

**N° :** T - 308  
**Date :** 31 décembre, 1999  
**Page :** 1 de 10

## 1 PORTÉE

- 1.1 La présente méthode décrit l'extraction de l'azote des nitrates du tabac entier et leur dosage avec un analyseur automatique à flux continu.
- 1.2 Cette méthode s'applique au tabac à cigarette traité, au tabac coupe fine, au tabac à chiquer, aux échantillons de cigares et au tabac à pipe.
- 1.3 Cette méthode doit être utilisée pour le dosage de la teneur en nitrates, ajoutés au tabac entier comme agent antimicrobien. Elle est conçue pour servir d'analyse de routine, sans préparation poussée ni dérivation de l'échantillon.
- 1.4 Cette méthode ne permet pas de différencier les nitrates ajoutés de ceux d'origine naturelle (s'il en existe).
- 1.5 Cette méthode ne permet pas non plus de différencier entre les nitrates et les nitrites.

## 2 MÉTHODES APPLICABLES

- 2.1 American Society for Testing and Materials (ASTM) : Méthode D1193-77 Standard Specification for Reagent Water, Version 1977.
- 2.2 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.
- 2.3 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 Le tabac entier broyé est soumis à une extraction à l'acide acétique à 5 % et l'extrait est ensuite filtré.
- 3.2 L'extrait est ensuite analysé à l'aide d'un colorimètre automatique à débit continu, dans lequel l'échantillon subit une dialyse *in situ* pour éliminer les perturbations.
- 3.3 Les ions nitrates sont réduits par réaction avec de l'hydrazine à 37 °C, en présence de cuivre, à un pH de 10,2.
- 3.4 On fait réagir les nitrites ainsi formés avec du sulfanilamide, en milieu acide, pour obtenir un composé diazoïque qui, lorsqu'il est mélangé avec de la N-(1-naphthyl)-éthylènediamine, forme un complexe de couleur rouge.
- 3.5 L'éluant est analysé avec un colorimètre monocanal muni d'un filtre de 500 nm et la teneur en nitrate, dosée par comparaison avec un étalonnage externe.

*Nota* : La mise à l'essai et l'évaluation de certains produits par cette méthode peut nécessiter l'emploi de matières et/ou d'équipement susceptibles d'être dangereux, mais le présent document ne cherche pas à couvrir tous les aspects de la sécurité liés à son emploi. Quiconque fait appel à la présente méthode d'essai a la responsabilité, avant de s'en servir, de consulter les autorités compétentes et d'établir des pratiques de santé et de sécurité en plus des exigences réglementaires qui s'appliquent.

#### 4 ÉQUIPEMENT

- 4.1 Broyeur modèle *RSI 2V Scientific Batch Processor* ou l'équivalent pour hacher le tabac.
- 4.2 Balance analytique permettant de mesurer à la quatrième décimale.
- 4.3 Erlenmeyers propres de 125 mL en polyméthylpentène (PMP), à bouchon vissant.
- 4.4 Agitateur oscillant.
- 4.5 Seringue jetable de 5 cc.
- 4.6 Seringue-filtre de 0,45 µm PVDF ou l'équivalent.
- 4.7 Analyseur automatique informatisé à débit continu, comprenant :
  - 4.7.1 Échantillonneur automatique.
  - 4.7.2 Pompe péristaltique.
  - 4.7.3 Collecteur pour nitrates.
  - 4.7.4 Colorimètre monocanal muni d'une cellule à débit de 15 mm et d'un filtre de 550 nm.
- 4.8 Fioles jaugées de 100 mL avec rodage conique.
- 4.9 Éprouvettes graduées de 50 mL.
- 4.10 Entonnoir en verre.
- 4.11 Agitateur magnétique.
- 4.12 Pipette automatique de 1 000 µL, à volume réglable, ou l'équivalent (pour la préparation des étalons).
- 4.13 Flacons à échantillons pour l'analyseur automatique.
- 4.14 Gants jetables.
- 4.15 Lunettes de protection.
- 4.16 Fiole jaugée de 1 L.

#### 5 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

- 5.1 Acide acétique glacial de qualité CLHP.
- 5.2 Eau de type I.
- 5.3 Acide chlorhydrique (HCl).
- 5.4 Acide ortho-phosphorique ( $H_3PO_4$ ) à 98 %.
- 5.5 Nitrate de potassium ( $KNO_3$ ).
- 5.6 Sulfate cuivrique pentahydraté ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ).
- 5.7 Méthanol.
- 5.8 Brij-35.
- 5.9 Triton X-100.
- 5.10 Sulfate d'hydrazine ( $N_2H_4 \cdot H_2SO_4$ ).
- 5.11 Hydroxyde de sodium (NaOH).
- 5.12 Acétate de sodium anhydre ( $NaC_2H_3O_2$ ).

- 5.13 Sulfanilamide ( $C_6H_8N_2O_2S$ ).
- 5.14 Sodium Nitrite ( $NaNO_2$ ).
- 5.15 Dichlorhydrate de N-1-naphyléthylènediamine ( $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$ ).

## 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

*Nota* : Il se peut que les grands volumes de solution décrits dans ces préparations ne soient pas nécessaires si les volumes d'échantillons à analyser sont petits. Il est cependant important que les solutions préparées aient la bonne concentration.

### 7.1 Solution à 50 % de Triton X-100

- 7.1.1 Mélanger 50 mL de Triton X-100 avec 50 mL de méthanol. Transvaser dans une bouteille.

### 7.2 Réactif colorimétrique

- 7.2.1 Verser 700 mL d'eau de type I dans une fiole jaugée de 1 L.
- 7.2.2 Ajouter 100 mL d'acide phosphorique concentré.
- 7.2.3 Dissoudre 40 g de sulfanilamide dans cette solution. Au besoin, chauffer pour que le produit se dissolve complètement.
- 7.2.4 Ajouter 2,0 g de dichlorhydrate de N-1-naphyléthylènediamine.
- 7.2.5 Laisser le mélange refroidir à la température ambiante, ajouter 0,5 mL de Brij-35 et remplir la fiole à 1 L avec de l'eau de type I.
- 7.2.6 Conserver au réfrigérateur (4 °C) dans une bouteille ambre. La solution est stable pendant un mois.

### 7.3 Solution de sulfate de cuivre

- 7.3.1 Solution mère de sulfate cuivrique.
  - 7.3.1.1 Dissoudre 1,25 g de sulfate cuivrique dans de l'eau de type I et diluer à 500 mL.
- 7.3.2 Verser 4,0 mL de la solution mère de sulfate cuivrique dans une fiole jaugée de 1 L et ajouter de l'eau de type I.
- 7.3.3 Ajouter 0,5 mL de Brij-35 et remplir avec de l'eau de type I.

### 7.4 Solution de sulfate d'hydrazine

- 7.4.1 Solution mère de sulfate d'hydrazine .

**7.4.1.1** Dissoudre 25,0 g de sulfate d'hydrazine dans 800 mL d'eau de type I. Diluer à 1 L. Cette solution est stable pendant six mois si elle est conservée dans une bouteille ambre scellée.

**7.4.2** Dans une fiole jaugée de 1 L, ajouter 36 mL de solution mère de sulfate d'hydrazine à 900 mL d'eau de type I.

**7.4.3** Ajouter 0,5 mL de Brij-35 et remplir à 1 L avec de l'eau de type I.

**7.4.4** Conserver dans une bouteille ambre. Cette solution est stable un mois.

## **7.5 Solution d'hydroxyde de sodium 0,2 N**

**7.5.1** Dissoudre 8,0 g d'hydroxyde de sodium dans environ 800 mL d'eau de type I.

**7.5.2** Ajouter 0,5 mL de Brij-35, refroidir la solution et compléter à 1 L.

## **7.6 Tampon acétate (pH = 3,7)**

**7.6.1** Dissoudre 16,4 g d'acétate de sodium anhydre dans environ 300 mL d'eau de type I.

**7.6.2** Ajouter 100 mL d'acide acétique, 1 mL de solution de Triton X-100 à 50 % et diluer à 1 L avec de l'eau de type I.

## **7.7 Solution pour la dialyse**

**7.7.1** Diluer 1 mL de Brij-35 à 1 000 mL avec de l'eau de type I.

## **7.8 Solution pour l'extraction du tabac (acide acétique à 5 %)**

**7.8.1** Diluer 50 mL d'acide acétique glacial à 1 000 mL avec de l'eau de type I.

## **7.9 Acide chlorhydrique 1,0 N**

**7.9.1** Dans une fiole jaugée de 1 L, verser avec précaution 83 mL d'acide chlorhydrique dans environ 800 mL d'eau de type I. Bien mélanger.

**7.9.2** Refroidir et diluer à 1 000 mL avec de l'eau de type I.

**7.9.3** Cette solution sert au nettoyage des conduites à sulfate de cuivre de l'analyseur automatique afin d'empêcher l'accumulation de cuivre d'un projet ou d'un groupe d'analyses à l'autre.

# **8 Préparation des étalons**

## **8.1 Solution mère primaire de nitrate de potassium (2 000 ppm d'azote)**

**8.1.1** Dissoudre 14,442 g de nitrate de potassium anhydre dans environ 800 mL de solution d'extraction à 5 % d'acide acétique (dans une fiole jaugée de 1 L).

**8.1.2** Remplir avec la solution d'extraction.

## **8.2 Étalons de nitrate de potassium**

**8.2.1** Prélever des volumes appropriés (de 0,60 à 3,0 mL) de solution mère primaire de nitrate et les diluer à 100 mL avec la solution d'extraction, afin d'obtenir des étalons dilués ayant des concentrations d'azote (sous forme de nitrates) se situant dans les gammes détaillées ci-dessous :

Étalon	Vol (mL) de solution mère primaire de $KNO_3$	Volume final en mL	Azote [ppm]
Blanc 0	0	10	0,0
Étalon 1	0,2	100	4
Étalon 2	1,5	100	10
Étalon 3	1,0	100	20
Étalon 4	2,0	100	40
Étalon 5	3,0	100	60

**8.2.2** De nouvelles solutions d'étalonnage des nitrates sont préparées tous les cinq jours ouvrables.

## **8.3 Solution mère primaire de nitrite de sodium (2 000 ppm)**

**8.3.1** Dissoudre 9,852 g de nitrite de sodium anhydre dans environ 800 mL de solution d'extraction à 5 % d'acide acétique (dans une fiole jaugée de 1 L).

**8.3.2** Remplir avec la solution d'extraction à 5% d'acide acétique.

## **8.4 Étalons de nitrite de sodium**

**8.4.1** Prélever 2,0 mL de solution mère primaire de nitrite et les diluer à 100 mL avec la solution d'extraction afin d'obtenir un étalon à 40 ppm d'azote (sous forme de nitrates).

**8.4.2** Utiliser immédiatement pour vérifier l'efficacité de réduction.

**8.4.3** Préparer un nouvel étalon de nitrites à chaque utilisation.

## **9 ÉCHANTILLONNAGE**

**9.1** Procéder à l'échantillonnage des produits du tabac pour fins d'analyse en suivant les spécifications de la publication T-115.

## **10 ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON**

### **10.1 Préparation de l'échantillon éprouvette**

- 10.1.1** Le tabac entier nécessaire à l'analyse doit être retiré de son emballage original et inspecté de façon à déceler toute substance étrangère.
- 10.1.2** Préparer le produit conformément aux indications de la méthode d'essai T-402 de Santé Canada.
- 10.1.3** Le produit peut être analysé « tel que reçu » et les résultats sont alors corrigés, au besoin, en fonction des « matières sèches » par détermination du degré d'humidité du produit homogénéisé.

## 10.2 Extraction du tabac entier

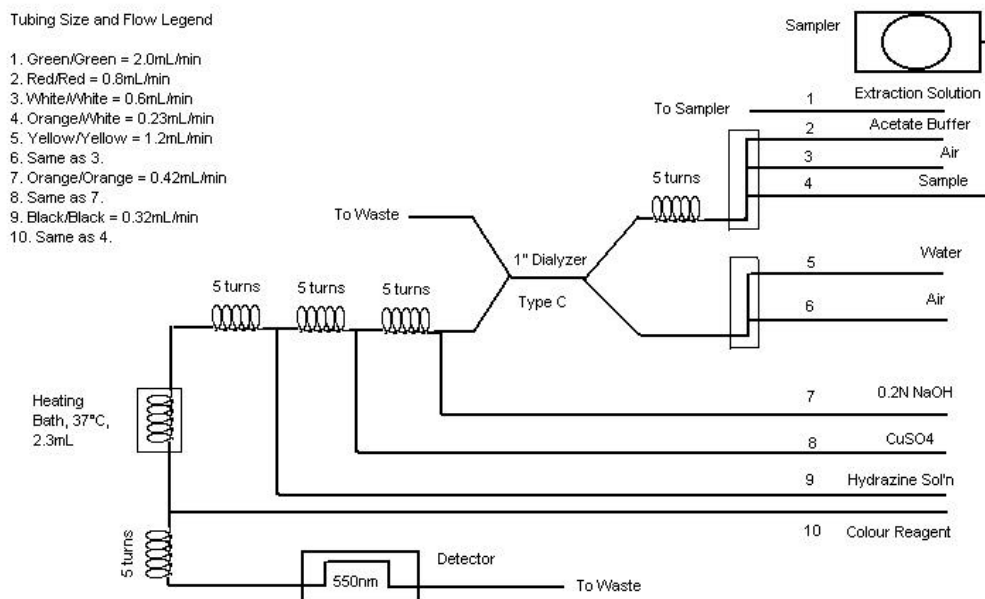
- 10.2.1** Peser exactement 0,5 g de tabac homogénéisé ou haché dans un erlenmeyer en PNP de 125 mL, avec bouchon.
- 10.2.2** Ajouter 50 mL d'acide acétique à 5 % dans la fiole jaugée et boucher celle-ci.
- 10.2.3** Pour chaque groupe d'échantillons de tabac testés :
- 10.2.4** Préparer un blanc de laboratoire (BL) de la manière suivante, pour vérifier qu'il n'existe aucune perturbation due au système d'analyse, à la verrerie et aux réactifs.
- 10.2.4.1** BL : Verser 50 mL de solution d'extraction à 5 % dans un erlenmeyer et boucher ce dernier.
- 10.2.5** Préparer un BL de la manière suivante, pour s'assurer que procédé d'analyse ne provoque aucune perte d'analyte.
- 10.2.5.1** BL : Verser 1 mL de solution mère primaire de nitrate de potassium dans un erlenmeyer propre, ajouter 49 mL de solution d'extraction à 5 % d'acide acétique, puis boucher le récipient.
- 10.2.6** Fixer les flacons sur l'agitateur oscillant et agiter pendant 15 minutes.
- 10.2.7** Filtrer ensuite l'extrait de tabac entier sur un filtre attaché à une seringue jetable de 5cc et recueillir le filtrat directement dans un flacon pour analyseur automatique.
- 10.2.8** Après avoir agité, préparer une matrice fortifiée (MF) avec une cigarette de contrôle standard, de la manière suivante :
- 10.2.8.1** MFA : Verser 5 mL de solution d'extraction à 5 % d'acide acétique dans une fiole jaugée. Fixer un filtre PVDF de 0,45 µm sur une seringue jetable de 5 cc et filtrer l'extrait de tabac en le recueillant directement dans la fiole de 10 mL, jusqu'à la remplir au trait.
- 10.2.8.2** MFB : Verser 4,9 mL de solution d'extraction à 5 % d'acide acétique et 0,1 mL de solution mère primaire de nitrate de potassium dans une fiole jaugée. Fixer un filtre PVDF de 0,45 µm sur une seringue jetable de 5 cc. Filtrer l'extrait de tabac en le recueillant directement dans la fiole de 10 mL, jusqu'à la remplir au trait.

## 10.3 Appareil d'analyse

### 10.3.1 Réglage de l'analyseur à débit continu

- 10.3.1.1** Consulter le diagramme suivant (diagramme 1).

**10.3.1.2** Ce réglage est spécifique de l'*Autoanalyzer Technicon*. L'emploi d'un autre analyseur automatique peut nécessiter le changement des débits et/ou de certaines composantes.



**Grosueur des tubes en débit**

1. Vert/vert = 2,0 mL/minute
2. Rouge/rouge = 0,8 mL/minute
3. Blanc/blanc = 0,6 mL/minute
4. Orange/blanc = 0,23 mL/minute
5. Jaune/jaune = 1,2 mL/minute
6. Comme en 3
7. Orange/orange = 0,42 mL/minute
8. Noir/noir = 0,32 mL/minute

1. Solution d'extraction
2. Tampon acétate
3. Air
4. Échantillon
5. Eau
6. Air
7. 0.2N NaOH
8. CuSO<sub>4</sub>
9. Sol d'hydrazine
10. Réactif colométrique

Diagramme 1 : Schéma de traitement avec le *Technicon AutoAnalyzer*

**10.3.2** Vérification de l'efficacité de réduction.



**10.3.2.1** L'efficacité de réduction de chaque solution diluée d'hydrazine doit être vérifiée. Faire cette vérification avec l'étalon à 40 ppm de nitrate et les étalons de nitrite. Si la concentration apparente d'azote sous forme de nitrates (réponse) est bien plus faible que la concentration d'azote sous forme de nitrites, ajuster la solution diluée d'hydrazine en ajoutant des volumes de 1 mL de solution mère d'hydrazine, jusqu'à ce que les deux étalons donnent la même réponse.

**10.3.3** Analyse en débit continu.

**10.3.3.1** Utiliser l'échantillonneur automatique de manière normale avec une vitesse d'échantillonnage de 20 à l'heure, avec un rapport de volume d'échantillon/eaux de rinçage de 2:1. Il faut laisser le temps nécessaire au système pour que les réactifs pompés s'équilibrent. Les conditions peuvent varier selon l'analyseur utilisé.

**10.3.4** Charger les flacons d'échantillon sur l'échantillonneur automatique de manière telle que les flacons d'étalons soient les premiers analysés. Corriger ensuite la ligne de base, puis analyser les échantillons d'extrait de tabac. Analyser un étalon à tous les 10 échantillons. Faire une dernière correction de la ligne de base.

**10.3.5** Analyser les échantillons une seconde fois seulement si le pic produit est hors gamme ou s'il y a eu un problème lors de l'analyse.

**10.3.6** Procéder à une dialyse *in situ* des échantillons.

**10.3.7** Intercaler à intervalles réguliers des flacons d'échantillonnage ne contenant que la solution d'extraction à 5 % d'acide acétique pour permettre la correction de la ligne de base.

**10.3.8** Se servir également de la solution d'extraction à 5 % d'acide acétique comme solution de rinçage.

## **10.4** Calculs

**10.4.1** Préparation de la courbe d'étalonnage :

**10.4.1.1** Préparer une courbe d'étalonnage en rapportant la concentration de l'étalon en fonction de la hauteur du pic correspondant, de façon à déterminer le facteur de réponse (FR).

**10.4.2** Dosage des échantillons :

**10.4.2.1** Calculer la quantité d'azote présente dans la solution extraite par la méthode de l'étalon externe, en multipliant la hauteur obtenue pour la solution par le facteur de réponse (FR).

$$\text{Azote (: g/mL)} = \text{hauteur}_{\text{éch.}} \times \text{FR.}$$

**10.4.3** Calcul de la teneur en azote (: g/g ) sous forme de nitrates :

**10.4.3.1** En entrant le multiplicateur (volume total de dilution de l'échantillon original - 50 mL) et le diviseur (poids original de l'échantillon – 0,5 g) appropriés, la teneur en nitrates se calcule automatiquement en µg/g.

$$\text{Azote (: g/g)} = \frac{\text{ppm d'azote (: g/mL)} \times 50 \text{ mL}}{0,5 \text{ g d'échantillon}}$$

**10.4.4** Le % d'azote peut être calculé avec la formule suivante :

$$\text{Azote (\%)} = \frac{\text{ppm d'azote (}\mu\text{g/g)}}{1000}$$

**10.4.5** Tous les résultats peuvent être exprimés par rapport au tabac « tel que reçu ». Ils peuvent aussi être exprimés en fonction des « matières sèches » par introduction du degré d'humidité approprié.

**10.4.6** Tous les résultats peuvent être rapportés sous forme de nitrates (%) ou de nitrates (: g/g) en multipliant les résultats correspondants obtenus pour l'azote par 4,43 (le rapport de la masse de l'ion nitrate sur celle de l'azote).

$$\text{Nitrates (: g/g)} = \text{Azote (: g/g)} \times 4,43.$$

$$\text{Nitrates (\%)} = \text{Azote (\%)} \times 4,43.$$

## 11 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

### 11.1 Taux de récupération et niveaux de contamination

**11.1.1** Chaque série d'analyses d'échantillons de cigarette doit comprendre :

**11.1.1.1** Un blanc de réactif (BR) pour évaluer l'ampleur de toutes les perturbations dues à la verrerie, aux réactifs et à l'analyseur. Le résultat typique d'un BR est ND (non décelé).

**11.1.1.2** Un blanc fortifié (BF) pour évaluer l'ampleur de la perte éventuelle d'analyte.

**11.1.1.3** Une matrice fortifiée (MF) pour évaluer les perturbations dues à la matrice. Pour ce faire, doper un échantillon réel d'une quantité connue d'analyte et en déterminer le taux de récupération.

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

**11.2.1** Limite de détection de la méthode (LDM)

La limite de détection de la méthode est déterminée en analysant, en tant qu'inconnu, l'étalon de plus faible concentration au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LDM est égale à trois fois l'écart-type de ces mesures.

#### 11.2.2 Limite de dosage (LD)

La limite de dosage est déterminée en analysant, en tant qu'inconnu, l'étalon de plus faible concentration au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LD est égale à 10 fois l'écart-type de ces mesures.

### 11.3 Stabilité des réactifs

11.3.1 La solution mère de sulfate d'hydrazine est stable jusqu'à six mois à la température ambiante ( $\pm 20$  °C) dans une bouteille ambre scellée.

11.3.2 La solution diluée de sulfate d'hydrazine est stable jusqu'à un mois à la température ambiante ( $\pm 20$  °C).

11.3.3 La solution mère et les étalons dilués de nitrite de sodium doivent être préparés à chaque utilisation, à cause de leur instabilité.

11.3.4 La solution de réactif colorimétrique au sulfanilamide est stable jusqu'à un mois si elle est conservée à 4 °C dans une bouteille ambre.

11.3.5 Toutes les solutions mères primaires de nitrate sont préparées toutes les semaines.

11.3.6 Tous les étalons dilués de nitrate et les solutions d'extraction sont préparés toutes les semaines.

11.3.7 Tous les échantillons sont analysés aussitôt qu'ils sont prêts, dans les 24 heures.

## 12 RÉFÉRENCES

12.1 *AOAC Official Method 968.07, Nitrogen (Nitrate and Nitrite) in Animal Feed, Colorimetric Method, AOAC Official Methods of Analysis (1995), Chapitre 4, p. 14 -15.*

12.2 *Industrial Method No. 838 - 87T; Nitrate in Tobacco Extracts, Bran + Leubbe Inc., Technicon Industrial Systems Corp., 1025 Busch Parkway, Buffalo Grove, Illinois, USA 60090 - 4516.*