

N° : T - 111
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 9

1 PORTÉE

- 1.1 La présente méthode s'applique au dosage des nitrosamines spécifiques du tabac (NAST) présentes dans la fumée principale de tabac.
- 1.2 Des nitrosamines volatiles (NAV) sont produites lors du traitement du tabac ou du fumage de produits du tabac. Parmi les méthodes utilisées pour le traitement du tabac, on retrouve le séchage à l'air, au soleil, à l'air chaud et au feu, le vieillissement et la fermentation.
- 1.3 La production de la fumée principale de tabac est réalisée dans les conditions normalisées de fumage mécanique des cigarettes, telles que définies dans la méthode T-115.
- 1.4 Cette méthode n'est utilisable que pour le dosage de quatre N-nitrosamines spécifiques du tabac dans la fumée principale de tabac (FP) : N-nitrososornicotine (NNN), 4-(N-nitrosométhylamino)-l-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), N-nitrosoanatabine (NAT) et N-nitrosoanabasine (NAB) .

2 NORMES APPLICABLES

- 2.1 Méthode d'essai T-115 de Santé Canada – Dosage du goudron, de l'eau, 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 La fumée principale de tabac de 10* cigarettes est piégée sur un disque filtrant en fibre de verre (tampon) de 92 mm. Les NAST sont concentrées par extraction avec du dichlorométhane, puis chromatographiées sur une colonne d'alumine basique. La fraction renfermant les NAST est éluée, puis dosée par chromatographie des gaz combinée à une analyse d'énergie thermique (CG/AET). La N-nitrosoguvacoline (NG) est utilisée comme étalon interne.

*Pour d'autres produits du tabac, retenir un nombre tel que le filtre ne soit pas saturé.

Nota : L'analyse et l'évaluation de certains produits à l'aide de cette méthode d'essai 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 d'essai, 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.

Ces quatre NAST sont des carcinogènes pour plusieurs espèces d'animaux de laboratoire. Elles doivent être manipulées avec un soin extrême. La sortie du détecteur par AET doit être correctement ventilée afin de réduire au minimum l'exposition possible à un excès d'ozone (O₃).

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 de mégot, 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 Ballon en verre de 250 mL, avec rodage conique.
- 5.5 Fioles jaugées de 2, 10, 50 et 100 mL.
- 5.6 Flacon ou bouteille ambre pour la conservation.
- 5.7 Feuille d'aluminium.
- 5.8 Laine de verre silanisée.
- 5.9 Agitateur oscillant Burrell, ou l'équivalent.
- 5.10 Colonne de CL avec fritté et robinet, 300 mm X 22 mm de d.i. X 25 mm de d.e. (Supelco 64754), ou l'équivalent.
- 5.11 Entonnoirs en verre à tige courte.
- 5.12 Pipettes Pasteur en verre.
- 5.13 Turbo-évaporateur Zymark TurboVap II, avec tubes de 200 mL munis d'une tige graduée de 1 mL, ou l'équivalent.
- 5.14 Analyseur d'énergie thermique (Thermo-Electron Corp.) couplé au CG, ou l'équivalent.
- 5.15 Chromatographe en phase gazeuse (CG), muni d'un injecteur à température programmable et d'un contrôle électronique du débit.
- 5.16 Colonne pour CG, 30 m X 0,32 mm X 3,0 µm, colonne capillaire en silice fondue DB-1.
- 5.17 Éclairage exempt de rayonnement ultraviolet (UV).

6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

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

- 6.1 Dichlorométhane (DCM), distillé dans du verre.
- 6.2 Acétone, distillé dans du verre.
- 6.3 Méthanol, distillé dans du verre.
- 6.4 Alumine basique.
- 6.5 Papier aluminium.
- 6.6 Filtres en fibre de verre (92 mm) avec porte-filtre.

7 PRÉPARATION DE LA VERRERIE

- 7.1 Le lavage et le séchage de la verrerie doivent être effectués de manière à ce que celle-ci ne cause pas 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.

9 PRÉPARATION DES ÉTALONS

9.1 Étalon interne de N-nitrosoguvacoline (NG)

- 9.1.1 Préparer une solution de 5 000 ng/mL de N-nitrosoguvocoline 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, avec les concentrations suivantes :

9.2.1.1 NNK : 3 000 ng/mL.

9.2.1.2 NNN et NAT : 1 500 ng/mL.

9.2.1.3 NAB : 500 ng/mL.

9.2.2 Conserver cette solution dans un flacon ambre et la protéger de la lumière.

Nota : Les solutions concentrées sont stables pendant plus de six mois si elles sont correctement conservées à -20°C et en prenant soin d'éviter toute perte de solvant.

9.2.3 Établir des courbes d'étalonnage avec des solutions étalons ayant des concentrations allant de 20 ng/mL (pour le NAB) à 2 000 ng/mL (pour le NNK) et contenant l'étalon interne NG à une concentration de 500 ng/mL.

Nota : les solutions mères individuelles d'étalonnage sont stables pendant deux mois si elles sont correctement conservées à -20°C et en prenant soin d'éviter toute perte de solvant.

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.

12.1.2 Une lumière sans rayons ultra-violets doit être utilisée dans les pièces où les échantillons sont produits et analysés.

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 pour les machines à fumer rotatives.

13 PRODUCTION DES ÉCHANTILLONS

- 13.1** Les produits du tabac doivent être fumés et la MPT piégée dans les conditions définies dans la méthode T-115, avec les modifications suivantes :
- 13.1.1** Placer 10 cigarettes (ou petits cigares) dans un canal sur deux de la machine à fumer, et les fumer.
- 13.1.2** Après le fumage des 10 cigarettes, tirer trois bouffées de garde et retirer le porte-filtre de la machine à fumer.

14 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

14.1 Extraction des tampons

- 14.1.1** Retirer le tampon de son porte-filtre et le mettre dans un ballon de 250 mL enveloppé dans une feuille d'aluminium.
- 14.1.2** Ajouter 200 µL de solution d'étalon interne NG sur le tampon (une quantité équivalente à la concentration de NG dans les étalons, en ng/mL).
- 14.1.3** Ajouter 100 mL de dichlorométhane dans le ballon.
- 14.1.4** Extraire pendant 30 minutes avec un agitateur oscillant.

14.2 Concentration des échantillons

- 14.2.1** Filtrer la solution d'extraction directement dans un tube de 200 mL Zymark, à l'aide d'un entonnoir à tige courte muni d'un bouchon en laine de verre silanisée.
- 14.2.2** Rincer le ballon avec 20 mL de DCM. Après le passage de tout le liquide d'extraction dans l'entonnoir, verser le liquide de rinçage dans l'entonnoir.
- 14.2.3** Répéter l'étape 14.2.2.
- 14.2.4** Après le passage de toutes les solutions dans l'entonnoir, placer l'échantillon sur le turbo-évaporateur TurboVap II, réglé à une température de 38 °C et à une pression d'azote de 10 lb/po².
- 14.2.5** Concentrer les échantillons jusqu'à un volume de 5 mL.

14.3 Méthode de nettoyage de la colonne de chromatographie

- 14.3.1** Préparer une colonne d'alumine basique en ajoutant 50 mL de DCM dans une colonne de CL en verre, vide et sèche.
- 14.3.2** Ajouter 10 g (\pm 0,2 g) d'alumine basique séchée au four (110 °C) au liquide se trouvant dans la colonne. Agiter la boue d'alumine avec une tige en verre afin d'éliminer toute poche d'air.
- 14.3.3** Évacuer le liquide de la colonne, puis fermer le robinet lorsque la solution se retrouve au niveau de l'alumine.

-
- 14.3.4** Nettoyer l'alumine en ajoutant 50 mL de DCM sur la colonne. Évacuer le liquide de la colonne, puis fermer le robinet lorsque la solution se retrouve au niveau de l'alumine. Jeter le liquide.
- 14.3.5** Verser l'échantillon de 5 mL, contenu dans le tube du turbo-évaporateur, sur la colonne d'alumine, en utilisant une pipette Pasteur en verre pour ne pas perturber le remplissage d'alumine.
- 14.3.6** Évacuer le liquide de la colonne, puis fermer le robinet lorsque la solution se retrouve au niveau de l'alumine. Jeter le liquide.
- 14.3.7** Rincer le tube du turbo-évaporateur avec 10 mL de DCM, en lavant la partie inférieure (25 %) du tube plusieurs fois avec une pipette Pasteur.
- 14.3.8** Ajouter les 10 mL de liquide de rinçage du tube du turbo-évaporateur sur la colonne d'alumine avec une pipette Pasteur en essayant de ne pas perturber le remplissage d'alumine.
- 14.3.9** Évacuer le liquide de la colonne, puis fermer le robinet lorsque la solution se retrouve au niveau de l'alumine.
- 14.3.10** Rincer encore le tube du turbo-évaporateur et la colonne d'alumine avec 40 mL de DCM, en essayant de ne pas perturber le remplissage d'alumine. Jeter le liquide.
- 14.3.11** Placer un tube propre de 200 mL, pour turbo-évaporateur, sous la colonne de CL.
- 14.3.12** Éluer les NAST de la colonne d'alumine en ajoutant 50 mL de solution 1:1 d'acétone et de DCM sur la colonne, en essayant de ne pas perturber le remplissage d'alumine.
- 14.3.13** Récupérer le liquide provenant de la colonne dans le tube pour turbo-évaporateur, en fermant le robinet quand le liquide est au niveau de l'alumine.
- 14.3.14** Répéter encore quatre fois les étapes 14.3.12 et 14.3.13, en récupérant à chaque fois le liquide dans le même tube pour turbo-évaporateur (au total 250 mL sont récupérés).

Nota : cette méthode nécessite l'évaporation d'une partie de l'éluat avant de pouvoir récupérer les derniers 50 mL.

14.4 Re-concentration des échantillons

- 14.4.1** Placer les échantillons sur le turbo-évaporateur TurboVap II, réglé à une température de 38 °C et une pression d'azote de 9 lb/po².
- 14.4.2** Après réduction du volume à environ 150 mL, augmenter la pression d'azote à 10 lb/po².
- 14.4.3** Réduire le volume des échantillons à 0,8 mL ou jusqu'à ce que le capteur arrête la machine (demande environ 45 min).

- 14.4.4** Transférer le concentré dans une fiole jaugée de 2 mL et ajuster le volume avec le mélange 1 :1 d'acétone et de DCM, en utilisant du solvant pour rincer le tube du turbo-évaporateur.
- 14.4.5** Transférer l'échantillon dans un flacon ambre pour échantillonneur automatique, muni d'un septum recouvert de téflon.

14.5 Conditions pour l'analyse par CG-AET

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

14.6 Essai à blanc

- 14.6.1** Faire périodiquement des essais à blanc avec de l'air purifié exempt de nitrosamines pour s'assurer de l'absence de traces de nitrosamines dans l'air ambiant et pour s'assurer qu'aucune nitrosamine ne se forme au cours de l'analyse.

14.7 Étalonnage du CG-AET

- 14.7.1** Injecter 1,5 µL de solution étalon mixte de NAST et calculer la surface des pics correspondant aux quatre composés.

14.8 Dosage des NAST

- 14.8.1** Injecter 1,5 µL d'échantillon concentré (12.4.5) et calculer la surface des pics ayant des temps de rétention correspondant aux pics du NNN, du NAT, du NAB et du NNK.

Nota : Voir l'annexe 1 pour des chromatogrammes typiques.

14.9 Calculs

- 14.9.1** La teneur, m_{cig} (ng/cigarette), en une NAST donnée est calculée à partir de la formule suivante :

$$m_{\text{cig}} = CV_s/N$$

dans laquelle

C = concentration de la NAST donnée, calculée avec la courbe d'étalonnage
 V_s = volume final du concentré
N = nombre de cigarettes/équivalents-cigarettes/petits cigares/kreteks/bidis fumés

15 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

15.1 Chromatogramme typique

15.1.1 Voir l'annexe 1.

15.2 Limite de détection de la méthode (LDM)/Limite de dosage (LDD)

15.2.1 La limite de détection de la méthode (LDM) est déterminée en analysant l'étalon de plus faible concentration au moins 10 fois pendant un intervalle de plusieurs jours. La LDM est égale à trois fois l'écart-type de ces résultats.

15.2.2 La LDM (en ng/cigarette) peut être calculée en multipliant la LDM (exprimée en ng/mL) par le volume final de l'extrait et en la divisant par le nombre de cigarettes fumées.

15.2.3 La LDM (en ng/cigarette) peut être modifiée en faisant varier le nombre de cigarettes fumées ou les volumes de solvant utilisés pour l'extraction et la purification.

15.2.4 La limite de dosage (LDD) est déterminée en analysant l'étalon de plus faible concentration au moins 10 fois pendant un intervalle de plusieurs jours. La LDD est égale à 10 fois l'écart-type de ces résultats.

15.2.5 La LDD (en ng/cigarette) peut être calculée en multipliant la LDD (exprimée en ng/mL) par le volume final de l'extrait et en la divisant par le nombre de cigarettes fumées.

15.2.6 Comme pour la LDM, la LDD peut être modifiée en faisant varier le nombre de cigarettes fumées ou les volumes de solvant utilisés pour l'extraction et la purification.

16 MODIFICATIONS POUR DES CONDITIONS INTENSES DE FUMAGE

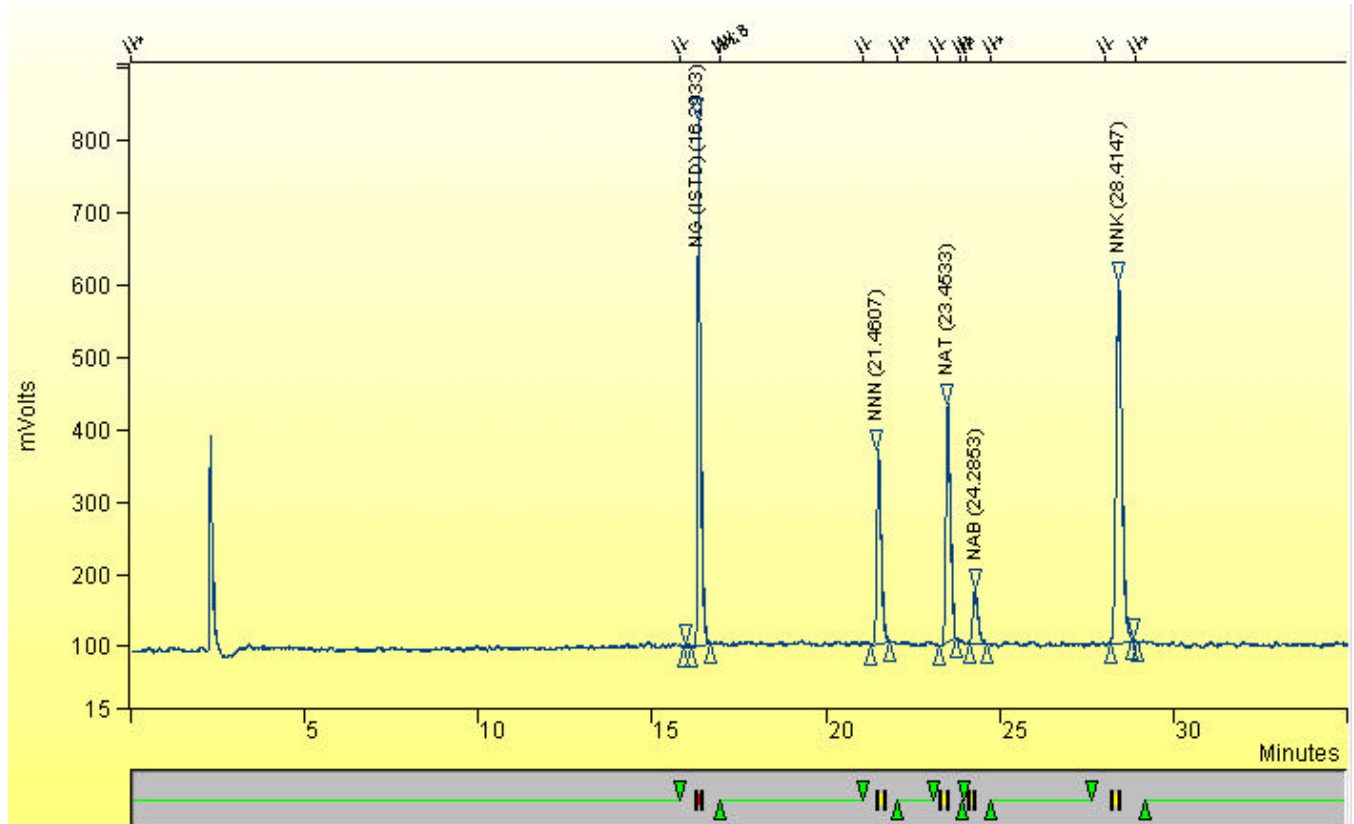
16.1 Dans des conditions intenses de fumage, le nombre de cigarettes fumées peut être modifié de manière à rester dans la plage d'étalonnage utilisée dans les conditions normales de fumage.

17 RÉFÉRENCES

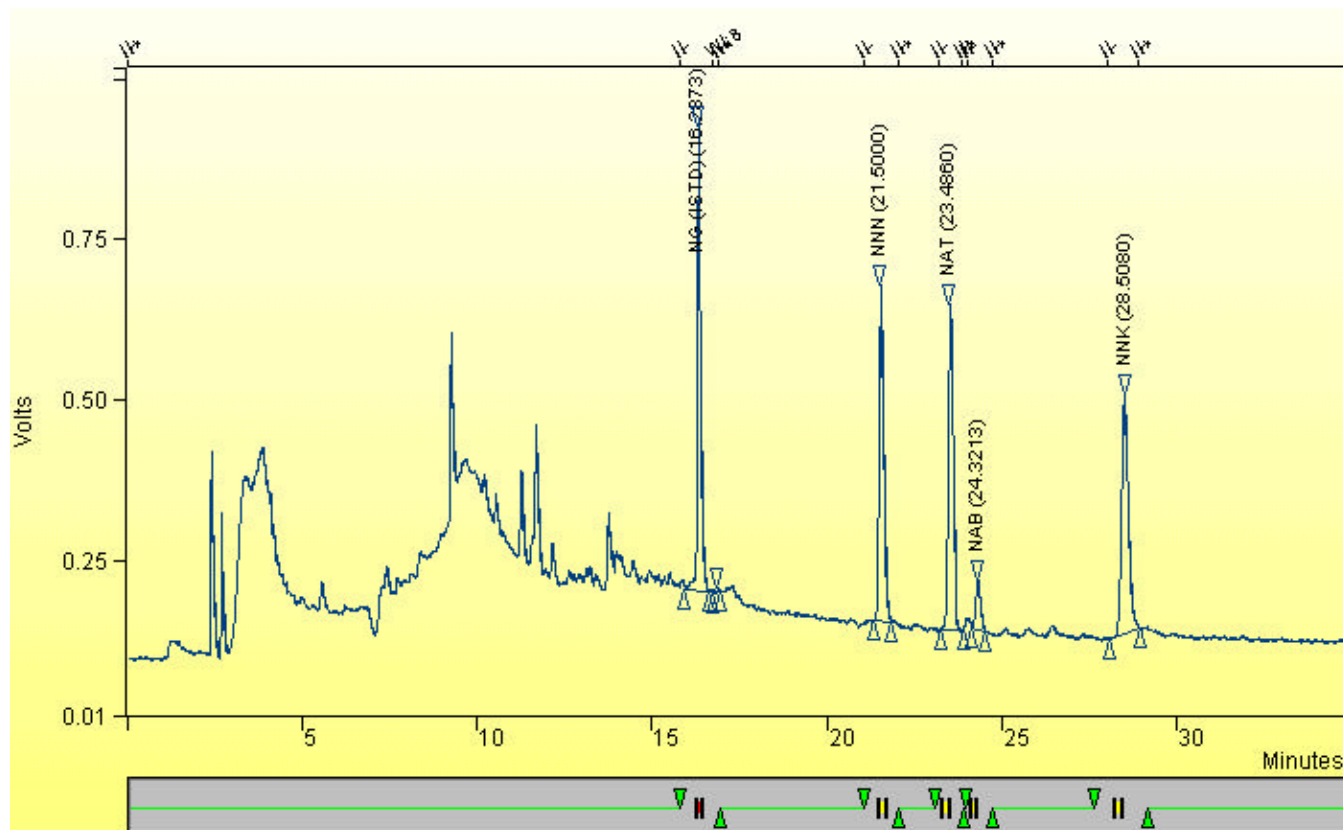
- 17.1 Fisher, S. et Spiegelhalder, B. Improved Method for the Determination of Tobacco Specific Nitrosamines (TSNA) in Tobacco Smoke, *Beitrag zur Tabakforschung International*, 14, 1989, p. 145-153.
- 17.2 Fisher, S., Castonguay, A., Kaiserman, M., Spiegelhaider, B. et Preussmann, R. Tobacco-specific nitrosamines in Canadian cigarettes, *J. Cancer Res. Clin Oncol.*, 116, 1990, p. 563-568.
- 17.3 Adams, J.D., Brunnemann, K.D. et Hoffmann, D. 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, 1983, p. 347-351.

ANNEXES

Annexe 1 : Chromatogramme typique



Chromatogramme représentatif de l'étalon 4.



Chromatogramme représentatif de la fumée principale de tabac d'une cigarette 1R4F.