5 mL.
- 4.16 Pipettes pasteur jetables en verre.
- 4.17 Poire en caoutchouc.
- 4.18 Entonnoir à filtrer en verre.
- 4.19 Parafilm® ou l'équivalent.
- 4.20 Flacons à échantillonneur automatique à bouchon vissant et à septum revêtu de téflon.
- 4.21 Bain agitant.
- 4.22 Système de chromatographie à haute pression commandé par ordinateur comprenant :
 - 4.22.1 Alimentation en éluant avec gradient ternaire.
 - 4.22.2 Échantillonneur réfrigérant avec boucle d'échantillonnage à remplissage partiel.
 - 4.22.3 Détecteur UV.
 - 4.22.4 Poste de travail.
 - 4.22.5 Colonne RP 18e.
 - 4.22.6 Colonne de garde jetable.

5 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

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

- 5.1 Eugéno1 de pureté > 99 %.
- 5.2 Éthanol de qualité CLHP.
- 5.3 Eau de type I (conforme aux spécifications de la norme D1193 de l'ASTM).
- 5.4 Méthanol.
- 5.5 Isopropanol.
- 5.6 Hélium (UHP).

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 ÉTALONS

- 7.1 Préparer la solution mère primaire d'eugéno1 (2,0 mg/mL) en pesant exactement 200 mg d'eugéno1 pur dans une fiole jaugée de 100 mL et en diluant au trait avec de l'éthanol.
- 7.2 Préparer six étalons dilués (de 2 à 1000 µg/mL) en diluant de 0,01 à 5000 µL de la solution mère primaire d'eugéno1 à 10 mL avec de l'éthanol (voir l'**annexe 1**).
- 7.3 Transvaser les étalons dans des flacons ambrés de 1,5 mL pour échantillonneur automatique. Rincer d'abord les flacons et les remplir en laissant le moins d'espace de tête possible.
- 7.4 Conserver les flacons au réfrigérateur à 4 °C, et les laisser à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse.
- 7.5 Préparer des étalons d'eugéno1 frais aux cinq jours ouvrables.

8 ÉCHANTILLONNAGE

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

9 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

9.1 Extraction du tabac entier

- 9.1.1 Le tabac entier nécessaire à l'analyse doit être retiré de son emballage original et inspecté pour y déceler tout corps étranger.
- 9.1.2 Avant les essais, hacher finement plusieurs grammes de tabac entier dans un appareil de traitement en lot jusqu'à ce qu'il passe un tamis de maille 20.
- 9.1.3 Conditionner ensuite l'échantillon conformément aux spécifications de la publication T-115.
- 9.1.4 Peser exactement deux grammes de tabac hachés fin dans un tube à culture de 200 X 25 mm à bouchon vissant.
- 9.1.5 Ajouter 50 mL d'éthanol à l'échantillon. Visser le bouchon et le sceller avec un peu de Parafilm®.
- 9.1.6 Extraire pendant deux heures à 50 °C dans un bain-marie à agitation.
- 9.1.7 Il peut être nécessaire de centrifuger à une vitesse d'environ 1200 tr/min pendant 10 minutes pour comprimer le tabac entier.
- 9.1.8 Laisser l'échantillon refroidir à la température ambiante, puis en filtrer une portion dans un filtre monté sur une seringue jetable en recueillant le filtrat (en double) dans des flacons ambrés pour échantillonneur automatique. Boucher les flacons et stocker à 4 °C.

10 ANALYSE PAR CLHP À PHASE INVERSE

10.1 Conditions chromatographiques (analyse par CLHP à phase inverse)

10.1.1 Température de la colonne : 30 °C.

10.1.2 Phase mobile : réactifs.

10.1.2.1 Solvant A : méthanol : eau de type I (80:20) filtrer et dégazer (bullé à l'hélium UHP).

10.1.3 Lavages avec échantillon : solvant A.

10.1.4 Gradient d'éluant :

| Débit | 0,7 mL/minute | | |
|---|---------------|-------|------|
| Temps (min) | Composition | | |
| 0,0 | 100% A | 0 % B | 0% C |
| 20,0 | 100% A | 0 % B | 0% C |
| Fin du dosage (Équilibrer 10 minutes). | 100% A | 0% B | 0% C |

10.2 Analyse des échantillons

10.2.1 Charger les flacons à échantillons sur l'échantillonneur automatique en insérant une solution étalon à tous les 10 flacons.

10.2.2 Injecter 20 µL du contenu de chaque flacon dans la colonne de CLHP et procéder au dosage. La courbe d'éluion devrait être semblable à celle des **figures 1a et 1b**.

11 CALCULATIONS**11.1 Préparation d'une courbe d'étalonnage**

11.1.1 Injecter 20 µL du contenu de chaque flacon dans la colonne de CLHP et procéder au dosage dans les condition chromatographiques indiquées. Faire en double. La courbe d'éluion devrait être semblable à celle de la **figure 2**.

11.1.2 Préparer une courbe d'étalonnage en traçant la concentration d'eugénol en fonction de la hauteur du pic. Déterminer le facteur de réponse à partir de cette courbe.

11.2 Dosage de l'échantillon

11.2.1 Le dosage de l'eugénol dans le tabac entier se fait par la méthode de l'étalon externe.

11.2.2 Les pics sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention par rapport à celui du tabac entier

11.3 Dosage de l'eugénol récupéré en µg/g

11.3.1 Eugénol [µg/g] = aire sous le pic X mL de solution.

facteur de réponse M (g) de tabac

- 11.4** Lorsque les bons multiplicateur (volume global de l'échantillon original exprimé en mL) et diviseur (masse d'échantillon original exprimée en g) sont introduits, la concentration d'eugéno1 est calculée automatiquement en µg/g.
- 11.5** Pour transformer cette concentration en pourcentage (%), le résultat exprimé en µg/g doit être divisé par 10000.
- 11.6** Tous les résultats sont exprimés en fonction du tabac « conditionné ». Ils peuvent l'être en fonction de la matière sèche en tenant compte du degré d'humidité du produit.

12 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

12.1 Taux de récupération et niveaux de contamination

12.1.1 Chaque série d'analyses du tabac entier doit aussi comprendre :

- 12.1.1.1** Un blanc de réactif (BR) pour évaluer l'importance des perturbations dues à la verrerie, aux réactifs de piégeage, aux solvants et au système d'analyse.
- 12.1.1.2** Un blanc fortifié (BF) pour évaluer l'importance des pertes éventuelles d'analytes.
- 12.1.1.3** Une matrice fortifiée (MF) pour évaluer les perturbations dues à la matrice. Pour ce faire, doper un échantillon véritable avec une concentration connue et déterminer le taux de récupération (%).

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

12.2.1 Limite de détection de la méthode (LDM)

12.2.1.1 Déterminer la limite de détection de la méthode en analysant l'étalon le moins concentré, comme s'il s'agissait d'un échantillon, au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LDM est égale à trois fois l'écart-type de ces mesures.

12.2.2 Limite de dosage (LD)

12.2.2.1 Déterminer la limite de dosage en analysant l'étalon le moins concentré, comme s'il s'agissait d'un échantillon, au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LD est égale à 10 fois l'écart-type de ces mesures

12.3 Stabilité des réactifs et des solutions

12.3.1 Préparer de nouvelles solutions étalons primaires d'eugéno1 à chaque semaine.

12.3.2 Préparer de nouveaux étalons de travail et de nouveaux solvants d'extraction à chaque semaine.

12.3.3 Analyser tous les échantillons dans les 24 heures

13 RÉFÉRENCES

- 13.1** Myint, S., Daud, W.R.W., Mohmand, A.B. et Kadhum, A.A.H., 1995. «*Separation and Identification of Eugenol in Ethanol Extract of Cloves by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography* », *Journal of American Oil Chemist Society*, 72, p. 1231-1233.
- 13.2** Smith, R.M. et Beck, S., 1984. «*High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Eugenol in Pimento using Ultraviolet and Electrochemical Detection* », *Journal of Chromatography*, 291, p. 424-427.
- 13.3** Fischer, I.U. et Dengler, H.J., 1990. «*Sensitive High Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Eugenol in Body Fluids* », *Journal of Chromatography*, 525, p. 369-377.

ANNEXES

Annexe 1 : Étalons d'eugéno1

| N° d'étalon | Vol. (ml) d'eugéno1 1° | Volume final (en mL) | Eugéno1 [µg/mL] |
|-------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 5,0 | 10 | 1000 |
| 2 | 2,5 | 10 | 500 |
| 3 | 1,0 | 10 | 200 |
| 4 | 0,500 | 10 | 100 |
| 5 | 0,100 | 10 | 20,0 |
| 6 | 0,010 | 10 | 2,0 |

Nota 1: La concentration d'eugéno1 varie selon la concentration exact de l'étalon primaire préparé.

Figure 1a. Superposition des chromatogrammes d'un échantillon de tabac entier (tabac à cigarette de type kretek) et de l'étalon. (le temps de rétention de l'eugénoł est 4,672 minutes)

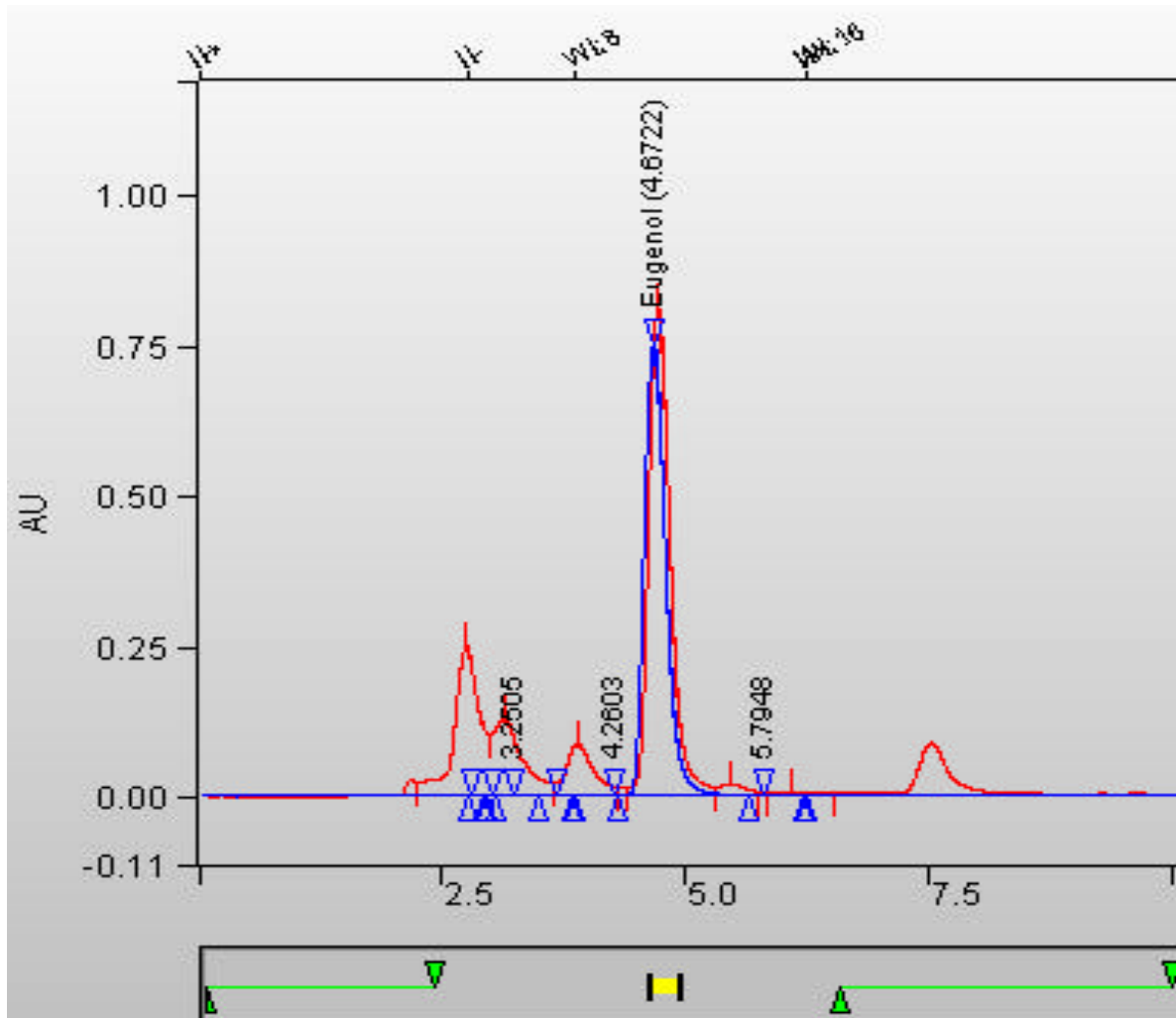


Figure 1b. Superposition des chromatogrammes d'un échantillon de tabac entier (cigarette de type 1R4F) de l'étalon. (Noter l'absence du pic correspondant à l'eugénoł à TR 4,672 minutes)

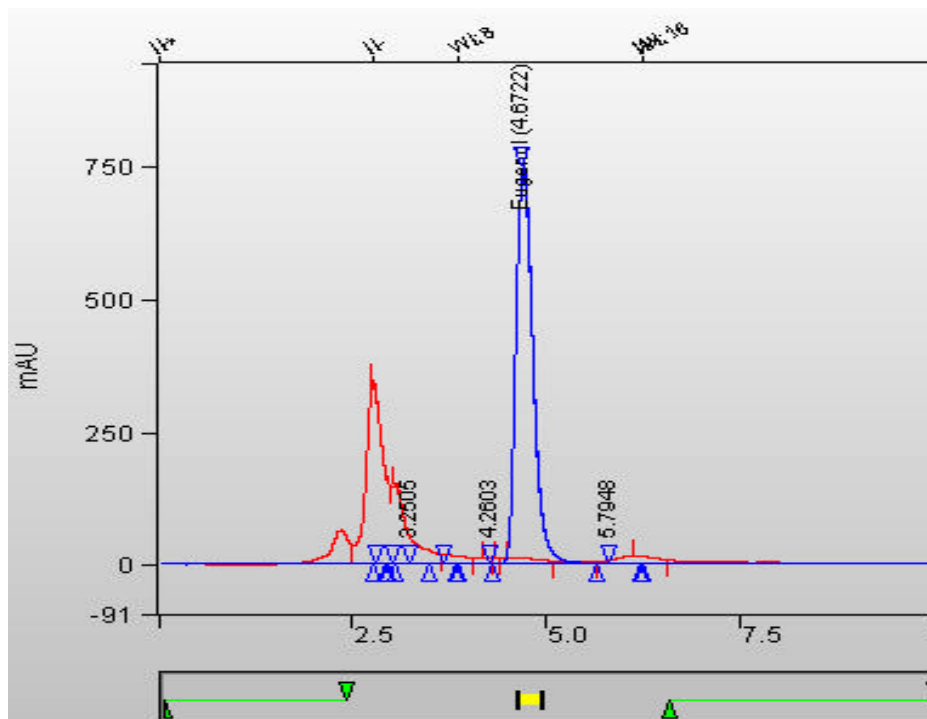


Figure 2. Chromatogramme de l'étalon d'eugénoł. TR : 4,672 minutes

