

---

---

**Cigarettes — Dosage des nitrosamines  
spécifiques du tabac dans le courant  
principal de fumée de cigarette —  
Méthode par CL-SM/SM**

*Cigarettes — Determination of tobacco specific nitrosamines in  
mainstream cigarette smoke — Method using LC-MS/MS*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 19290:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-eebb-46ca-af28-b5f2578ca47f/iso-19290-2016)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-eebb-46ca-af28-  
b5f2578ca47f/iso-19290-2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-eebb-46ca-af28-b5f2578ca47f/iso-19290-2016)



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 19290:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-eebb-46ca-af28-b5f2578ca47f/iso-19290-2016>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Préparation</b> .....	<b>3</b>
7.1    Préparation de la verrerie.....	3
7.2    Préparation des solutions.....	4
7.3    Préparations des étalons.....	4
7.3.1    Généralités.....	4
7.3.2    Préparation des solutions d'étalons internes.....	4
7.3.3    Préparation des solutions étalons d'étalonnage.....	4
<b>8</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>6</b>
<b>9</b> <b>Préparation du produit du tabac</b> .....	<b>6</b>
<b>10</b> <b>Production de l'échantillon — Fumage de cigarettes</b> .....	<b>6</b>
10.1    Généralités.....	6
10.2    Fumage linéaire.....	6
10.3    Fumage rotatif.....	6
<b>11</b> <b>Analyse de l'échantillon</b> .....	<b>6</b>
11.1    Préparation de l'échantillon.....	6
11.1.1    Généralités.....	6
11.1.2    Extraction pour le fumage linéaire (filtre de 44 mm).....	7
11.1.3    Extraction pour le fumage rotatif (filtre de 92 mm).....	7
11.1.4    Préparation de l'échantillon final.....	7
11.2    Chromatographie liquide haute performance en phase inverse.....	7
11.2.1    Généralités.....	7
11.2.2    Paramètres de configuration CLHP (exemple).....	7
11.2.3    Phase mobile (exemple).....	7
11.2.4    Gradient de la phase mobile (exemple).....	7
11.2.5    Paramètres de configuration SM/SM (exemple).....	8
11.3    Calculs.....	9
11.3.1    Courbe d'étalonnage.....	9
11.3.2    Détermination des concentrations de TSNAs.....	9
11.3.3    Quantification de l'échantillon.....	9
11.3.4    Détermination des teneurs en TSNA dans la fumée du courant principal.....	10
<b>12</b> <b>Répétabilité et reproductibilité</b> .....	<b>10</b>
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes types</b> .....	<b>13</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>15</b>

## 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 en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html)

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 126, *Tabac et produits du tabac*.

## Introduction

Entre 1999 et 2005, le Groupe d'étude «Analytes spéciaux» du CORESTA ([www.coresta.org](http://www.coresta.org)) a étudié les méthodologies existantes pour le dosage des nitrosamines spécifiques du tabac (TSNAs) dans le courant principal de fumée de cigarette. Deux types principaux de méthodologies d'analyse ont été proposés pour ce dosage: la CG-AET (chromatographie en phase gazeuse couplée à un analyseur d'énergie thermique) et la CL-SM/SM (chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem). Le groupe d'étude a décidé dans un premier temps de concevoir une méthode utilisant la CG-AET, car cette méthodologie était la plus largement utilisée dans les laboratoires à ce moment-là.

Cependant, en 2009, il a été confirmé que la plupart des laboratoires appliquaient une technique de CL-SM/SM pour mesurer les teneurs en TSNAs. Le sous-groupe (anciennement «groupe d'étude») a alors orienté ses recherches sur une méthode CL-SM/SM pour venir compléter la technique CG-AET déjà disponible en tant que méthode N° 63 recommandée par le CORESTA. Plusieurs de ces méthodes ont été décrites dans la littérature scientifique et sont citées ici. Un essai d'aptitude a été mené avec 14 laboratoires, qui utilisaient leurs propres méthodologies CL-SM/SM. Les données de reproductibilité étaient meilleures pour la CL-SM/SM que pour la CG-AET et la méthodologie était très similaire d'un laboratoire à l'autre. Pour résumer, la fumée du courant principal de cigarette était recueillie sur un filtre Cambridge (FC), une solution d'étalons internes était ajoutée et, après extraction, une partie aliquote était séparée et analysée quantitativement par CL-SM/SM. Suite aux principaux enseignements tirés de cet essai d'aptitude, une méthodologie générale a été convenue.

Ce document a été élaboré à partir d'une dernière étude collaborative impliquant la participation de 20 laboratoires de 12 pays. La méthode inclut des notes pour informer d'autres laboratoires qui pourraient souhaiter l'adopter sur les principaux aspects qui nécessitent d'être bien contrôlés pour fournir des données aussi robustes et cohérentes que les données de répétabilité et de reproductibilité fournies. Les cigarettes ont été fumées selon les paramètres du régime de fumage indiqués dans l'ISO 3308 et les évaluations statistiques ont été réalisées conformément aux recommandations de l'ISO 5725.

ISO 19290:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-ecbb-46ca-af28-652378ca7726/iso-19290-2016>

Aucun régime de fumage mécanique ne peut reproduire parfaitement le comportement des fumeurs:

- il est recommandé que les cigarettes soient aussi soumises à essai sous les conditions d'une différente intensité de fumage mécanique que celles spécifiées dans la présente Norme internationale;
- l'essai de fumage mécanique permet de caractériser les émissions des cigarettes pour des besoins de conception et de réglementation, mais communiquer aux fumeurs les résultats de mesures sur machine peut susciter des malentendus sur les niveaux d'exposition et de risque selon les marques;
- les données concernant l'émission de fumées obtenues par des mesurages mécaniques peuvent être utilisées comme des données de base pour l'évaluation des dangers du produit mais elles ne constituent pas des mesures valables de l'exposition des individus et des risques et ce n'est pas leur but. C'est faire un usage impropre des essais réalisés conformément aux Normes ISO que de communiquer que les différences de mesures mécaniques entre différents produits correspondent à des différences de niveaux d'exposition ou de risque.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 19290:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f06c2495-eebb-46ca-af28-b5f2578ca47f/iso-19290-2016>

# Cigarettes — Dosage des nitrosamines spécifiques du tabac dans le courant principal de fumée de cigarette — Méthode par CL-SM/SM

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation du présent document peut impliquer des réactifs, manipulations ou matériels dangereux. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires avant son utilisation.

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de quantification de quatre nitrosamines spécifiques du tabac (TSNAs) dans la matière particulaire totale du courant principal de la fumée de cigarette par chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). Les TSNAs quantifiées sont les suivantes: N-nitrosornicotine (NNN), N-nitrosoanatabine (NAT), N-nitrosoanabasine (NAB) et 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK).

## 2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3308, *Machine à fumer analytique de routine pour cigarettes — Définitions et conditions normalisées*

ISO 3402, *Tabac et produits du tabac — Atmosphère de conditionnement et d'essai*

ISO 4387, *Cigarettes — Détermination de la matière particulaire totale et de la matière particulaire anhydre et exempte de nicotine au moyen d'une machine à fumer analytique de routine*

ISO 8243, *Cigarettes — Échantillonnage*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

### 3.1

#### nitrosamines spécifiques du tabac

##### TSNAs

quatre nitrosamines sont prédominantes dans le tabac: la N-nitrosornicotine (NNN), la N-nitrosoanatabine (NAT), la N-nitrosoanabasine (NAB) et la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)

[SOURCE: ISO 22303:2008, 3.1]

## 4 Principe

Les cigarettes sont fumées sur une machine à fumer standard. La fumée du courant principal est piégée sur un filtre en fibre de verre. Après ajout d'un étalon interne, la matière particulaire totale retenue sur le filtre en fibre de verre est extraite avec une solution d'acétate d'ammonium à 100 mM au moyen d'un agitateur.

L'extrait est prélevé au moyen d'une seringue et filtré sur un filtre à seringue en PTFE de 0,45 µm, directement dans un flacon pour passeur d'échantillons.

Les échantillons sont soumis à une chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse, puis ils sont quantifiés par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM).

## 5 Appareillage

Appareillage courant de laboratoire et équipement utilisé pour la préparation d'échantillons et d'étalons et, en particulier, ce qui suit. Toute la verrerie doit être nettoyée avant utilisation pour éviter toute contamination.

**5.1 Équipement nécessaire pour réaliser le conditionnement des cigarettes**, conformément à l'ISO 3402.

**5.2 Équipement nécessaire pour réaliser le marquage de la longueur de mégot des cigarettes.**

**5.3 Équipement nécessaire pour réaliser le fumage des cigarettes**, conformément à l'ISO 3308.

**5.4 Balance analytique**, capable de peser avec une précision d'au moins quatre décimales.

**5.5 Tubes à centrifuger**, de 50 ml.

**5.6 Distributeur**, d'une contenance de 20 ml pour les solutions d'extraction.

**5.7 Seringues étanches aux gaz**, d'une contenance de 250 µl.

**5.8 Pipette automatique.**

**5.9 Agitateur.**

**5.10 Chromatographe liquide haute performance couplé à un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM)**, composé des éléments suivants:

**5.10.1 Pompe binaire.**

**5.10.2 Passeur d'échantillons.**

**5.10.3 Spectromètre de masse en tandem.**

**5.10.4 Système d'acquisition de données.**

**5.10.5 Colonne CL:** XTerra MS C18<sup>1)</sup>, 2,5 µm, 2,1 mm × 50 mm ou équivalent.

1) XTerra MS C18 est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Ces informations sont données à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifient nullement l'approbation de ce produit par l'ISO.



## 6 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

- 6.1 N-Nitrosornicotine (NNN)**, numéro CAS 80508-23-2,  $w \geq 98 \%$  (fraction massique).
- 6.2 N-Nitrosoanatabine (NAT)**, numéro CAS 71267-22-6,  $w \geq 98 \%$ .
- 6.3 N-Nitrosoanabasine (NAB)**, numéro CAS 1133-64-8,  $w \geq 96 \%$ .
- 6.4 4-(N-Nitrosométhylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)**, numéro CAS 64091-91-4,  $w \geq 97 \%$ .
- 6.5 N-Nitrosornicotine-2,4,5,6-d4 (NNN-d4)**, numéro CAS 66148-19-4,  $w \geq 98 \%$ .
- 6.6 N-Nitrosoanatabine-2,4,5,6-d4 (NAT-d4)**, numéro CAS 1426174-82-4,  $w \geq 98 \%$ .
- 6.7 N-Nitrosoanabasine-2,4,5,6-d4 (NAB-d4)**, numéro CAS 1020719-68-9,  $w \geq 98 \%$ .
- 6.8 4-(N-Nitrosométhylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-2,4,5,6-d4 (NNK-d4)**, numéro CAS 76661-24-7,  $w \geq 98 \%$ .
- 6.9 Acétate d'ammonium**,  $w \geq 97 \%$ .
- 6.10 Acétonitrile**, de qualité CLHP.
- 6.11 Méthanol**, de qualité CLHP.
- 6.12 Acide acétique**,  $w \geq 99,77 \%$ .
- 6.13 Eau déionisée**,  $> 18,8 \text{ M}\Omega$ .
- 6.14 Filtre à seringue**, de  $0,45 \mu\text{m}$ , en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou équivalent.
- 6.15 Seringues à usage unique**, de 5 ml.
- 6.16 Flacons pour passeur d'échantillons (en verre ambré)**, bouchons et septa revêtus de PTFE.

## 7 Préparation

### 7.1 Préparation de la verrerie

La verrerie doit être nettoyée et séchée de manière à s'assurer qu'aucune contamination ne se produise.

Il est important que toutes les sources possibles de contamination qui pourraient interférer avec le processus analytique soient éliminées de la zone de travail.

## 7.2 Préparation des solutions

### 7.2.1 Solution d'extraction, solution d'acétate d'ammonium à 100 mM.

Peser 15,4 g  $\pm$  0,05 g d'acétate d'ammonium. Transférer dans une fiole jaugée de 2 000 ml et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

### 7.2.2 Phase mobile CLHP A, solution d'acide acétique à 0,1 % dans l'eau.

Ajouter 1 ml d'acide acétique dans une fiole jaugée de 1 000 ml et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

### 7.2.3 Phase mobile CLHP B, solution d'acide acétique à 0,1 % dans le méthanol.

Ajouter 1 ml d'acide acétique dans une fiole jaugée de 1 000 ml et diluer jusqu'au trait de jauge avec du méthanol.

NOTE La solution d'extraction et les phases mobiles sont stables à température ambiante pendant une durée allant jusqu'à trois mois.

## 7.3 Préparations des étalons

### 7.3.1 Généralités

Pour la préparation des solutions étalons, il convient d'utiliser des pipettes jaugées.

### 7.3.2 Préparation des solutions d'étalons internes

#### 7.3.2.1 Solution primaire

Peser respectivement, à 0,1 mg près, environ 10 mg de NNN-d4, de NAT-d4, de NAB-d4 et de NNK-d4.

Transvaser dans des fioles jaugées de 10 ml et diluer le contenu de chaque fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile, puis bien homogénéiser.

La concentration de chaque solution est d'environ 1 000  $\mu$ g/ml.

#### 7.3.2.2 Solution secondaire combinée

Transférer 5 ml de chaque solution primaire de NNN-d4, de NAT-d4 et de NNK-d4 et 1 ml de NAB-d4 dans une fiole jaugée de 100 ml. Diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile et bien homogénéiser.

La concentration de cette solution est d'environ 50  $\mu$ g/ml de NNN-d4, de NAT-d4 et de NNK-d4, et de 10  $\mu$ g/ml de NAB-d4.

#### 7.3.2.3 Solution de travail

Transférer 50 ml de la solution secondaire combinée dans une fiole jaugée de 500 ml. Diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile et bien homogénéiser.

La concentration de cette solution est d'environ 5  $\mu$ g/ml de NNN-d4, de NAT-d4 et de NNK-d4, et de 1  $\mu$ g/ml de NAB-d4.

### 7.3.3 Préparation des solutions étalons d'étalonnage

#### 7.3.3.1 Solutions primaires individuelles de TSNA

Peser respectivement, à 0,1 mg près, environ 10 mg de NNN, de NAT, de NAB et de NNK.

Transvaser dans des fioles jaugées de 10 ml et diluer le contenu de chaque fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile, puis bien homogénéiser.

La concentration de chaque solution est d'environ 1 000 µg/ml.

### 7.3.3.2 Solution mère (I) composée d'un mélange de TSNAs

Transférer 4 ml des solutions primaires individuelles de TSNA à base de NNN, de NAT et de NNK et 1 ml de la solution primaire individuelle de TSNA à base de NAB dans une fiole jaugée de 100 ml. Diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile et bien homogénéiser.

La concentration de cette solution est d'environ 40 µg/ml de NNN, de NAT et de NNK, et de 10 µg/ml de NAB.

### 7.3.3.3 Solution mère (II) composée d'un mélange de TSNAs

Transférer 2 ml de la solution mère (I) composée d'un mélange de TSNAs dans une fiole jaugée de 200 ml. Diluer jusqu'au trait de jauge avec un mélange d'acétonitrile et d'eau déionisée (30:70 en fraction volumique) et bien homogénéiser.

La concentration de cette solution est d'environ 400 ng/ml de NNN, de NAT et de NNK, et de 100 ng/ml de NAB.

### 7.3.3.4 Solutions étalons de travail

Préparer 7 solutions étalons de travail qui couvrent la plage de concentration concernée.

Ajouter les volumes choisis de solutions figurant dans le [Tableau 1](#) dans une fiole jaugée de 100 ml et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

Ces solutions ont des concentrations d'environ 50 ng/ml de NNN-d4, de NAT-d4 et de NNK-d4, de 10 ng/ml de NAB-d4, de 0 ng/ml à 80 ng/ml de NNN, de NAT et de NNK, et de 0 ng/ml à 20 ng/ml de NAB (voir le [Tableau 2](#)).

Il convient que chaque laboratoire établisse la plage d'étalonnage la plus appropriée en fonction de l'équipement utilisé et du type d'échantillons à analyser. Le mode opératoire de préparation des étalons est indiqué à titre d'exemple et est applicable pour la gamme de produits concernée par l'étude collaborative.

**Tableau 1 — Préparation des solutions étalons de travail en vue de l'étalonnage**

Solutions	S0 ml	S1 ml	S2 ml	S3 ml	S4 ml	S5 ml	S6 ml
Solution d'étalons internes	1	1	1	1	1	1	1
Solution mère (II) composée d'un mélange de TSNAs	0	0,5	1	2	5	10	20
Acétate d'ammonium (à 100 mM)	10	10	10	10	10	10	10
Acétonitrile	10	10	10	10	8	7	4
Volume final	100	100	100	100	100	100	100