
N° : T - 105
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 9

1 PORTÉE

- 1.1 La présente méthode s'applique au dosage de l'eugénol dans la matière particulaire totale (MPT) présente dans le condensat de la fumée principale de tabac.
- 1.2 Cette méthode décrit la séparation et le dosage de l'eugénol dans la matière particulaire totale de la fumée principale de tabac provenant de cigarettes de tabac et de girofle, à l'aide d'un chromatographe liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée à régime isocratique muni d'un détecteur UV.
- 1.3 Cette méthode est destinée à être utilisée comme analyse de routine n'exigeant pas la formation d'un dérivé. Elle s'applique aux cigarettes traitées (kreteks).
- 1.4 Cette méthode doit être utilisée uniquement pour doser l'eugénol ajouté comme aromatisant au tabac.
- 1.5 Cette méthode ne permet pas de distinguer l'eugénol ajouté de l'eugénol présent naturellement.

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-115 de Santé Canada : Dosage du « goudron », de la nicotine et du monoxyde de carbone 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 On prélève l'eugénol présent dans la fumée principale de tabac en faisant passer la fumée sur un disque (tampon) filtrant en fibre de verre.
- 4.2 On extrait le tampon avec un solution d'isopropanol.
- 4.3 On filtre, à l'aide d'une seringue, une portion de la solution d'extraction dans un flacon pour échantillonneur automatique en verre ambré, de 1,5 mL, puis on l'analyse à l'aide d'un CLHP muni d'un détecteur UV.
- 4.4 L'eugénol présent dans la MPT de la fumée principale de tabac est dosé par des méthodes utilisant des étalons externes. La réponse obtenue avec les échantillons est ensuite comparée à une courbe d'étalonnage tracée à partir des résultats obtenus avec six étalons.

- 4.5** Le temps est un élément très important dans cette analyse, car les cigarettes de girofle conditionnées (kreteks) peuvent perdre d'importantes quantités d'huile de girofle en seulement quelques jours. Un disque (tampon) filtrant en fibre de verre peut, après seulement une heure d'exposition à l'air, perdre 30 % de l'eugénol ajouté par dopage avec une solution.

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.

5 APPAREILLAGE ET ÉQUIPEMENT

- 5.1** Équipement nécessaire au conditionnement, tel que défini dans la méthode T-115.
- 5.2** Équipement nécessaire au marquage de la longueur des mégots, tel que défini dans la méthode T-115.
- 5.3** Équipement nécessaire au fumage mécanique des produits du tabac, tel que défini dans la méthode T-115.
- 5.4** Distributrices, 10 – 50 mL.
- 5.5** Fioles jaugées, ambrées - Classe A – 10 mL, 100 mL, 10 L.
- 5.6** Pipettes - Classe A – 10 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL, 2,5 mL, 5 mL.
- 5.7** Erlenmeyers – 125 mL.
- 5.8** Balance de précision précise à 0,1 mg.
- 5.9** Agitateur secoueur.
- 5.10** Seringues jetables – 5 cm³.
- 5.11** Pipettes Pasteur, en verre.
- 5.12** Entonnoir filtrant, en verre.
- 5.13** Tube sécheur.
- 5.14** Agitateur avec barreau magnétique.
- 5.15** Parafilm® ou l'équivalent.
- 5.16** Filtres à seringue – 0,45 µm, en PTFE (téflon), 13 mm.
- 5.17** Système de chromatographie liquide à haute pression piloté par ordinateur, comprenant :
- 5.17.1** Système d'alimentation en solvant – pompe à gradient ternaire.
 - 5.17.2** Échantillonneur automatique réfrigéré avec boucle d'échantillonnage partiellement rempli.
 - 5.17.3** Détecteur UV.
 - 5.17.4** Poste de travail.
 - 5.17.5** Colonne RP 18^e.
 - 5.17.6** Colonne de garde jetable.

6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

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

- 6.1** Eugénol – pureté d'au moins 99 %
- 6.2** Anéthole – pureté d'au moins 99 %
- 6.3** Méthanol – distillé en verre

6.4 Isopropanol – distillé en verre

6.5 Eau de type I (conforme aux spécifications de la norme ASTM D1193)

7 PRÉPARATION DE LA VERRERIE

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

8 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

8.1 Préparation d'une solution d'isopropanol

8.1.1 Pipetter 15 mL de méthanol et 2000 µL d'anéthole (étalon interne) dans une fiole jaugée de 10 L. Compléter avec de l'isopropanol. Cette solution peut aussi servir au dosage de l'eau et de la nicotine conformément à la méthode MS - 115. On peut ajuster le volume pour qu'il corresponde aux quantités nécessaires, mais les rapports méthanol/isopropanol et anéthole/isopropanol doivent demeurer les mêmes.

8.1.2 Conserver la solution d'extraction à l'obscurité et à la température ambiante, dans un contenant soumis à une agitation lente et constante et muni, à sa partie supérieure, d'un tube sécheur.

9 PRÉPARATION DES ÉTALONS

9.1 Préparer une solution mère primaire d'eugéno! (2,0 mg/mL) en pesant précisément 200 mg d'eugéno! pur dans une fiole jaugée de 100 mL et en complétant au trait avec du méthanol.

9.2 Préparer six étalons de travail dans la plage de 2 – 1000 µg/mL en diluant de la solution mère d'eugéno! (0,01 à 5000 µL) jusqu'à 10 mL avec la solution d'isopropanol (voir **annexe 1**).

9.3 Transvider des portions 1,5 mL dans des flacons ambrés pour échantillonneur automatique. Rincer d'abord les flacons avec la solution, puis remplir de manière à réduire le plus possible l'espace libre.

9.4 Mettre les flacons dans un support pour flacons et conserver à l'obscurité à une température de 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

9.5 Préparer de nouveaux étalons d'eugéno! à tous les cinq jours ouvrables.

Nota : Conserver toutes les solutions à 4 °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 Le conditionnement du produit doit être effectué conformément à la méthode T-115.
- 11.2 La longueur de mégot des cigarettes, des équivalents-cigarettes, des bidis, des kreteks et des cigares doit être indiquée conformément à la méthode T-115.
- 11.3 La préparation des cigarettes à être fumées dans des conditions intenses doit être effectuée conformément à la méthode T-115.

12 PRÉPARATION DE LA MACHINE À FUMER

12.1 Conditions ambiantes

- 12.1.1 Les conditions ambiantes de fumage doivent être conformes à celles de la méthode T-115.

12.2 Conditions relatives à la machine à fumer

- 12.2.1 Les conditions relatives à la machine à fumer doivent être conformes à celles de la méthode T-115.

13 PRODUCTION D'ÉCHANTILLONS

- 13.1 Fumer trois cigarettes* et prélever la MPT de la manière décrite dans la méthode T-115.

*Pour l'analyse d'autres produits du tabac, choisir un nombre de produits tel que les filtres pourront piéger toute la matière solide.

14 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

14.1 Extraction des tampons filtrants

14.1.1 Cigarettes de girofle : Une fois le fumage mécanique terminé, réduire le tampon filtrant en pulpe dans 50 mL de la solution d'étalon interne d'anéthole (200 µg d'anéthole/mL d'isopropanol), en agitant pendant 30 minutes dans un erlenmeyer sur l'agitateur secoueur. Diluer 2 mL de cette solution jusqu'à 10 mL avec la solution d'étalon interne d'anéthole, dans le cas de cigarettes à haute teneur en eugénol. Filtrer sur un filtre de 0,45 µm dans un flacon pour échantillonneur automatique.

14.1.2 Cigarettes autres que cigarettes de girofle ou cigarettes à faible teneur en eugénol : Une fois le fumage terminé, réduire le tampon filtrant en pulpe dans 40 mL de la solution d'extraction (200 µg/mL d'anéthole/mL d'isopropanol) pendant 30 minutes, dans un erlenmeyer sur l'agitateur secoueur. Filtrer sur un filtre de 0,45 µm dans un flacon pour échantillonneur automatique.

14.2 Analyse par CLHP en phase inversée

- 14.2.1 Régler le détecteur UV à 280 nm.

14.3 Paramètres du CLHP (en phase inversée)

- 14.3.1 Température de la colonne : 30 °C.

14.3.2 Phase mobile : réactifs.

14.3.3 Solvant A : méthanol/eau de type I (80/20) filtré et dégazé (par barbotage d'hélium UHP).

14.3.4 Lavage de l'échantillon : solvant A.

14.3.5 Phase mobile : gradient.

Débit : 0,7 mL/minute	Composition		
Temps (minutes)			
0,0	100 % A	0 % B	0 % C
20,0	100 % A	0 % B	0 % C
Fin de méthode	100 % A	0 % B	0 % C

(Équilibrer 10 minutes).

14.4 Analyse des échantillons

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

14.4.2 Injecter 20 µL de chaque échantillon sur la colonne de CLHP, puis procéder à l'analyse. Le chromatogramme doit être semblable à ceux des **figure 1a** et **1b**.

14.5 Calculs

14.5.1 Préparation d'une courbe d'étalonnage

14.5.1.1 Injecter 20 µL de chaque étalon sur la colonne de CLHP, puis procéder à l'analyse. Effectuer l'analyse en double. Le chromatogramme doit être semblable à celui de la **figure 2**.

14.5.1.2 Préparer une courbe d'étalonnage en traçant la concentration d'eugénol en fonction de l'aire sous les pics correspondants. Déterminer le facteur de réponse à partir le courbe d'étalonnage.

14.5.2 Dosage de l'eugénol

14.5.2.1 Doser l'eugénol dans les échantillons de tabac entier par la méthode des étalons externes.

14.5.2.2 Identifier les pics par comparaison des temps de rétention avec des étalons et par dopage d'échantillons de tabac.

14.5.3 Détermination de la teneur en eugénol (en µg/cigarette)

14.5.3.1
$$\text{Eugénol } [\mu\text{g/cigarette}] = \frac{\text{aire sous le pic(é. int.)}}{\text{Facteur de réponse}} \times \frac{\text{mL de solution}}{\text{Nbre de cigarettes fumées}}$$

15 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

15.1 Taux de récupération et niveaux de contamination

15.1.1 Chaque série d'analyses doit aussi comprendre :

- 15.1.1.1 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.
- 15.1.1.2 Un blanc fortifié (BF) pour évaluer l'importance des pertes potentielles d'analytes.
- 15.1.1.3 Une matrice fortifiée (MF) pour évaluer les effets perturbants de la matrice. Pour ce faire, doser un échantillon véritable avec une concentration connue et déterminer le taux de récupération.

15.2 Limite de détection de la méthode (LDM) et limite de dosage (LDD)

15.2.1 Limite de détection de la méthode (LDM)

- 15.2.1.1 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.

15.2.2 Limite de dosage (LDD)

- 15.2.2.1 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 LDD est égale à 10 fois l'écart-type de ces mesures

15.3 Stabilité des réactifs et des solutions

- 15.3.1 Préparer de nouvelles solutions étalons primaires d'eugéno1 à chaque semaine.
- 15.3.2 Préparer de nouveaux étalons de travail et de nouveaux solvants d'extraction à chaque semaine.
- 15.3.3 Analyser tous les échantillons dans les 24 heures

16 MODIFICATIONS POUR DES CONDITIONS DE FUMAGE INTENSE

- 16.1 Dans des conditions de fumage intense, le nombre de cigarettes fumées peut être réduit à deux.

17 RÉFÉRENCES

- 17.1 Myint, S., Daud, W.R.W., Mohmand, A.B. et Kadhum, A.A.H. Separation and Identification of Eugenol in Ethanol Extract of Cloves by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *Journal of American Oil Chemist Society*, 72, 1995, p. 1231-1233.
- 17.2 Guerin, M.R., Wise, M.B. et Holladay, S.K. Progress Report 3: Chemical Characteristics of Smoke Delivered by Clove-containing Cigarettes, *NCI/ORNL/S&HP Topical Report #130*, 21 mai 1985.

- 17.3** Guerin, M.R., Wise, M.B., Holladay, S.K. et Jenkins, R.A. Progress Report 4. Deliveries of Clove Specific Constituents by U.S. Purchased Indonesian Clove-containing Cigarettes, *NCI/ORNL/S&HP Topical Report #131*, 2 juillet 1985.

ANNEXES

Annexe 1 : étalons d'eugénols

Étalon	Vol (mL) 1° d'eugénol	Volume final en mL	Eugénol [µg/mL]
1	3,0	10	562,8
2	1,5	10	281,4
3	0,7	10	131,2
4	0,300	10	56,28
5	0,150	10	28,14
6	0,030	10	5,628

Nota 1 : La concentration d'eugénol varie selon la concentration exacte de l'étalon primaire qui a été préparé.

Figure 1a. Superposition du chromatogramme obtenu avec l'extrait de MPT dans la fumée principale de tabac (cigarette de type kretek) et du chromatogramme obtenu avec l'étalon. (Les pics correspondant à l'eugénol et à l'anéthole utilisé comme étalon interne possèdent un temps de rétention de 4,644 minutes et de 10,725 minutes, respectivement.)

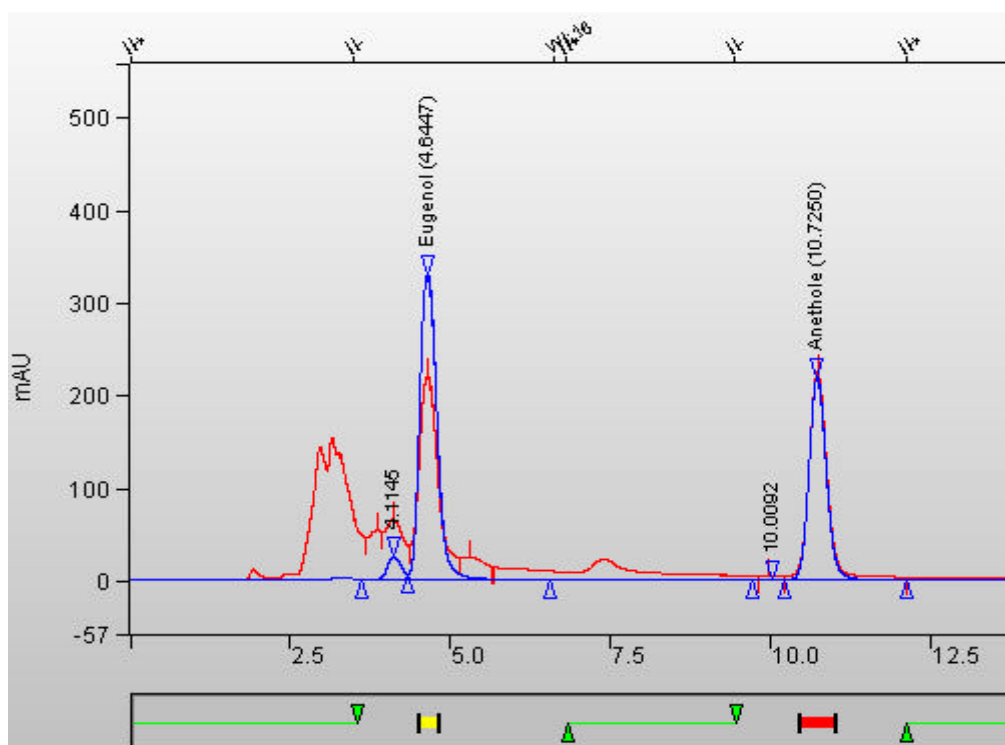


Figure 1b. Superposition du chromatogramme obtenu avec le tabac entier (cigarette de type I R4F) et du chromatogramme obtenu avec l'étalon. (Noter l'absence d'un pic correspondant à l'eugénol au temps de rétention de 4,672 minutes.)

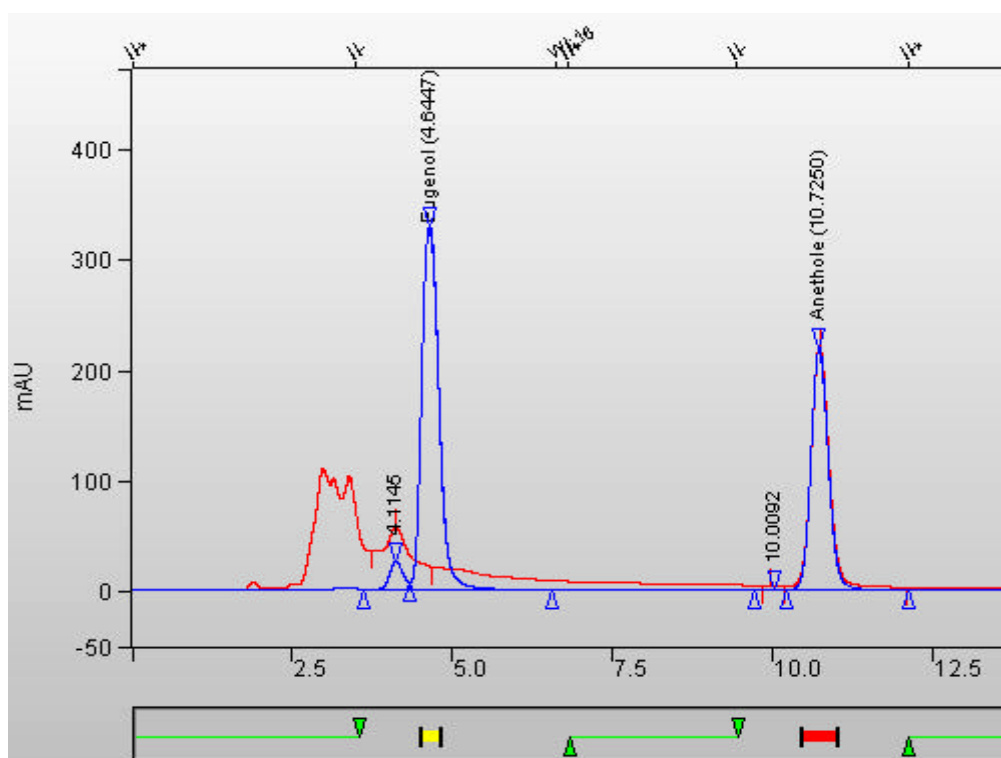


Figure 2. Chromatogramme de l'étalon d'eugénoł. (Les temps de rétention de l'eugénoł et de l'anéthole sont de 4,6447 minutes et de 10,726 minutes, respectivement.)

