

N° : T - 309
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 7

1 PORTÉE

- 1.1** Les nitrosamines volatiles (NAV) sont formées lors du traitement du tabac et du fumage des produits du tabac. Parmi les méthodes de traitement du tabac, on compte le séchage à l'air, le séchage au soleil, le séchage à l'air chaud, le séchage au feu, le vieillissement et la fermentation.
- 1.2** Cette méthode convient au dosage de quatre N-nitrosamines spécifiques du tabac (NAST) présentes dans le tabac entier : N-nitrososornicotine (NNN), 4-(N-nitrosométhylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), N-nitrosoanatabine (NAT) et N-nitrosoanabasine (NAB) .

2 MÉTHODES APPLICABLES

- 2.1** American Society for Testing and Materials (ASTM) : Méthode D 1193-77, Standard Specifications for Reagent Water, Version 1977.
- 2.2** Méthode d'analyse T-402 de Santé Canada : Préparation des produits du tabac (cigarettes, tabac à cigarettes, cigares, kreteks, bidis et tabacs en feuille, pour pipe, à priser et à mâcher emballés) pour des analyses 1999-12-31, 1999-12-31.
- 2.3** Méthode d'analyse T-115 de Santé Canada : Dosage du « goudron », de la nicotine et du monoxyde de carbone (CO) dans la fumée principale de tabac, 1999-12-31.

3 DÉFINITIONS

- 3.1** Pour une définition des termes utilisés dans le présent document, se reporter à la méthode T-115.

4 RÉSUMÉ DE LA MÉTHODE

- 4.1** Les NAST sont extraites avec un tampon aqueux contenant de l'acide ascorbique pour empêcher la formation de nitrosamines. Les NAST sont enrichies par extraction avec du dichlorométhane, puis par chromatographie sur colonne. La fraction renfermant les NAST est ensuite dosée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un analyseur d'énergie thermique (CG-AET). La N-nitrosoguvacoline (NG) est utilisée comme étalon interne.

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.

Nota : Ces quatre NAST sont des substances cancérigènes chez plusieurs espèces d'animaux de laboratoire. Elles doivent être manipulées avec un soin extrême. Les rejets du détecteur AET doivent être évacués de façon appropriés afin de réduire le plus possible les risques d'exposition à un excès d'ozone (O₃).

5 APPAREILAGE ET ÉQUIPEMENT

- 5.1 Ballon de 250 mL à joint en verre rodé.
- 5.2 Équipement nécessaire à la préparation du tabac en vue de l'analyse, précisé dans la méthode T-402.
- 5.3 Fioles jaugées de 5, 10, 50 et 100 mL.
- 5.4 Feuille d'aluminium.
- 5.5 Agitateur oscillant.
- 5.6 Pipettes Pasteur.
- 5.7 Turbo-évaporateur Zymark TurboVap II, muni de tubes de 200 mL avec extrémité graduée de 1 mL, ou l'équivalent.
- 5.8 Analyseur d'énergie thermique (Thermo-Electron Corp.) couplé au CG, ou l'équivalent.
- 5.9 Chromatographe en phase gazeuse, avec injecteur à température programmable, contrôle électronique du débit et logiciels de traitement des données.
- 5.10 Colonne capillaire en silice fondue DB-1 pour CG, 30 m X 0,32 mm X 3,0 µm, ou l'équivalent.
- 5.11 Tube d'absorption Varian Chem Elut CE201000, ou l'équivalent.
- 5.12 Éclairage autre qu'éclairage ultraviolet (UV).

6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Nota : Tous les réactifs doivent être, au minimum, des réactifs de qualité analytique.

- 6.1 Dichlorométhane, distillé en verre, ou l'équivalent.
- 6.2 Acétone, qualité analytique, distillée en verre, ou l'équivalent.
- 6.3 Sulfate de sodium – anhydre.
- 6.4 Alumine basique.
- 6.5 Acide citrique (anhydre).
- 6.6 Acide L-ascorbique.
- 6.7 Phosphate monosodique.
- 6.8 Méthanol, distillé en verre, ou l'équivalent.
- 6.9 Eau de type I (D1193 de l'ASTM).

7 PRÉPARATION DE LA VERRERIE

- 7.1 Le lavage et le séchage doivent être effectués de manière à ce que la verrerie ne constitue pas une source de contamination.

8 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

8.1 Solution 1/1 d'acétone et de dichlorométhane

- 8.1.1 Mélanger de l'acétone et du dichlorométhane dans un rapport volumique de 1/1.

8.2 Tampon de citrate-phosphate contenant de l'acide L-ascorbique**8.2.1** Préparer 1 L de solution aqueuse renfermant :

55 mM d'acide citrique.
90 mM de phosphate monosodique.
20 mM d'acide L-ascorbique.

Nota : Le pH de cette solution doit se situer entre 4,3 et 4,5. Sinon, préparer une nouvelle solution.

9 PRÉPARATION DES ÉTALONS**9.1 Étalon interne de N-nitrosoguvacoline (NG)****9.1.1** Préparer une solution contenant 5000 ng/mL de NG dans du dichlorométhane.**9.2 Solution étalon mixte de NAST****9.2.1** Préparer une solution étalon mixte de NNN, de NAT, de NAB et de NNK dans du dichlorométhane, présentant les concentrations suivantes :

3000 ng/mL de NNK.
1500 ng/mL de NNN.
500 ng/mL de NAB.

Nota : Les solutions concentrées sont stables pendant environ six mois si elles sont conservées à - 20 °C.

9.3 Préparer une courbe d'étalonnage dans la plage allant d'environ 20 ng/mL (pour le NAB) à 2000 ng/mL (pour le NNK); les solutions doivent contenir 500 ng/mL de NG comme étalon interne.

Nota : Les solutions d'étalonnage individuelles sont stables pendant deux mois si elles sont conservées à - 20 °C.

10 ÉCHANTILLONNAGE**10.1** L'échantillonnage des produits du tabac à analyser doit être effectué conformément à la méthode T-115.**11 PRÉPARATION DES PRODUITS DU TABAC****11.1 Homogénéisation du tabac entier****11.1.1** Retirer le tabac à cigarette (ou le tabac de petits cigares, le tabac coupe fine ou le tabac à mâcher) de son emballage pour constituer un échantillon composite.

11.1.2 Préparer le tabac conformément à la méthode T-402.

11.1.3 Pour présenter les résultat en termes de « matière sèche », il faut doser l'humidité dans une portion séparée de 3 g du tabac homogénéisé.

12 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

12.1 Extraction du tabac entier

12.1.1 L'éclairage dans la salle d'analyse ne doit pas être un éclairage UV.

12.1.2 Peser avec précision 1 g de tabac entier dans un ballon de 250 mL enveloppé dans une feuille d'aluminium.

12.1.3 Ajouter 500 µL de la solution de NG (étalon interne).

12.1.4 Ajouter 50 mL de tampon de citrate-phosphate renfermant de l'acide L-ascorbique.

12.1.5 Placer la ballon sur un agitateur oscillant et agiter pendant 60 minutes pour totalement saturer et extraire le tabac.

12.2 Purification de l'échantillon

12.2.1 Couper l'extrémité (pour permettre au liquide de s'écouler) d'une colonne Chem-Elut CE20100 et placer au-dessous un tube de 200 mL pour turbo-évaporateur.

12.2.2 Verser tout l'extrait contenu dans le ballon sur la colonne CE20100.

12.2.3 Rincer le ballon avec deux portions de 5 mL du tampon de citrate-phosphate, puis ajouter sur la colonne CE20100.

12.2.4 Attendre cinq minutes pour que le remplissage puisse absorber la solution aqueuse.

12.2.5 Rincer le ballon avec 150 mL de dichlorométhane, puis verser sur la colonne CE201000.

12.2.6 Après passage de la portion de 150 mL de dichlorométhane dans la colonne et lorsque les gouttes s'échappent de la colonne à un rythme de moins de 1 goutte/seconde, répéter l'étape 12.2.5 en rinçant avec une autre portion de 150 mL de dichlorométhane.

12.2.7 Continuer de récupérer l'extrait jusqu'à l'obtention de 250 mL.

Nota : Pour ce faire, il faut récupérer la fraction de nitrosamines dans un deuxième tube dont le contenu sera combiné à celui du premier tube après réduction par évaporation.

12.2.8 Mettre l'échantillon dans le turbo-évaporateur réglé 38 °C et à une pression d'azote de 10 lb/po².

- 12.2.9** Réduire le volume de l'échantillon à 3,5 mL (ceci prend environ 45 minutes).
- 12.2.10** Transférer le concentré dans une fiole jaugée de 5 mL et compléter avec le dichlorométhane utilisé pour le rinçage du turbo-évaporateur.
- 12.2.11** Transférer l'échantillon dans un flacon ambre pour échantillonneur automatique, muni d'un septum recouvert de téflon, en vue de l'analyser par CG.

12.3 Paramètres du CG-AET

- 12.3.1** Débit du gaz vecteur (He) : 2,8 mL/min contrôlé électroniquement (vitesse = 60 cm/seconde).
- 12.3.2** Température de l'injecteur : programmable de 35 à 220 °C.
- 12.3.3** Température du four : programmée de 50 à 170, puis à 212 °C.
- 12.3.4** Température de l'interface avec l'AET : 240 °C.
- 12.3.5** Température du four de l'AET : 500 – 525 °C (selon la sensibilité de l'analyseur).
- 12.3.6** Durée d'une analyse : 35 minutes.

12.4 Étalonnage du CG-AET

- 12.4.1** Injecter 1,5 µL de solution mixte de NAST et calculer la surface sous les pics correspondant à ces quatre composés.

12.5 Dosage des NAST

- 12.5.1** Injecter 1,5 µL de concentré d'échantillon (11.3.11) et calculer la surface sous les pics dont les temps de rétention correspondent à ceux de la NNN, de la NAT, de la NAB et de la NNK.

12.6 Calculs

- 12.6.1** La teneur, m (ng/g), d'une NAST donnée est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$m \text{ (ng/g)} = CV_s/N.$$

dans laquelle :

C = concentration calculée par comparaison avec l'étalon interne.

V_s = volume final du concentré.

N = poids (en g) de tabac extrait.

- 12.7** Pour convertir les résultats en ng/g de « matière sèche », il faut tenir compte du taux d'humidité, de la manière suivante :

$$m \text{ (ng/g)}_{\text{matière sèche}} = m \text{ (ng/g)}_{\text{tel que}} / (1 - (\% \text{ d'humidité}/100)).$$

dans laquelle le % d'humidité est calculé dans le même échantillon « dans son état initial de réception », après traitement du lot.

13 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

13.1 Chromatogramme typique

13.1.1 Voir l'annexe .

13.2 Limite de détection de la méthode (LDM) / limite de dosage (LDD)

13.2.1 Déterminer la limite de détection de la méthode (LDM) 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 résultats.

13.2.2 Calculer la LDM (en ng/g) en multipliant la LDM (déterminée en ng/mL) par le volume final de l'extrait, puis en divisant par le poids de tabac utilisé pour l'extraction.

13.2.3 La LDM (en ng/g) peut être modifiée en variant les volumes de dilution finals utilisés pour l'extraction et la purification.

13.2.4 Déterminer la limite de dosage (LDD) 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 LDD est égale à 10 fois l'écart-type de ces résultats.

13.2.5 Calculer la LDD (en ng/g) en multipliant la LDD (déterminée en ng/mL) par le volume final de l'extrait, puis en divisant par le poids de tabac utilisé pour l'extraction.

13.2.6 L'effet sur la LDD de la modification des volumes de dilution finals utilisés pour l'extraction et la purification est le même que pour la LDM.

14 RÉFÉRENCES

- 14.1 Adams, J.D., Brunemann, K.D. et Hoffmann, D., 1983. Chemical studies on tobacco smoke. LXXV. Rapid method for the analysis of tobacco-specific N-nitrosamines by gas-liquid chromatography with a thermal energy analyser. *J. Chromatogr.*, 256, p. 347-351.
- 14.2 Hecht, S.S., Adams, J.D. et Hoffmann, D., 1983. Tobacco-specific nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. Dans : Preussmann, R., O'Neill, I.K., Eisenbrand, G., Spiegelhalder, B. et Bartsch, H., éditeurs, *Environmental Carcinogens- Selected Methods of Analysis*, vol. 6, N-Nitroso Compounds (Publications scientifiques du CIRC n° 45), Lyon, Centre international de recherche sur le cancer, p. 93-101.
- 14.3 Hoffmann, D., Adams, J.D., Brunemann, K. D. et Hecht, S. S., 1979. Assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco products. *Cancer Res.*, 39, p. 2505-2509.
- 14.4 Spiegelhalder, B., Kubacki, S.J. et Fischer, S., 1989. « A Method for the Determination of Tobacco-specific Nitrosamines (TSNA), Nitrate and Nitrite in Tobacco Leaves and Processed Tobacco ». *Beitrag zur Tabakforschung International*, 14, p. 135-143.

- 14.5 Risner, Charles H. et Wendelboe, Fred N., 1994. Quantification of Tobacco Specific Nitrosamines in Tobacco, *Tob. Sci.*, 38, p. 1-6.
- 14.6 Protocol to Measure the Quantity of Nicotine Contained in Smokeless Tobacco Products Manufactured, Imported, or Packaged in the United States, 1997. Federal Registrar, vol. 62, n° 85, vendredi 2 mai 1997.

ANNEXE : Chromatogramme typique

Exemple de chromatogramme de l'extrait de tabac entier provenant d'une cigarette 1R4F.

