

N° : T - 203
Date : 31 décembre 1999
Page : 1 de 13

1 PORTÉE

La présente méthode s'applique au dosage du B[a]P dans la matière particulaire totale (MPT) du condensat de fumée latérale par chromatographie liquide à haute performance à phase inversé (CLHP) utilisant un détecteur à fluorescence.

2 NORMES 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 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.
- 2.3 Méthodes d'échantillonnage et d'essai du tabac – Détermination du benzo[a]pyrène dans la matière particulaire totale de la fumée de tabac. Norme nationale du Canada. Conseil canadien des normes CAN/CGSB-176.2 N° 1-96, mars 1996.

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 cigarettes sont fumées dans une chambre en Y de la British American Tobacco (BAT), dans laquelle on a réglé le débit à 3 L/minute, pour capter la fumée latérale.
- 4.2 La matière particulaire totale (MPT) de la fumée latérale, recueillie sur un disque filtrant en fibre de verre (tampon), est extraite avec suffisamment d'acétone pour obtenir une solution homogène de goudron dans l'acétone. Une portion de cette solution est filtrée avec une seringue-filtre de 0,45 µm, et le filtrat est récupéré dans un flacon en verre de 7 mL pour le conserver.
- 4.3 Une portion de 2 mL de cet extrait est évaporée jusqu'à siccité sous un courant constant d'azote, puis redissoute dans 2 mL de cyclohexane. Cette solution de cyclohexane est passée dans une cartouche de 1 g (6 mL) de silice, puis dans une cartouche NH₂ plus de 360 mg montée en série. Le B[a]P est élué avec de l'hexane, l'éluat est évaporé jusqu'à siccité, puis le résidu est redissous dans 1 mL d'acétonitrile.
- 4.4 L'échantillon est dosé par chromatographie en phase liquide en phase inversée avec détection par fluorescence.

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 Dispositif d'extraction en phase solide Visi-Prep de Supelco (à 24 cartouches) ou l'équivalent.
- 5.5 Pipettes en verre de 2 mL.
- 5.6 Distributeur Brinkman (10-50 mL) ou l'équivalent.
- 5.7 Micropipettes (5 et 1000 μ L).
- 5.8 Tubes à culture de 16 X 125 mm (20 mL).
- 5.9 Erlenmeyers en verre de 125 mL, à rodage conique, ou erlenmeyers en PMP avec bouchons à vis.
- 5.10 Turbo-évaporateur ou l'équivalent.
- 5.11 Pompes GAST ou l'équivalent.
- 5.12 Débitmètres.
- 5.13 Chambres en Y BAT.
- 5.14 Disques filtrants en fibre de verre (tampons) et porte-disques (45 mm).
- 5.15 Seringue jetable de 5 cm³.
- 5.16 Flacons pour échantillonneur automatique, avec bouchons et septums.
- 5.17 Pipettes Pasteur.
- 5.18 Cartouches Sep-Pak, 1 g de silice (capacité de 6 mL) .
- 5.19 Cartouches Sep-Pak NH₂ Plus, 360 mg.
- 5.20 Flacons à vis de 7 mL avec bouchon à vis recouvert d'une feuille d'aluminium.
- 5.21 Filtres de 0,45 μ m en fibre de verre pour seringue-filtre.
- 5.22 Colonne pour CLHP Merck RP-18^e, de 250 x 4 mm, remplissage de 5 μ m, avec colonne de garde de 5 μ m Lichrocart 4-4 Lichrosphere 100 RP-18, ou l'équivalent.
- 5.23 Appareil de chromatographie liquide haute performance muni de :
 - 5.23.1 Détecteur par fluorescence.
 - 5.23.2 Échantillonneur automatique.
 - 5.23.3 Pompe ternaire.
 - 5.23.4 Système de collecte des données.

6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL

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

- 6.1 Benzo[a]pyrène (B[a]P).
- 6.2 Cyclohexane.
- 6.3 Hexane.
- 6.4 Acétonitrile.
- 6.5 Méthanol.
- 6.6 Isopropanol.
- 6.7 Sulfate de sodium anhydre.
- 6.8 Acétone.
- 6.9 Tétrahydrofurane (THF) .
- 6.10 Eau de type I (satisfaisant à la norme D 1193 de l'ASTM).

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 les solutions nécessaires à l'analyse, de la manière définie dans la méthode T-115, selon des techniques de laboratoire appropriées.

9 PRÉPARATION DES ÉTALONS

9.1 Préparation d'une solution de dopage pour les échantillons fortifiés

- 9.1.1 Solution mère primaire de B[a]P : dissoudre 10 mg de B[a]P solide dans 50 mL de cyclohexane.
- 9.1.2 Solution mère secondaire : À l'aide d'une pipette, ajouter 50 µl de solution mère primaire dans 50 mL de cyclohexane.
- 9.1.3 Ajouter 10 µL de solution de dopage à une deuxième portion de 2 mL de la solution d'extraction d'une cigarette témoin, avant la substitution de solvant et le nettoyage sur une cartouche d'extraction en phase solide (**MF***). Ajouter 10 µL de solution de dopage à une deuxième portion de 2 mL de **BR***, avant la substitution de solvant et le nettoyage sur une cartouche d'extraction en phase solide (**BF***). La concentration de dopage lors de l'analyse est d'environ 2 ng/mL (selon la concentration de la solution mère).

*Voir la partie sur le contrôle de la qualité où sont expliqués le sens de ces initiales.

9.2 Préparation des étalons de travail

- 9.2.1 Étalon primaire de B[a]P : Dissoudre 10 mg de B[a]P dans 50 mL d'acétonitrile.
- 9.2.2 Étalon secondaire : À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl d'étalon primaire dans 50 mL d'acétonitrile.

9.3 Étalons utilisés pour l'étalonnage :

Étalon n°	Volume d'étalon secondaire (µL)	Volume final (mL)	Concentration [ng/mL]
1	40	25	0,6400
2	175	25	2,800
3	350	25	5,600
4	600	25	9,600
5	900	25	14,40
6	2 mL d'étalon prim.	10	0,1280
7	4 mL d'étalon prim.	10	0,2560

- 9.3.1 Dans tous les cas il faut noter le poids, le volume et la pureté et utiliser ces données pour calculer avec précision les concentrations des étalons. Celles-ci servent à établir la courbe d'étalonnage.

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, avec les modifications suivantes :

12.2.1.1 Monter le dispositif pour l'analyse du B[a]P dans la fumée latérale (circuit de fumage) conformément à la figure suivante.

12.2.1.2 Régler les débitmètres de manière à obtenir un débit de 3 L/minute en présence du tampon-filtre pour fumée latérale. Régler tous les canaux en notant le débit.

12.2.1.3 Peser les cigarettes* conditionnées (trois cigarettes / observation) et le porte-filtre pour fumée latérale avant de procéder au fumage.

*Dans le cas d'autres produits du tabac, choisir un nombre de cigarettes tel que le filtre ne soit pas saturé.

12.2.1.4 Mettre les cigarettes conditionnées en place dans les canaux réglés.

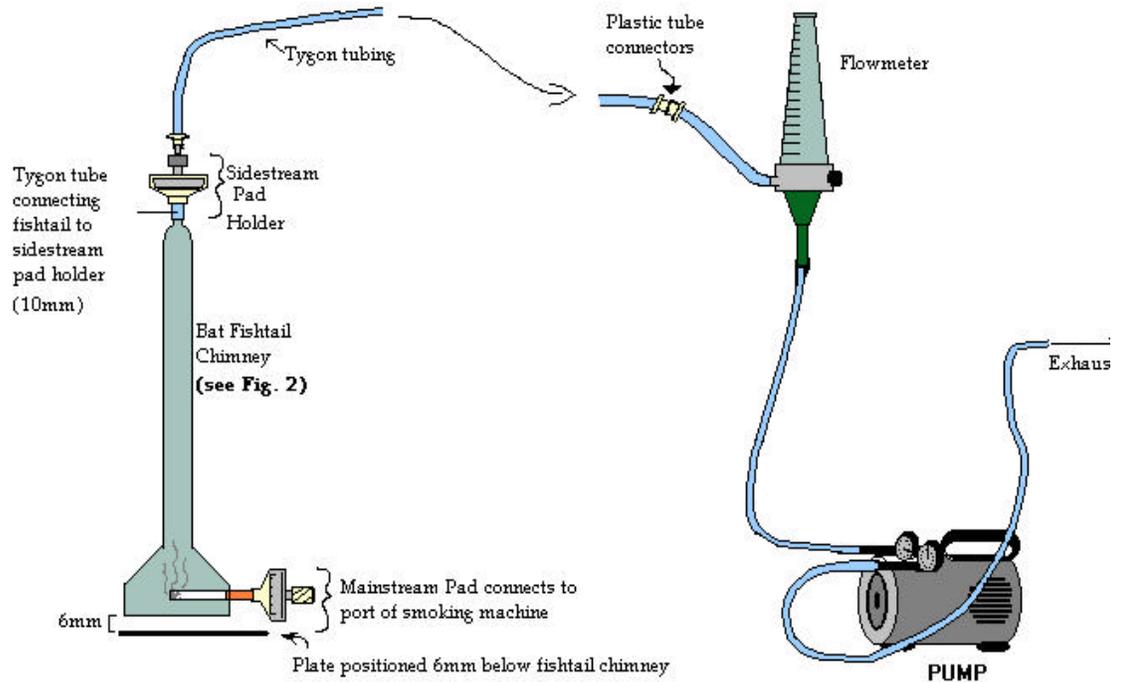


FIGURE 1a : SIDESTREAM APPARATUS

FIGURE 1a: SIDESTREAM APPARATUS = FIGURE 1a : DISPOSITIF POUR FUMÉE

Tygon tubing = Tube en tygon

Sidestream pad holder = Porte-filtre à fumée latérale

Tygon tube connecting fishtail to sidestream pad holder (10 mm) = Tube en tygon reliant la chambre en Y au porte-filtre à fumée secondaire (10 mm)

Bat Fishtail Chimney (see Figure 2) = Chambre en Y BAT (voir la figure 2)

6 mm = 6 mm

Mainstream Pad connects to port of smoking machine = Porte-filtre à fumée principale de tabac relié au canal de la machine à fumer

Plate positionned 6 mm below fishtail chimney = Plaque située à 6 mm sous la chambre en Y

Plastic tube connectors = Raccords pour tube en plastique

Flowmeter = Débitmètre

Exhaust = Évacuation

PUMP = POMPE.

13 PRODUCTION DES ÉCHANTILLONS

13.1 Mettre en marche les pompes d'aspiration de la fumée latérale 30 secondes avant que la machine à fumer n'aspire la première bouffée.

Nota : Dans le cas de types spécifiques de cigarettes, il faut suivre des méthodes spéciales d'allumage.

- 13.2 Placer la cigarette sous la chambre en Y et l'allumer dès la première bouffée.
- 13.3 Abaisser la chambre en Y directement au-dessus de la cigarette, en plaçant une plaque à 6 mm de la chambre de manière à créer un flus d'air uniforme dans la chambre.
- 13.4 Lorsque le mégot a atteint la longueur prédéterminée, le retirer de la chambre pour qu'il ne produise plus de fumée latérale. Arrêter la pompe 30 secondes après l'extinction de la cigarette, de manière à faire passer toute la fumée présente dans la chambre au travers du filtre à fumée latérale.
- 13.5 Répéter les étapes 13.1 à 13.4 avec une deuxième, puis une troisième cigarette.
- 13.6 À la fin de la séquence de fumage, démonter le circuit de fumée latérale et peser le porte-filtre à fumée latérale pour déterminer la MPT.
- 13.7 Consigner le poids de MPT piégée sur le filtre à fumée latérale.

14 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

14.1 Extraction des tampons à fumée latérale

- 14.1.1 Retirer le filtre à fumée latérale de son porte-filtre, le plier en quatre et nettoyer l'intérieur du porte-filtre avec le côté propre du filtre.
- 14.1.2 Mettre ce filtre à fumée latérale dans un erlenmeyer de 125 mL et boucher le flacon.
- 14.1.3 Rincer la chambre en Y avec de l'acétone et verser les liquides de rinçage dans l'erlenmeyer. Utiliser un volume d'acétone tel que la concentration finale de MPT dans l'erlenmeyer soit d'environ 1 mg/mL.

Par exemple : Le volume d'acétone utilisé pour rincer la chambre en Y est numériquement équivalent au poids moyen de MPT exprimée en mg (arrondi à 10 mL près), permettant d'obtenir une concentration moyenne d'environ 1 mg de MPT/mL d'acétone.

Exemple 1 : Si la MPT dans la FL est de 70 mg (total), le volume d'acétone sera de 70 mL.

Exemple 2 : Si la MPT dans la FL est de 83 mg (total), le volume d'acétone sera de 80 mL.

Exemple 3 : Si la MPT dans la FL est de 57 mg (total), le volume d'acétone sera de 60 mL.

Nota : Utiliser au plus **100 mL** d'acétone.

- 14.1.4 Consigner le volume d'acétone utilisé pour le rinçage de la chambre en Y et l'extraction du filtre.
 - 14.1.4.1 Agiter vigoureusement pendant 30 minutes sur un agitateur oscillant, l'erlenmeyer contenant le filtre à fumée latérale et l'acétone, jusqu'à ce que la solution paraisse homogène et

qu'il n'y ait plus sur ce filtre aucune tache localisée de couleur due au goudron de la fumée latérale.

14.1.4.2 Placer les flacons dans le noir afin de laisser le liquide décanter.

14.2 Purification des échantillons

14.2.1 Filtrer environ 8 mL de l'extrait acétonique sur un filtre jetable de 0,45 µm, dans un flacon de 7 mL à bouchon recouvert d'une feuille d'aluminium (les échantillons peuvent alors être conservés à 4 °C).

14.2.2 À l'aide d'une pipette, ajouter 2 mL de l'extrait acétonique dans un tube à culture de 16 X 125 mm.

14.2.3 Placer ces tubes sur le turbo-évaporateur.

Nota : Régler le turbo-évaporateur à une température de 40 °C et à une pression d'azote de 7,5 lb/po².

14.2.4 Évaporer les échantillons jusqu'à siccité.

14.2.5 Redissoudre les échantillons en ajoutant 2 mL de cyclohexane à l'aide d'une pipette, puis agiter en créant un tourbillon pendant 15 secondes (agiter chaque échantillon deux fois).

14.2.6 Préconditionner les cartouches de silice et de NH₂ plus avec de l'hexane, en suivant les recommandations du fabricant.

Nota : Tout l'air doit être éliminé, exposant ainsi toute la matière adsorbante à la solution.

14.2.7 Placer les cartouches preconditionnées sur le Visi-prep, ajouter environ 1 g de sulfate de sodium anhydre sur la cartouche de silice et laver les cartouches avec 10 mL d'hexane, en laissant l'hexane s'écouler par gravité.

14.2.8 Verser la solution de cyclohexane de 2 mL sur la cartouche de silice.

Nota : Pour les échantillons à forte teneur en goudron, renfermant des quantités importantes de B[a]P, un volume de seulement 250 - 500 µL peut s'avérer suffisant, compte tenu de la plage d'étalonnage.

14.2.9 Laisser le cyclohexane passer par gravité dans les cartouches d'extraction en phase solide à une vitesse d'environ une goutte/seconde. Jeter l'éluat.

14.2.10 À l'aide d'une pipette, ajouter 4 mL d'hexane sur la cartouche et laisser l'hexane s'écouler par gravité. Jeter l'éluat.

Nota : Si tout l'échantillon a été transféré, utiliser ces volumes d'hexane pour rincer de nouveau le tube à culture et s'assurer que l'échantillon a été transféré quantitativement.

Nota : Il faut d'abord déterminer les volumes d'éluat d'une marque différente de cartouche et vérifier les volumes des différents lots.

14.2.11 Placer un tube à culture jetable de 20 mL sous chacune des cartouches.

14.2.12 Éluer le B[a]P par gravité en versant 4 portions de 4 mL d'hexane sur la cartouche.

14.2.13 Ajouter 1 mL de THF dans chaque tube.

14.2.14 Placer les tubes contenant les 17 mL d'éluat sur le turbo-évaporateur.

Nota : Régler le turbo-évaporateur à une température de 40 °C et une pression d'azote de 7,5 lb/po².

14.2.15 Évaporer les échantillons jusqu'à siccité.

Nota : Il faudra d'abord évaporer pendant 20 minutes en augmentant progressivement la pression d'azote jusqu'à un maximum de 10 lb/po², pour ne pas perdre d'échantillon par éclaboussement.

14.2.16 Retirer les échantillons complètement secs. Si certains échantillons ne sont pas complètement secs, poursuivre l'évaporation cinq minutes à la fois.

14.2.17 À l'aide d'une pipette, ajouter 1000 µL d'acétonitrile dans chaque tube pour dissoudre l'analyte et tout résidu présent.

14.2.18 Agiter l'échantillon en créant un tourbillon à grande vitesse pendant environ 15 secondes.

14.2.19 Au moyen d'une pipette en verre, rincer les parois du tube avec l'échantillon au moins cinq fois. Transférer l'échantillon dans un flacon de 2 mL pour échantillonneur automatique, muni d'un bouchon à vis et d'un septum recouvert de téflon.

14.2.20 Les échantillons sont prêts pour l'analyse par CLHP et peuvent être conservés à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

14.3 Appareil d'analyse : analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP)

14.3.1 Paramètres du détecteur de fluorescence Jasco

Longueur d'onde d'excitation :	365 nm
Longueur d'onde d'émission :	425 nm
Gain :	X 1000
Atténuation :	32.

Nota : Si on utilise un détecteur fluorimétrique d'une autre marque, il faudra peut-être le programmer différemment pour conserver la même plage d'étalonnage. Un léger réglage de la longueur d'onde d'excitation

ou d'émission pourrait aussi s'avérer nécessaire, selon la marque du détecteur (p. ex., des longueurs d'onde de 366 et 424 nm).

14.3.2 Échantillonneur automatique : volume injecté

14.3.2.1 Utiliser une boucle d'échantillonnage de 50 µL et un réglage de volume injecté de 75 µL, afin d'assurer la purge complète de la boucle d'échantillonnage par l'échantillon.

14.3.3 Phase mobile et gradient (système à gradient ternaire)

Solvant A : Acétonitrile/1 % d'isopropanol dans de l'eau de type I à 55/45 (dégazé et filtré sur un filtre en nylon de 0,45 µm).
 Solvant B : Méthanol.
 Solvant C : Acétonitrile.
 Débit : 1,5 mL/minute.
 Gradient : **Des ajustements peuvent être nécessaires selon la condition de la colonne et la résolution de l'analyte.**

Temps (minutes)	Composition		
	% A	% B	% C
0,00	55	0	45
20,00	75	0	25
25,00	100	0	0
28,00	100	0	0
30,00	0	100	0
32,00	0	100	0
34,00	100	0	0
35,00	100	0	0
35,00	Fin de l'analyse :		Équilibrer

Temps d'équilibrage : 8,00 minutes.

14.4 Calculs

14.4.1 Calcul du facteur de réponse (FR)

14.4.1.1 Procéder à un premier étalonnage en analysant les étalons préparés; commencer par les concentrations élevées et progresser vers les concentrations faibles (injecter le tout premier étalon au moins deux fois jusqu'à l'obtention d'une réponse et d'un temps de rétention constants).

14.4.1.2 Préparer une courbe d'étalonnage en traçant la concentration de B[a]P dans l'étalon en fonction de la hauteur du pic fourni par le détecteur de fluorescence.

14.4.1.3 Le facteur de réponse est égal à la pente de la droite calculée par régression linéaire (hauteur/concentration).

14.5 Détermination de la teneur en B[a]P, [ng/cig]

14.5.1 $B[a]P \text{ [ng/cig]} = \frac{\text{hauteur du pic} \times \text{volume liquide d'extraction (mL)} \times \text{volume final (mL)}}{\text{hauteur du pic de l'étalon} \times \text{volume liquide d'extraction (mL)} \times \text{volume final (mL)}}$

RF X nbre de cigarettes fumées X volume de la portion utilisée (mL)

dans laquelle le volume de la portion utilisée (mL) est le volume transféré dans la cartouche Sep-pak, corrigé pour tenir compte de toute dilution préalable lors de l'étape de substitution de solvant. Le facteur de réponse est calculé à partir de la courbe d'étalonnage.

15 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

15.1 Chromatogramme typique

15.1.1 Voir les **annexes 1a et 1b**.

15.2 Paramètres de contrôle typiques

15.2.1 Chaque série d'analyse doit comporter au moins un des éléments suivants par journée de fumage ou série d'au plus 16 échantillons (quatre séries de quatre échantillons).

15.2.1.1 Blanc de réactifs (**BR**) : pour déterminer la contamination de fond due aux solutions, à la verrerie ou aux matières utilisées lors de l'analyse.

15.2.1.2 Blanc fortifié (**BF**) : pour déterminer s'il y a perte d'analyte lors de l'analyse.

15.2.1.3 Matrice fortifiée (**MF**) : par dopage des cigarettes de marque témoin, pour déterminer s'il y a perte d'analyte lors de l'analyse et pour déceler tout effet potentiel de la matrice.

15.2.1.4 Échantillon de référence : pour déterminer la reproductibilité de la méthode complète d'analyse d'une série d'analyses à l'autre.

15.2.1.5 Échantillon en double : pour déterminer la reproductibilité de la méthode lors d'une même série d'analyse ou de l'analyse d'un même lot.

15.3 Taux de récupération et niveaux de contamination

15.3.1 Les taux de récupération typiques des blancs fortifiés (BF) et des matrices fortifiées (MF) se situent dans la gamme de 85 - 110 %, lorsqu'une solution dopée (ou un échantillon) est soumise au processus d'extraction complet.

15.3.2 Des taux de récupération inférieurs à 85 % indiquent que l'élution du B[a]P par les cartouches d'extraction en phase solide est insuffisante ou qu'il y a eu changement du facteur de réponse (FR) du détecteur de fluorescence. Tout changement du FR doit d'abord être examiné avant de retraiter les échantillons.

15.3.3 Les blancs de réactifs (BR) donnent typiquement des valeurs calculées allant de 0 à 0,3 ng/cigarette. Une contamination de cet ordre est en général associée à une contamination du filtre au cours du conditionnement ou à un nettoyage insuffisant de la verrerie.

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

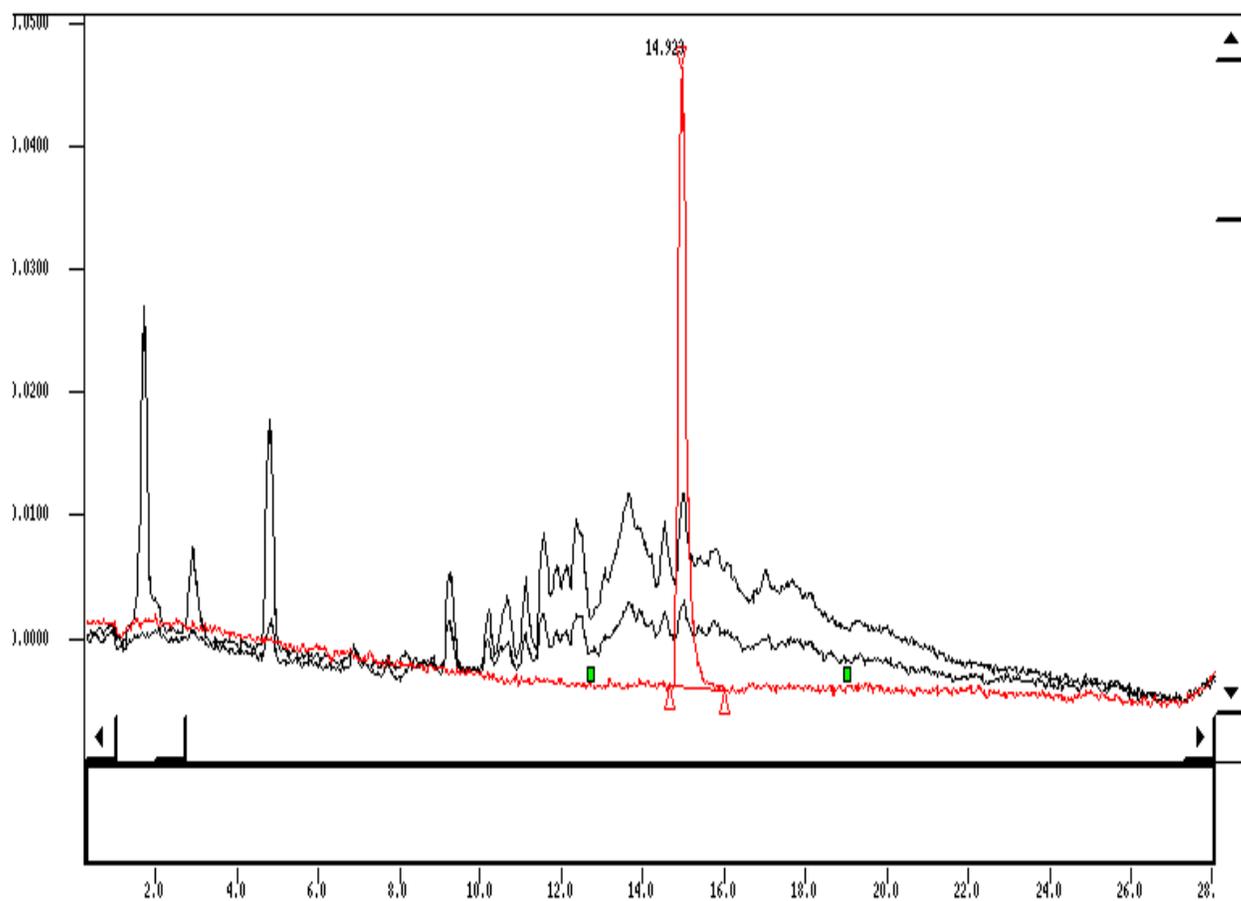
- 15.4.1** Déterminer la limite de détection de la méthode (LDM) en analysant l'étalon le moins concentré, comme s'il s'agissait d'un échantillon inconnu, au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LDM est égale à trois fois l'écart-type de ces résultats.
- 15.4.2** On peut modifier la LDM (en ng/cigarette) en changeant le nombre de cigarettes fumées et les volumes utilisés pour l'extraction et la purification.
- 15.4.3** Déterminer la limite de dosage (LDD) pratique en l'étalon le moins concentré, comme s'il s'agissait d'un échantillon inconnu, au moins 10 fois sur une période de plusieurs jours. La LDD est égale à 10 fois l'écart-type de ces résultats.

15.5 Stabilité des réactifs et des échantillons

- 15.5.1** Conserver les solutions mères et les étalons à -20°C .
- 15.5.2** Les solutions mères étalons et les solutions mères dopées sont stables pendant une période pouvant atteindre six mois. Il n'y a pas de perte d'analyte, mais la perte de solvant par évaporation peut poser un problème.
- 15.5.3** À tous les deux mois, préparer de nouvelles solutions d'étalonnage à partir de la solution mère.
- 15.5.4** Les échantillons sont stables à 4°C pendant trois semaines suivant l'extraction.

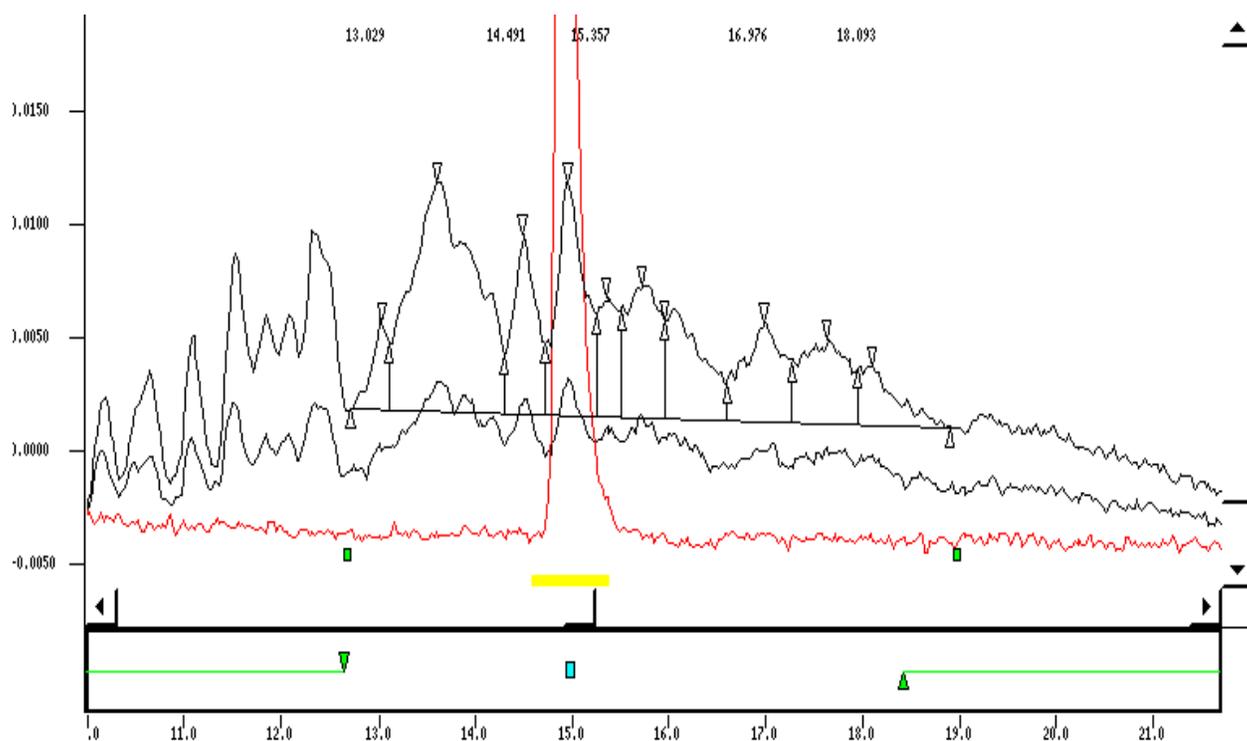
16 RÉFÉRENCES

- 16.1** Proctor, C.J., Martin, C., Beven, J.L. et Dymond H.F., 1988. Evaluation of an Apparatus Designed for the Collection of Sidestream Tobacco Smoke. *Analyst*, 113, p. 1509-1513.
- 16.2** Dumont, J., Larocque-Lazure, F. et Iorio C., 1993. An Alternative Isolation Procedure for the Subsequent Determination of Benzo[a]pyrene in Total Particulate Matter of Cigarette Smoke. *Journal of Chromatographic Science*, vol. 31, septembre 1993, p. 371-374.

ANNEXES**Annexe 1a : Chromatogramme typique**

Superposition des chromatogrammes obtenus avec un étalon, avec une cigarette témoin à forte teneur en goudron et avec une cigarette témoin à faible teneur en goudron.

Annexe 1b : Chromatogramme typique



Agrandissement de la figure de l'annexe 1a montrant la ligne de base obtenue avec un échantillon véritable.