

**N° :** T - 114  
**Date :** 31 décembre 1999  
**Page :** 1 de 12

## 1 PORTÉE

- 1.1 Cette méthode décrit l'extraction et le dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée des composés phénoliques contenus dans la matière particulaire totale (MPT) de la fumée principale de tabac.
- 1.2 La présente méthode s'applique au piégeage sur un disque filtrant en fibre de verre (tampon) et au dosage des composés phénoliques dans la fumée principale de tabac.

## 2 NORMES 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'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 Cinq cigarettes\* sont fumées sur chaque canal d'une machine à fumer linéaire à 20 canaux.

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

- 4.2 La matière particulaire totale (MPT) de la fumée principale de tabac est piégée sur des tampons, puis extraite avec 40 mL d'acide acétique à 1 %.
- 4.3 Une portion de l'extrait de MPT est ensuite filtrée avec une seringue-filtre, diluée, puis analysée par chromatographie liquide à gradient en phase inversée.
- 4.4 Les phénols sont détectés avec un détecteur de fluorescence et dosés par comparaison avec un étalonnage externe.

*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 Balance analytique donnant au moins quatre places décimales.
- 5.5 Agitateur oscillant.
- 5.6 Étuve pour le séchage de la verrerie.
- 5.7 Brucelles et gants pour le transfert des tampons.
- 5.8 Erlenmeyers de 150 mL avec bouchons en verre rodé.
- 5.9 Système de chromatographie liquide haute performance (CLHP) piloté par un ordinateur personnel, comprenant :
  - 5.9.1 Système d'alimentation en solvant – pompe à gradient ternaire.
  - 5.9.2 Échantillonneur automatique réfrigéré, muni d'une boucle d'échantillonnage de 20  $\mu$ L .
  - 5.9.3 Spectrofluorimètre.
  - 5.9.4 Modificateur de température de colonne.
  - 5.9.5 Bain de refroidissement.
  - 5.9.6 Poste de travail.
- 5.10 Colonne RP 18e pour CLHP, 5  $\mu$ m, 250 X 4 mm.
- 5.11 Colonne de garde jetable, 10 X 4 mm.
- 5.12 Fioles jaugées de 10, 25 et 50 mL, rouge actinique.
- 5.13 Micropipettes en verre, de divers volumes, 100, 150, 300, 400, 500, 800, 1000 et 2000  $\mu$ L.
- 5.14 Pipettes en verre, de 1, 2, 5, 6, 7, 8 et 20 mL.
- 5.15 Erlenmeyers en verre avec rodage conique, 50 mL, rouge actinique.
- 5.16 Éprouvettes graduées de 25 et 50 mL.

## 6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

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

- 6.1 Seringue-filtre de 0,45  $\mu$ m, en PVDF.
- 6.2 Seringues jetables.
- 6.3 Pipettes Pasteur jetables, en verre.
- 6.4 Gants jetables.
- 6.5 Poires en caoutchouc.
- 6.6 Flacons pour échantillonneur automatique, avec bouchons à vis et septums.
- 6.7 Ruban masque.
- 6.8 Méthanol, distillé dans du verre.
- 6.9 Acétonitrile, distillé dans du verre.
- 6.10 Isopropanol, distillé dans du verre.
- 6.11 Acide acétique, qualité CLHP.
- 6.12 Eau de type I, satisfaisant à la norme D 1193 de l'ASTM.
- 6.13 Hydroquinone, pureté > 99 %.
- 6.14 Résorcinol, pureté > 99 %.
- 6.15 Catéchol, pureté > 99 %.
- 6.16 Phénol, pureté > 99 %.
- 6.17 m-Crésol, pureté > 99 %.

**6.18** p-Crésol, pureté > 99 %.

**6.19** o-Crésol, pureté > 99 %.

## **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** Préparer 4 L de solution d'acide acétique à 1 % dans de l'eau de type I (40 mL d'HOAc dilué à 4 L) et vérifier l'absence de contamination par CLHP.

## **9 PRÉPARATION DES ÉTALONS**

### **9.1 Étalons primaires de phénols (voir annexe 1)**

**9.1.1** Peser environ 25 mg de chacun des phénols suivants (Hydroquinone, résorcinol, catéchol, phénol, m-crésol, p-crésol et o-crésol) dans des fioles jaugées de 25 mL et compléter avec la solution à 1 % d'acide acétique.

**9.1.2** Les concentrations seront d'environ 1,0 mg/mL. Préparer de nouveaux étalons primaires de phénols tous les 10 jours.

### **9.2 Étalons secondaires de phénols (voir annexe 1)**

**9.2.1** Prélever des volumes appropriés des étalons primaires de phénols et diluer jusqu'à 10 mL avec de l'acide acétique à 1 %.

**9.2.2** Préparer de nouveaux étalons secondaires de phénols chaque fois que de nouveaux étalons primaires sont préparés.

### **9.3 Solution tertiaire de phénols (voir annexe 1)**

**9.3.1** Prélever des volumes correspondants de chacune des solutions de phénols et les mettre dans une seule fiole jaugée de 50 mL. Compléter avec de l'acide acétique à 1 %.

**9.3.2** Préparer une nouvelle solution tertiaire de phénols tous les cinq jours.

### **9.4 Étalons de travail**

**9.4.1** Prélever des volumes appropriés (de 0,100 à 7,5 mL) de solution tertiaire de phénols et diluer jusqu'à 10 mL avec de l'acide acétique à 1 % (voir l'annexe 1).

**9.4.2** Transférer dans des flacons pour échantillonneur automatique.

**9.4.3** Préparer de nouveaux étalons de travail tous les cinq jours.

### **9.5 Solution de dopage**

**9.5.1** Ajouter des volumes appropriés de solutions étalons de phénol (voir **annexe 1**) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter avec de l'acide acétique à 1 %.

**9.5.2** Préparer une nouvelle solution de dopage tous les cinq jours ouvrables.

## **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 DES ÉCHANTILLONS**

**13.1** La MPT de la fumée principale de tabac provenant de cinq cigarettes est piégée sur un tampon, dans les conditions définies dans la méthode T-115.

**13.2** Après avoir fumé cinq cigarettes sur chaque canal :

**13.2.1** Tirer trois bouffées de garde supplémentaires.

**13.2.2** Consiogner le poids du porte-filtre et du tampon après le fumage afin de déterminer la MPT.

## **14 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS**

### **14.1 Extraction des tampons**

**14.1.1** Une série d'analyses comprend 20 échantillons (tampons). Traiter 20 échantillons à la fois. Ne pas traiter plus d'échantillons que le nombre pouvant être analysé en 24 heures. La température et le délai d'analyse sont particulièrement importants dans le cas de l'hydroquinone.

- 14.1.2** Retirer le tampon du porte-filtre, le plier en quatre et essuyer l'intérieur du porte-filtre avec le côté propre du tampon. En utilisant des brucelles propres, insérer le tampon dans un erlenmeyer rouge actinique de 50 mL, convenablement étiqueté.
- 14.1.3** Ajouter 40 mL d'acide acétique à 1 % dans l'erlenmeyer contenant le tampon, boucher le flacon, puis mettre un morceau de ruban masque de 1 po sur le bouchon en verre rodé pour le maintenir en place.
- 14.1.4** Pour s'assurer que le système d'analyse, la verrerie et les réactifs ne causent pas de perturbations, analyser un blanc de réactifs (BR) et un blanc fortifié (BF) avec chaque série d'analyses.
- BR : Mettre un tampon conditionné et non utilisé dans un erlenmeyer, ajouter 40 mL d'acide acétique à 1 % et boucher.
- BF : Mettre un tampon conditionné et non utilisé dans un erlenmeyer, ajouter 39 mL d'acide acétique à 1 % et 1 mL de solution de dopage, puis boucher.
- 14.1.5** Mettre ensuite les erlenmeyers sur un agitateur oscillant et agiter pendant 30 minutes (le tampon se désintègrera).
- 14.1.6** Après agitation, diluer les extraits de MPT à l'acide acétique dans des fioles jaugées de 10 mL avec de l'acide acétique à 1 %, selon le tableau suivant :

Type de cigarette	MPT par tampon (mg)	Volume de l'extrait (mL)	Volume final (mL)
Légère	5 - 15	0	Pas de dilution
Régulière	15 - 60	4	10
Fort	60 - 100	2	10

\*Marques de cigarettes « Ultra légères » - Fixer un filtre de 0,45 µm à une seringue jetable de 5 cm<sup>3</sup> et filtrer l'extrait directement dans deux flacons de pour échantillonneur automatique. Jeter les 10 premières gouttes, mettre quelques gouttes dans les flacons pour les rincer, puis jeter le liquide de rinçage. Remplir ensuite les flacons en réduisant au minimum l'espace de tête.

\*Marques de cigarettes « Ordinaires » et « Pleine saveur » - Fixer un filtre de 0,45 µm à une seringue jetable de 5 cm<sup>3</sup> et filtrer l'extrait directement dans une fiole jaugée de 10 mL contenant 7 mL d'acide acétique à 1 % ou assez de solution pour diluer l'extrait à 10 mL. Bien mélanger le contenu de la fiole jaugée et, avec une pipette Pasteur, remplir deux flacons pour échantillonneur automatique. Rincer d'abord les flacons, puis les remplir en réduisant au minimum l'espace de tête.

- 14.1.7** À l'aide d'une seringue, filtrer directement les BR et les BF dans des flacons pour échantillonneur automatique.
- 14.1.7.1** Fixer un filtre de 0,45 µm à une seringue jetable de 5 cm<sup>3</sup> et filtrer l'extrait du tampon du blanc directement dans deux flacons pour échantillonneur automatique. Jeter les 10

premières gouttes, mettre quelques gouttes dans les flacons pour rincer, jeter le liquide de rinçage, puis remplir en réduisant au minimum l'espace de tête.

- 14.1.8** Avec chaque série d'analyses, préparer une matrice fortifiée (MF) en utilisant une marque de cigarette témoin.

Réactif	Échantillon	MF
Solution de dopage au phénol	0	1
Extrait	3	3
Acide acétique à 1 % (mL)	7	6
Volume total (mL)	10	10

Échantillons de MF – Fixer un filtre de 0,45 µm à une seringue jetable de 5 cm<sup>3</sup> et filtrer l'extrait directement dans une fiole jaugée de 10 mL contenant 5 mL d'acide acétique à 1 % et 1 mL de solution de dopage au phénol.

- 14.1.9** Bien mélanger le contenu de la fiole jaugée et, à l'aide d'une pipette Pasteur, remplir deux flacons pour échantillonneur automatique. Rincer d'abord les flacons, puis les remplir en réduisant au minimum l'espace de tête.
- 14.1.10** Placer les flacons dans un porte-flacons et les entreposer au réfrigérateur à 4 °C, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment de leur analyse.
- 14.1.11** Un registre est alors créé afin de noter le temps total pendant lequel les échantillons restent à la température ambiante, depuis le fumage jusqu'à leur analyse.

*Nota* : Il est très important de traiter les échantillons le plus rapidement possible, sans interruption, car ils se décomposent s'ils restent exposés longtemps à la température ambiante.

## 14.2 Analyse : Équipement de CLHP

- 14.2.1** Système de chromatographie liquide à haute pression comprenant :

Système d'alimentation en solvant – pompe ternaire à gradient  
 Échantillonneur automatique réfrigéré, muni d'une boucle d'échantillonnage de 20 µL  
 Spectrofluorimètre à longueur d'onde programmable, réglé à un gain de 100 et à une atténuation de 8  
 Largeur de fente : Excitation, 18 nm; émission, 18 nm

- 14.2.2** Programmation des longueurs d'onde :

Temps	Excitation (nm)	Émission (nm)
0,0	304	338
5,5	274	298
32,0	274	298
33,0	304	338

**14.2.3** Bain de refroidissement avec système de thermorégulation de la colonne.

**14.2.4** Poste de travail.

### **14.3 Conditions chromatographiques (analyse en phase inversée)**

**14.3.1** Température de la colonne : 20 °C.

**14.3.2** Phase mobile : réactifs.

Solvant A : Préparer 2 litres d'une solution contenant 1 % d'acétonitrile, 1 % d'acide acétique et 1 % d'isopropanol, filtrer et dégazer (par barbotage d'hélium ultra-pur).

Solvant B : Préparer 2 litres d'une solution contenant 28 % d'acétonitrile, 1 % d'acide acétique et 1 % d'isopropanol, filtrer et dégazer (par barbotage d'hélium ultra-pur).

Solvant C : Acétonitrile (dégazé par barbotage d'hélium ultra-pur).

**14.3.3** Lavage de l'échantillon : Solvant A

**14.3.4** Phase mobile : Gradient

Débit Temps (min)	1,5 mL/min Composition		
0,0	100 % A	0 % B	0 % C
5,0	100 % A	0 % B	0 % C
15,0	75 % A	25 % B	0 % C
20,0	25 % A	75 % B	0 % C
28,0	0 % A	100 % B	0 % C
30,0	0 % A	0 % B	100 % C
32,0	0 % A	0 % B	100 % C
34,0	95 % A	0 % B	5 % C
Fin de l'analyse (équilibrer pendant 10 min)	100 % A	0 % B	0 % C

**14.3.5** Charger dans l'échantillonneur automatique les flacons contenant les échantillons, de manière à ce qu'il y ait un étalon à tous les 10 échantillons; de plus, la somme des temps de préparation des échantillons et des temps en file d'attente à la température ambiante ne doit pas dépasser 24 heures.

**14.3.6** Injecter 20 µL de chaque échantillon sur la colonne pour CLHP. Les chromatogrammes d'élution devraient ressembler à celui de la **figure 2**.

### **14.4 Calculs**

#### **14.4.1 Préparation d'une courbe d'étalonnage**

**14.4.1.1** Injecter 20 µL de chaque solution d'étalonnage sur la colonne de CLHP et les analyser. Effectuer l'analyse en double. Les chromatogrammes d'élution devraient ressembler à celui de la **figure 1**.

**14.4.1.2** Préparer une courbe d'étalonnage pour les différents hydroxybenzènes en traçant la surface des pics en fonction de la concentration.

**14.4.1.3** Calculer le facteur de réponse.

#### **14.4.2 Dosage des échantillons**

**14.4.2.1** Doser les différents composés phénoliques présents dans les échantillons par la méthode de l'étalon externe.

**14.4.2.2** Identifier les pics par comparaison des temps de rétention obtenus avec les étalons et par dopage des échantillons de fumée.

#### **14.4.3 Détermination des teneurs en phénol [ $\mu\text{g}/\text{cigarette}$ ]**

Hydroxybenzène [ $\mu\text{g}/\text{cigarette}$ ] =  $\frac{\text{Surface du pic}}{\text{Facteur de réponse}} \times \frac{\text{FD}}{\text{Nbre de cigarettes}}$

dans laquelle, FD est le facteur de dilution.

### **15 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ**

#### **15.1 Chromatogramme typique**

**15.1.1** Voir **figure 1** et **figure 2**.

#### **15.2 Taux de récupération et niveaux de contamination**

**15.2.1** Chaque série d'analyses doit aussi comprendre :

**15.2.1.1** Un blanc de réactif (BR) pour évaluer l'importance des perturbations dues à la verrerie, aux réactifs de piégeage, aux tampons et aux effets du système d'analyse.

**15.2.1.2** Un blanc fortifié (BF) pour évaluer l'importance des pertes possibles d'analytes.

**15.2.1.3** Une matrice fortifiée (MF) pour évaluer les perturbations dues à la matrice. Pour ce faire, on dope un échantillon véritable avec une quantité connue, puis on détermine le taux de récupération.

#### **15.3 Limite de détection de la méthode (LDM) et limite de dosage (LDD)**

##### **15.3.1 Limite de détection de la méthode (LDM)**

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 résultats.

---

### 15.3.2 Limite de dosage (LDD)

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 résultats.

### 15.4 Stabilité des réactifs et des solutions

15.4.1 Préparer de nouveaux étalons primaires de phénols chaque semaine.

15.4.2 Préparer de nouveaux étalons de travail et de nouveaux réactifs chaque semaine.

15.4.3 Analyser tous les échantillons dès que possible après le fumage et dans les 24 heures.

## 16 MODIFICATIONS POUR DES CONDITIONS INTENSES DE FUMAGE

16.1 Dans des conditions intenses de fumage, fumer deux cigarettes.

## 17 RÉFÉRENCES

17.1 Risner, C.H. et Cash, S.L. A High Performance Liquid Chromatographic Determination of Major Phenolic Compounds in Tobacco Smoke, *Journal of Chromatographic Science*, 28, 1990.

**ANNEXES**

**Annexe 1 : Étalons de phénol**

**a) : Étalons**

Phénol	Étalon primaire *				Étalon secondaire *			Solution tertiaire **		
	Poids (g)	Pureté (%)	Vol. (mL)	Conc. [mg/mL]	Vol. (mL) Étal. m.	Diluer à (mL)	Conc. [mg/mL]	Vol. (L) Étal. m.	Diluer à (mL)	Conc. [µg/mL]
Hydroquinone	0,023	99,0	25,0	0,9108				0,50	50,0	9,10800
Résorcinol	0,0232	99,0	25,0	0,91872	2,0	10,0	0,18374	0,20	50,0	0,73498
Catéchol	0,0227	99,0	25,0	0,89892				0,25	50,0	4,49460
Phénol	0,0235	99,0	25,0	0,9306				0,50	50,0	9,30600
m-Crésol	0,0315	99,0	25,0	1,2474	1,0	10,0	0,12474	1,00	50,0	2,49480
p-Crésol	0,0225	99,0	25,0	0,891	0,5	10,0	0,04455	1,00	50,0	0,89100
o-Crésol	0,0307	99,0	25,0	1,21572	0,4	10,0	0,04863	2,00	50,0	1,94515
m+p-Crésol		99,0	25,0							3,38580

\* dans de l'acide acétique à 1 % (v/v)

\*\* dans de l'acide acétique à 1 % (v/v), dans une seule fiole jaugée de 50 mL

**b) : Étalons de travail +**

Étiquette	5	10	100	200	350	500	750	1000
Vol. de sol. tert. (mL)	0,050	0,100	1,000	2,000	3,500	5,000	7,500	10,000
Phénol [µg/mL]								
Hydroquinone	0,04554	0,09108	0,91080	1,82160	3,18780	4,55400	6,83100	9,10800
Résorcinol	0,00367	0,00735	0,07350	0,14700	0,25724	0,36749	0,55123	0,73498
Catéchol	0,02247	0,04495	0,44946	0,89892	1,57311	2,24730	3,37095	4,49460
Phénol	0,04653	0,09306	0,93060	1,86120	3,25710	4,65300	6,97950	9,30600
m-Crésol	0,01247	0,02495	0,24948	0,49896	0,87318	1,24740	1,87110	2,49480
p-Crésol	0,00446	0,00891	0,08910	0,17820	0,31185	0,44550	0,66825	0,89100
o-Crésol	0,00973	0,01945	0,19452	0,38903	0,68080	0,97258	1,45886	1,94515
m+p-Crésol	0,01693	0,03386	0,33858	0,67716	1,18503	1,69290	2,53935	3,38580

+ dans de l'acide acétique à 1 % (v/v), dans des fioles jaugées individuelles de 10 mL

**c) : Solution de dopage**

Phénol	Solution de dopage pour BF ***						Solution de dopage pour MF++			
	Solution étalon	Conc. [mg/mL]	Volume (mL)	Diluer à (mL)	Dopant [µg/mL]	Analysé [ug/mL]	Dopant (mL)	Diluer à (mL)	Dopant [µg/mL]	Analysé [ug/mL]
Hydroquinone	Primaire	0,9108	1,0		36,432	1,82160			36,432	3,64320
Phénol	Primaire	0,9306	0,6	25,0	22,3344	1,11672			22,3344	2,23344
o-Crésol	Second.	0,04863	1,4		2,72321	0,13616			2,72321	0,27232

\*\*\* dans de l'acide acétique à 1 % (v/v), dans une seule fiole jaugée de 25 mL

++ dans de l'acide acétique à 1 % (v/v), dans une seule fiole jaugée de 10 mL

Figure 1 : Chromatogramme d'un étalon typique de phénols

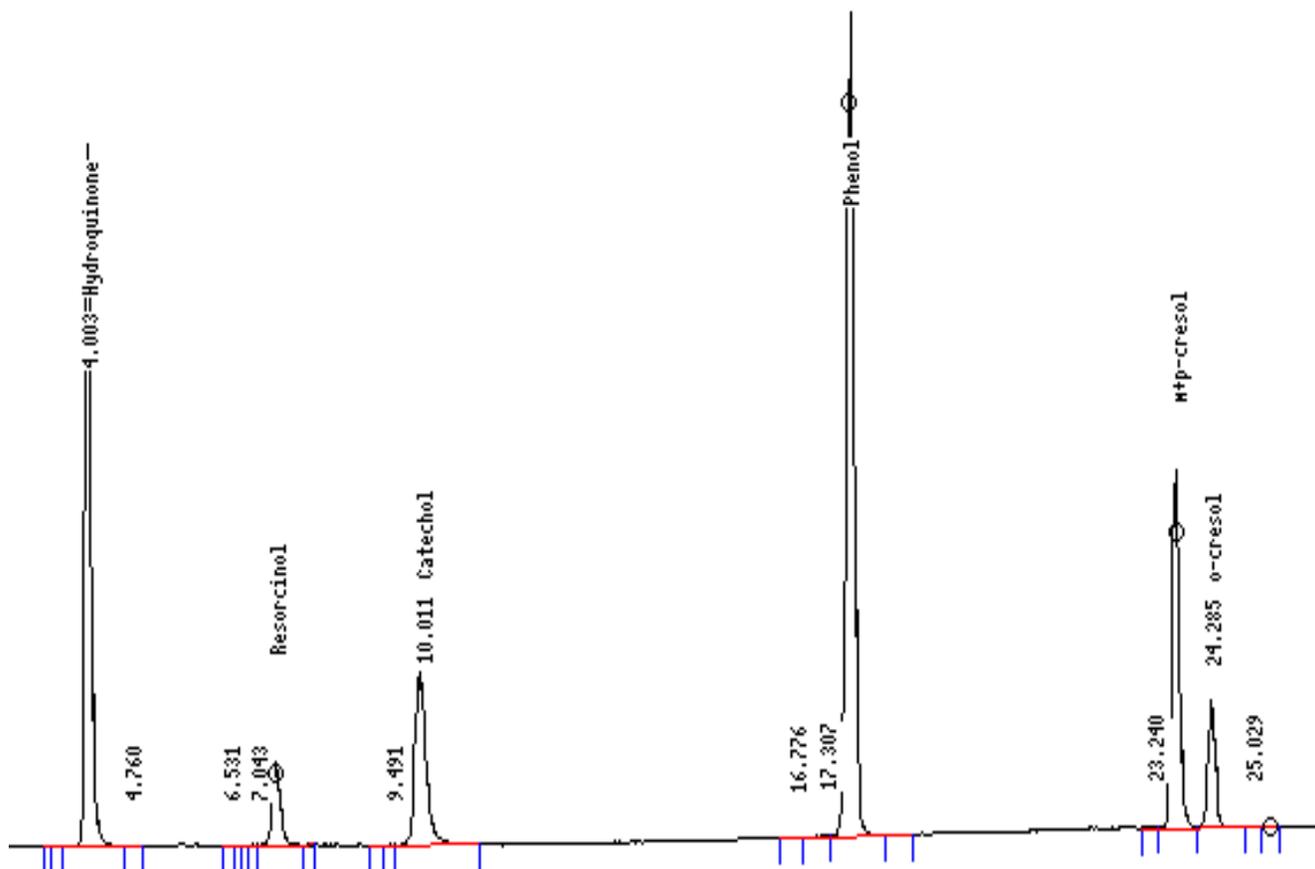


Figure 2 : Analyse chromatographique des phénols présents dans la MPT de la fumée principale de tabac

