
Norme internationale



4389

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Tabac et produits du tabac — Détermination des résidus de pesticides organochlorés (Méthode de référence)

Tobacco and tobacco products — Determination of organochlorine pesticide residues (Reference method)

Première édition — 1981-06-15

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 4389:1981](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/534bbf68-27fa-4009-8cee-6508cc1026e0/iso-4389-1981)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/534bbf68-27fa-4009-8cee-6508cc1026e0/iso-4389-1981>

CDU 663.97 : 543.8 : 632.95.028

Réf. n° : ISO 4389-1981 (F)

Descripteurs : tabac, essai, dosage, pesticide, résidu chimique, préparation de spécimen d'essai, étalonnage, chromatographie en phase gazeuse, évaporateur.

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 4389 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 126, *Tabac et produits du tabac*, et a été soumise aux comités membres en octobre 1979.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

<u>ISO 4389:1981</u>		
Afrique du Sud, Rép. d'	Espagne	Roumanie
Allemagne, R.F.	Éthiopie	Royaume-Uni
Australie	France	Sri Lanka
Autriche	Grèce	Suisse
Belgique	Inde	Tchécoslovaquie
Brésil	Italie	Thaïlande
Bulgarie	Pays-Bas	Yougoslavie
Égypte, Rép. arabe d'	Pologne	

Aucun comité membre ne l'a désapprouvée.

Tabac et produits du tabac — Détermination des résidus de pesticides organochlorés (Méthode de référence)

ATTENTION. L'acétonitrile et le benzène sont toxiques. Des précautions strictes doivent être prises pour la protection du personnel.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination des résidus de pesticides organochlorés dans le tabac et les produits du tabac.

La méthode est applicable à la détermination, dans le tabac et les produits du tabac, d'un grand nombre de pesticides organochlorés, de quelques-uns de leurs isomères et produits de dégradation.

La méthode est particulièrement recommandée pour la détermination des substances dont les limites de détection sont données dans le tableau ci-contre.

NOTE — L'ISO 1750 donne les noms systématiques et la structure correspondant aux noms communs ISO du tableau.

L'application de cette méthode est limitée en présence de polychlorobiphényle ou de camphéchloré.

2 Références

ISO 1750, *Produits phytosanitaires et assimilés — Noms communs.*

ISO 4874, *Tabac et produits du tabac — Conditions générales d'échantillonnage.*

3 Principe

Extraction des résidus de pesticides de l'échantillon à l'aide d'un mélange d'acétonitrile et d'eau, suivie d'une nouvelle extraction de la solution résultante à l'aide d'hexane. Purification de l'extrait concentré d'hexane par absorption et élution sur une colonne de Florisil en utilisant dans un premier temps l'hexane, puis dans un second temps le benzène. Détermination des résidus de pesticides dans les fractions d'hexane et de benzène par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau — Liste des substances avec limites de détection

Substance	ISO 1750 Nom commun	Limite de détection µg/g
aldrine	aldrine	0,10
α-chlordane ou β-chlordane	—	0,05
pp'-DDE	—	0,10
op'-DDT	—	0,10
pp'-DDT	—	0,10
dieldrine	dieldrine	0,10
endosulfan	endosulfan	0,10
sulfate d'endosulfan		0,20
endrine	endrine	0,10
HCB	hexachlorobenzène	0,05
α-HCH ou α-BHC	—	0,05
β-HCH ou β-BHC	—	0,05
γ-HCH ou γ-BHC	gamma-HCH ou gamma-BHC	0,05
δ-HCH ou δ-BHC	—	0,05
heptachlore	heptachlore	0,10
époxyde d'heptachlore	—	0,10
op'-TDE ou op'-DDD	—	0,10
pp'-TDE ou pp'-DDD	TDE	0,10

4 Réactifs

4.1 Généralités

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. La pureté des solvants doit être contrôlée avant usage en effectuant une détermination à blanc en suivant exactement le même mode opératoire (extraction, concentration, purification, chromatographie en phase gazeuse) que celui utilisé lors de la détermination sur l'échantillon. Les chromatogrammes obtenus à partir des solvants doivent avoir une ligne de base exempte de pics notables qui puissent interférer avec ceux des résidus de pesticides soumis à l'essai.

NOTE — Les qualités des réactifs et solvants purifiés spécialement dans le but d'analyse des résidus de pesticides sont disponibles dans le commerce.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

4.2 *n*-Hexane.

4.3 Benzène.

4.4 Sulfate de sodium, anhydre.

4.5 Mélange d'acétonitrile et d'eau.

Mélanger 5 volumes d'acétonitrile et 2 volumes d'eau.

4.6 Chlorure de sodium, solution à 20 g/l.

4.7 Florisil, 60 à 100 mesh.

NOTE — «Florisil» est le nom d'une marque déposée d'une variété spécialement sélectionnée de silicate de magnésium. La gamme de dimensions en mesh désignée comme suit «60 à 100 mesh» correspond à une gamme d'ouverture de maille de 250 µm à 150 µm.

4.7.1 Spécification

La qualité du Florisil est une des plus importantes caractéristiques de la méthode d'essai. L'activité du Florisil demande à être suffisante pour retenir les impuretés présentes dans l'extrait provenant de l'échantillon tout en permettant aux résidus de pesticides d'être élués. Le Florisil doit être en premier lieu prétraité comme décrit en 4.7.2. Seul le Florisil, qui satisfait l'essai de contrôle ci-après décrit dans 4.7.3 doit être utilisé.

4.7.2 Prétraitement

Chauffer le Florisil pendant 5 h dans un four à moufle à une température comprise entre 500 et 550 °C. Laisser refroidir le Florisil dans un récipient hermétiquement clos ne contenant aucun dessiccant. Ajouter rapidement, goutte à goutte et en mélangeant constamment, 5 ml d'eau à chaque portion de 100 g de Florisil. Mélanger uniformément dans un ballon rotatif pendant 30 min. Laisser l'humidification s'uniformiser en plaçant le Florisil dans un récipient hermétiquement clos pendant au moins 48 h avant d'opérer comme décrit en 4.7.3.

4.7.3 Vérification du niveau d'activité

Préparer une solution étalon de pesticide dans l'hexane contenant tous les pesticides soumis à l'essai, chacun à une concentration équivalente à 10 fois la limite inférieure de détection du pesticide concerné (voir le tableau).

NOTE — La valeur de concentration de 10 fois la limite inférieure de détection est basée sur un recouvrement de 95 % et assure également qu'au moins deux fois la valeur limite inférieure est présente pour le contrôle ci-après par chromatographie en phase gazeuse.

Faire passer la solution étalon de pesticide déjà préparée à travers la colonne de Florisil prétraité, comme décrit en 7.3, et déterminer la quantité de chaque pesticide dans les éluats à l'aide du mode opératoire de chromatographie en phase gazeuse décrit en 7.4 et 7.5.

Le niveau d'activité du Florisil prétraité est correct et il est satisfaisant à l'emploi si le recouvrement de chaque pesticide est supérieur à 90 %.

L'activité du Florisil doit être vérifiée toutes les fois qu'il est utilisé.

4.8 Solutions étalons de pesticide.

Il est recommandé d'utiliser des pesticides sous forme solide, de pureté garantie. Peser au moins 10 mg de chaque pesticide solide de manière à s'assurer d'une précision d'au moins 1 % (c'est-à-dire $10 \pm 0,1$ mg). Préparer une réserve de solutions, dans le benzène ou l'hexane selon le cas, de chaque pesticide à une concentration qui permette la dilution ultérieure en vue de l'étalonnage (7.5) et en vue du contrôle de l'activité du Florisil, conformément à 4.7.3. Placer les réserves de solutions dans un réfrigérateur. Ces solutions sont stables pendant au moins 6 mois.

À partir des réserves de solutions, préparer les solutions diluées adéquates de chaque pesticide dans le solvant approprié, comme spécifié pour l'étalonnage.

4.9 Étalon interne (facultatif).

Mirex peut être utilisé en tant qu'étalon interne, si nécessaire.

NOTE — Mirex est un nom générique pour dodécachloropentacyclo [5.2.1.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{5,8}] décane.

5 Appareillage

NOTE — Il est essentiel de nettoyer toute la verrerie à fond avant utilisation et d'éviter l'emploi de récipients en plastique et de graisse à robinetterie, sinon des impuretés risquent de s'introduire dans les solvants.

Matériel courant de laboratoire, sans spécifications particulières, et

5.1 Fioles coniques, de capacité 500 ml, à bouchons en verre rodé.

5.2 Ampoules à décantation, de capacité 250 ml, à robinet en polytétrafluorure d'éthylène.

5.3 Fioles jaugées à un trait, de capacité 25 ml, conformes à la classe A de l'ISO 1042.

5.4 Pipettes à un trait, de capacité 5 ml, 25 ml et 50 ml, conformes à l'ISO 648.

5.5 Pipettes Pasteur.

5.6 Évaporateur rotatif, équipé de fioles de différentes capacités, ou

5.7 Évaporateur de Kuderna-Danish (voir schéma en annexe).

5.8 Colonne à chromatographie, 10 mm de diamètre interne, munie d'un robinet en polytétrafluorure d'éthylène et d'un disque en verre fritté, classe de porosité P 100 (voir ISO 4793).

5.9 Chromatographe en phase gazeuse.

5.9.1 Spécifications élémentaires

Le chromatographe en phase gazeuse doit être réglé et les paramètres optimisés en fonction des particularités de l'appareil et du détecteur utilisé. L'injecteur, le four et le détecteur doivent être chacun équipé de leur propre dispositif de chauffage. Le volume mort du détecteur doit être aussi faible que possible et inférieur à 5 % du volume total s'écoulant chaque minute vers le détecteur. L'injection à la colonne est recommandée.

Le chromatographe à phase gazeuse doit être conçu de manière à être réglé conformément aux instructions détaillées et aux recommandations données de 5.9.2 à 5.9.4 inclus.

5.9.2 Températures

La température de l'injecteur devrait être de 30 °C supérieure à la température de la colonne, c'est-à-dire pour une colonne à 210 °C, l'injecteur devrait être à 240 °C.

La température du détecteur doit être comprise entre 180 et 350 °C, selon le type du détecteur.

5.9.3 Dispositif d'injection

Utiliser un système d'injection automatique ou tout autre moyen d'injection approprié.

Lors de l'utilisation d'une injection manuelle, l'emploi d'une microseringue à ressort de rappel, capable d'injecter des volumes de 1 à 5 µl, est recommandé. Avant que les solutions soient injectées à la seringue, la rincer 10 fois avec du solvant pur et 5 fois avec la solution. Après l'injection, rincer 5 fois la seringue avec du solvant pur.

5.9.4 Colonne

5.9.4.1 Dimensions

Le chromatographe doit être muni d'une colonne à chromatographie en verre, d'une longueur suffisante (2 à 4 m), afin d'effectuer la séparation adéquate des résidus de pesticides de l'échantillon soumis à l'essai.

5.9.4.2 Remplissage

Le support et la phase stationnaire doivent être l'une des deux possibilités suivantes :

- a) 1,5 g de SP-2250 et 1,95 g de SP-2401 pour 100 g de Supelcon 100/120;
- b) 1,5 g de OV-17 et 1,95 g de QF-1 pour 100 g de Varaport 30 (ou support équivalent).

NOTES

- 1 SP-2250 est un poly(méthylphénylsiloxane) (50 % de phényl). SP-2401 est un fluoropropylsilicone. Supelcon 100/120 est une terre d'infusoires silanisée (100/120 indique une ouverture de maille en mesh dans une gamme de 150 µm à 125 µm).
- OV-17 est un poly(méthylphénylsiloxane). QF-1 est un trifluoropropylméthylsilicone. Varaport 30 est une terre d'infusoires silanisée.
- 2 Si une identification et une détermination plus positives sont nécessaires, une deuxième colonne de polarité différente doit être utilisée.
- 3 Les phases stationnaires et le produit utilisé comme support sont spécifiés par les désignations sous lesquelles ils sont disponibles dans le commerce. Cette forme de spécification est nécessaire, du fait que les substances ne peuvent être suffisamment spécifiées pour l'objet de cette Norme internationale, sur la base des descriptions génériques données dans la note 1.

5.9.4.3 Détecteur

Un détecteur à capture d'électrons doit être utilisé.

5.9.4.4 Gaz vecteur

L'azote pur, l'hélium pur ou un mélange d'argon et de méthane 90 + 10 ou 95 + 5 (en volume) doivent être utilisés. Si le débit du gaz passant à travers la colonne est inférieur à 25 ml/min, un apport de gaz vecteur supplémentaire doit être ajouté à la sortie de la colonne, afin d'assurer un débit suffisamment important de gaz à travers le détecteur à capture d'électrons (gaz de purge).

Le gaz vecteur doit être purifié par un filtre moléculaire inclus sur la ligne d'arrivée du gaz.

6 Échantillonnage et préparation de l'échantillon

6.1 Échantillonnage

Échantillonner le tabac ou produit du tabac selon l'ISO 4874. Faire particulièrement attention à ce que l'échantillon pour essai soit représentatif du produit reçu.

6.2 Préparation de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit être de préférence sous forme de tabac haché. Si l'échantillon pour essai ne peut être préparé sous cette forme, réduire en poudre l'échantillon pour laboratoire en faisant attention de ne pas l'échauffer.

7 Mode opératoire

7.1 Prise d'essai

7.1.1 Peser à 0,1 g près, deux prises d'essai de 20 g chacune à partir de l'échantillon pour essai. Suivre le mode opératoire décrit de 7.2 à 7.6 inclus, sur chacune des deux prises d'essai.

7.1.2 Parallèlement à la constitution des prises d'essai décrites en 7.1.1, prendre une autre prise d'essai et l'utiliser pour la détermination de la teneur en eau de l'échantillon pour essai.

7.2 Extractions

7.2.1 Extraction à l'acétonitrile

Transférer la prise d'essai dans une fiole conique de 500 ml (5.1). Ajouter 280 ml de mélange d'acétonitrile et d'eau (4.5), boucher la fiole et agiter pendant 1 h, ou bien placer la prise d'essai et le mélange d'acétonitrile et d'eau dans un macérateur de laboratoire et macérer pendant 2 min.

Filter les contenus à travers un filtre en papier à filtrage rapide, préalablement lavé avec précaution à l'aide du mélange d'acétonitrile et d'eau, et recueillir tout le filtrat.

7.2.2 Réextraction dans l'hexane

Prélever à la pipette 50 ml de filtrat et les transférer dans une ampoule à décantation de 250 ml (5.2). Ajouter 25 ml d'hexane (4.2) et 150 ml de solution de chlorure de sodium (4.6); agiter doucement pendant 1 min. Laisser les phases se séparer, puis transférer la phase aqueuse dans une seconde ampoule.

Ajouter 25 ml d'hexane dans la seconde ampoule, l'agiter pendant 1 min et laisser les phases se séparer. Éliminer la phase aqueuse et réunir la phase hexane de cette seconde ampoule avec celle de la première.

Sécher les phases hexane ainsi réunies par passage à travers une colonne de 2 cm de diamètre, remplie, sur une hauteur de 2 cm, avec du sulfate de sodium anhydre (4.4). Laver la colonne avec 20 ml supplémentaires d'hexane.

Transférer la totalité de la solution sèche d'hexane dans l'évaporateur rotatif (5.6), chauffer à une température de 40 °C sous une pression absolue de 53 mbar, ou bien transférer la solution dans l'évaporateur de Kuderna-Danish (5.7) et le chauffer sur un bain d'eau bouillante. Réduire le volume de la solution à 1 ml environ.

7.3 Mise en ordre et préparation de l'éluat d'essai

Remplir la colonne à chromatographie (5.8) sur une hauteur de

5 à 6 cm avec de l'hexane (4.2). Ajouter 2 g de Florisil (4.7) suivi de sulfate de sodium anhydre (4.4) jusqu'à une hauteur d'environ 2 cm. Drainer l'hexane de la colonne jusqu'à ce que son niveau coïncide avec le niveau supérieur de remplissage de la colonne.

Transférer quantitativement la solution concentrée (7.2.2) de l'évaporateur dans la colonne à l'aide d'une pipette Pasteur (5.5) en lavant l'évaporateur, la fiole et la pipette tant que cela est nécessaire avec de l'hexane. Drainer la colonne jusqu'à ce que le niveau de la solution dans la colonne coïncide avec le niveau supérieur de remplissage de la colonne.

Éluer la colonne avec l'hexane en ajoutant juste assez d'hexane pour permettre à 25 ml d'éluat d'être recueilli dans une fiole jaugée de 25 ml (5.3). Ceci constitue la fraction A.

Ajouter du benzène (4.3) dans la colonne et recueillir 25 ml d'éluat dans une seconde fiole jaugée de 25 ml. Ceci constitue la fraction B.

NOTE — Normalement la dieldrine, l'endrine, l'époxyde d'heptachlore et les endosulfans sont trouvés dans la fraction B.

7.4 Chromatographie en phase gazeuse

Injecter l'une après l'autre trois portions de 1 à 5 µl chacune, de la fraction A et de la fraction B dans le chromatographe en phase gazeuse (5.9) et obtenir ainsi en triple les chromatogrammes pour chaque fraction. Pour chacune des injections faites en triple, utiliser la réponse du détecteur correspondant à chaque résidu de pesticide et la courbe d'étalonnage (voir 7.5) pour calculer la concentration de chaque résidu de pesticide.

Pour des valeurs moyennes de 1,0 partie par million ou plus, l'écart maximal entre trois valeurs obtenues ne doit pas être supérieur à 10 % de leur moyenne. Pour les valeurs moyennes inférieures à 1,0 partie par million, l'écart maximal entre les trois valeurs obtenues ne doit pas être supérieur à 20 % de leur moyenne. Si pour toute série de trois injections, cette concordance n'est pas obtenue, le résultat correspondant à cette prise d'essai n'est pas valable.

Sous réserve que cette condition de concordance soit remplie, utiliser la moyenne de chaque série de trois valeurs pour le calcul du résultat (voir chapitre 8).

7.5 Étalonnage

Préparer à partir d'une solution étalon de pesticide (4.8) un nombre de solutions diluées de pesticide couvrant une gamme de concentration de chaque pesticide soumis à l'essai. Injecter trois portions de 1 à 5 µl de la première solution étalon de pesticide dans le chromatographe à phase gazeuse et déterminer la moyenne des réponses du détecteur à partir des chromatogrammes (hauteur du pic ou aire du pic). Opérer de la même façon pour chacune des solutions étalons de pesticide. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque résidu de pesticide à l'aide des moyennes des réponses du détecteur et des concentrations des solutions étalons.

NOTE — La réponse du détecteur à capture d'électrons n'est pas toujours linéaire.

Lors du déroulement de l'essai des échantillons, il est vital d'alterner les injections d'étalon et de solution échantillon pour contrôler l'étalonnage. Pour maintenir la réponse du détecteur dans sa gamme linéaire, diluer l'extrait si nécessaire. Utiliser le Mirex (voir 4.9) comme étalon interne si cela est demandé, ceci afin d'augmenter la précision des résultats.

8 Expression des résultats

8.1 Mode de calcul et formule

Calculer pour chaque prise d'essai la valeur, exprimée en microgrammes par gramme de l'échantillon (partie par million) pour chaque résidu de pesticide, à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{C' \times 280 \times 25}{50 \times m} \times \frac{100}{(100 - W)}$$

où

C' est la concentration (moyenne des trois valeurs obtenues, voir 7.4), en microgrammes par millilitre, de résidu de pesticide dans les extraits finals, lue sur la courbe d'étalonnage;

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai;

W est la teneur en eau, exprimée en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai.

8.2 Répétabilité

La différence entre les valeurs obtenues pour chaque résidu de pesticide, calculées selon 8.1 à l'occasion des déterminations effectuées sur les deux prises d'essai définies en 7.1.1, par le même opérateur utilisant le même matériel, dans le même laboratoire, ne doit pas être supérieure à 10 % de la valeur moyenne si celle-ci est de 1,0 partie par million ou plus; et elle ne doit pas être supérieure à 20 % de la valeur moyenne si celle-ci est inférieure à 1,0 partie par million.

Si cette condition n'est pas satisfaite, le résultat n'est pas valable.

8.3 Valeur moyenne

Étant entendu que les valeurs obtenues en doubles, calculées comme décrit en 8.1 pour chaque résidu de pesticide satisfont les conditions données en 8.2, calculer la valeur moyenne correspondante.

Exprimer cette valeur moyenne en microgrammes par gramme (partie par million) à une décimale près.

9 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit donner la quantité de chaque résidu de pesticide individuel identifié. Il doit également mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Annexe

Évaporateur de Kuderna-Danish

(Cette annexe fait partie intégrante de la présente Norme internationale.)

