
**Tabac et produits du tabac — Dosage
des nitrosamines spécifiques du tabac
dans les produits du tabac — Méthode
par CL-SM/SM**

*Tobacco and tobacco products — Determination of tobacco-specific
nitrosamines in tobacco products — Method using LC-MS/MS*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21766:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461f1b8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3eec1f/iso-21766-2018)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461f1b8c-d5f6-441a-978f-
edc4ce3eec1f/iso-21766-2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461f1b8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3eec1f/iso-21766-2018)



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 21766:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461fdb8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3ecc1f/iso-21766-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs	2
6 Appareillage	2
7 Préparation	3
7.1 Préparation de la verrerie.....	3
7.2 Préparation des solutions.....	3
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 d'étalonnage.....	4
8 Échantillonnage	5
8.1 Généralités.....	5
8.2 Préparation des échantillons.....	5
8.3 Extraction de l'échantillon.....	6
9 Analyse des échantillons	6
9.1 Généralités.....	6
9.2 Paramètres CLHP suggérés.....	6
9.3 Paramètres SM/SM.....	7
9.3.1 Généralités.....	7
9.3.2 Transitions de quantification et de qualification.....	7
9.4 Adéquation du système.....	8
9.5 Étalonnage.....	8
9.6 Calcul.....	8
10 Répétabilité et reproductibilité	9
11 Rapport d'essai	12
Annexe A (informative) Nettoyage de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE)	13
Annexe B (informative) Exemples de chromatogrammes types	15
Bibliographie	17

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).

L'attention est attirée 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).

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 nature volontaire des normes, 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 www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 126, *Tabac et produits du tabac*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Le sous-groupe «Tabac sans fumée» du CORESTA (Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac) a étudié divers modes opératoires largement employés pour le dosage des nitrosamines spécifiques du tabac (TSNAs) dans les produits du tabac sans fumée. Une étude évaluant plusieurs méthodologies différentes a été menée en 2009. Elle incluait à la fois des méthodes par chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et des méthodes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection d'azote par chimiluminescence. Les résultats produits avec la méthode CL-SM/SM se sont révélés être les plus cohérents et ils ont été utilisés comme base pour la méthode recommandée CORESTA N° 72^[Z]. Neuf laboratoires ont fourni des données obtenues avec cette méthode. Cette étude incluait neuf produits du tabac sans fumée du commerce, couvrant huit types de produits différents. La méthode recommandée CORESTA N° 72 a été actualisée en 2016 pour inclure la répétabilité et la reproductibilité des quatre produits de référence du CORESTA.

La méthode recommandée CORESTA N° 72 a servi de base pour l'élaboration du présent document. Cependant, le domaine d'application du présent document a été élargi pour inclure le tabac broyé, les éléments de remplissage de la colonne tabac des cigarettes et les éléments de remplissage des cigares en plus des produits du tabac sans fumée. Les valeurs respectives de répétabilité (r) et de reproductibilité (R) pour le tabac broyé, les éléments de remplissage de la colonne tabac des cigarettes et les éléments de remplissage des cigares ont été déterminées via une étude collaborative internationale menée en 2017 et impliquant 18 laboratoires.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21766:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461f1b8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3ecc1f/iso-21766-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461f1b8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3ecc1f/iso-21766-2018>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21766:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461fdb8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3ecc1f/iso-21766-2018>

Tabac et produits du tabac — Dosage des nitrosamines spécifiques du tabac dans les produits du tabac — 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 déterminer l'applicabilité de toute autre restrictions avant son utilisation.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de quantification de quatre nitrosamines spécifiques du tabac (TSNAs) dans le tabac et les produits du tabac suivants: cigarettes, cigares et produits du tabac sans fumée, par chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). Les TSNAs dosés par cette méthode sont: la N-nitrosornicotine (NNN), la N-nitrosoanatabine (NAT), la N-nitrosoanabasine (NAB) et la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK).

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

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:

- Plateforme de navigation en ligne de l'ISO: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1

nitrosamines spécifiques du tabac

TSNAs

les quatre nitrosamines 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

Des étalons internes marqués au deutérium (d4) sont ajoutés à l'échantillon de tabac, puis extraits avec un tampon aqueux. Les extraits d'échantillons sont filtrés, puis analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse et quantifiés par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Les quantités de TSNAs dans les produits du tabac sont reportées en ng/g, en l'état, sur la base de la masse humide.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue pendant l'analyse. Les solvants doivent être de qualité pour CLHP ou supérieure.

- 5.1 **Eau, déionisée**, résistivité $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ à 25 °C.
- 5.2 **Acétonitrile**, de qualité pour CLHP ou supérieure.
- 5.3 **Méthanol**, de qualité pour CLHP ou supérieure.
- 5.4 **Acétate d'ammonium**, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.5 **Acide acétique**, $w \geq 98 \%$.
- 5.6 **N-Nitrosoanabasine**, (NAB, n° CAS: 1133-64-8), $w \geq 98 \%$.
- 5.7 **N-Nitrosoanatabine**, (NAT, n° CAS: 71267-22-6), $w \geq 98 \%$.
- 5.8 **4-(N-méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone**, (NNK, n° CAS: 64091-91-4), $w \geq 98 \%$.
- 5.9 **N-Nitrosornicotine**, (NNN, n° CAS: 80508-23-2), $w \geq 98 \%$.
- 5.10 **N-Nitrosoanabasine - deutérée**, (NAB-d4, n° CAS: 1020719-68-9), $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.
- 5.11 **N-Nitrosoanatabine - deutérée**, (NAT-d4, n° CAS: 1020719-69-0), $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.
- 5.12 **4-(N-méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone - deutérée**, (NNK-d4, n° CAS: 76661-24-7), $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.
- 5.13 **N-Nitrosornicotine - deutérée**, (NNN-d4, n° CAS: 66148-19-4), $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.

6 Appareillage

Appareillage et consommables courants de laboratoire et, en particulier, ce qui suit. Toute la verrerie doit être nettoyée avant utilisation pour éviter toute contamination.

6.1 **Chromatographe liquide haute performance couplé à un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM) avec source d'ionisation par électrospray (ESI)**, composé des éléments suivants.

- 6.1.1 **pompe binaire.**
- 6.1.2 **asseur d'échantillons.**
- 6.1.3 **four à colonne.**
- 6.1.4 **système d'acquisition de données.**

- 6.2 Colonne CLHP:** C18¹⁾ en phase inverse, granulométrie 2,5 µm, 2,1 mm × 50 mm, ou équivalent.
- 6.3 Agitateur orbital,** agitateur oscillant ou équipement similaire.
- 6.4 Flacons pour passeur d'échantillons.**
- 6.5 Seringues à usage unique,** de taille appropriée pour filtrer les échantillons.
- 6.6 Filtre à seringue,** de 25 mm de diamètre et de 0,45 µm de porosité, en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou équivalent.
- NOTE Divers matériaux filtrants ont été évalués lors de l'étude collaborative et le PTFE présentait le plus fort taux de recouvrement parmi ceux vérifiés.
- D'autres matériaux filtrants peuvent également convenir; toutefois, il convient qu'ils soient évalués avant d'être utilisés en routine.
- 6.7 Récipients d'extraction,** en verre, d'une contenance de 50 ml à 100 ml.
- 6.8 Fioles jaugées ambrées, de classe A,** disponibles en plusieurs tailles.
- 6.9 Pipettes jaugées en verre, de classe A, et/ou pipettes à déplacement positif,** disponibles en plusieurs tailles.
- 6.10 Balance analytique,** capable de peser avec une précision d'au moins quatre décimales (en grammes).

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 21766:2018

7 Préparation <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/461fdb8c-d5f6-441a-978f-edc4ce3ecc1f/iso-21766-2018>

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 pouvant interférer avec le processus analytique soient éliminées de la zone de travail.

Les solutions étalons et les extraits d'échantillons doivent être protégés de la lumière.

7.2 Préparation des solutions

7.2.1 Solution d'extraction, solution d'acétate d'ammonium à 100 mM dans l'eau.

Peser 15,4 g ± 0,05 g d'acétate d'ammonium. Transférer quantitativement 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 A de CLHP: eau, résistivité ≥ 18,2 MΩ·cm à 25 °C.

1) La colonne Waters XTerra® MS C18, 2,5 µm, 2,1 × 50 mm a été jugée adaptée. Ces informations sont données à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifient nullement l'approbation de ce produit par l'ISO. Des colonnes équivalentes peuvent être utilisées s'il peut être démontré qu'elles conduisent aux mêmes résultats, c'est-à-dire que les analytes et les étalons internes sont suffisamment séparés des interférences.

7.2.3 Phase mobile B de CLHP: 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.

Il convient que le laboratoire réalise des études de stabilité pour déterminer la durée de conservation de ces solutions.

7.3 Préparations des étalons

7.3.1 Généralités

Toutes les solutions étalons doivent être préparées dans de la verrerie ambrée ou opaque et conservées à environ -20°C , sauf les solutions d'étalonnage qui doivent être conservées au réfrigérateur. Produire une série de solutions d'étalonnage pour couvrir la plage de résultats attendue avec les échantillons d'essai, comme indiqué en 7.3.3.4. Déterminer la durée de conservation des solutions étalons et d'étalons internes.

7.3.2 Préparation des solutions d'étalons internes

7.3.2.1 Solution mère

Peser respectivement, à 0,1 mg près, environ 10 mg de NNN-d4, de NAT-d4, de NAB-d4 et de NNK-d4. Transférer quantitativement 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 $\mu\text{g/ml}$.

7.3.2.2 Solution secondaire mixte d'étalons internes

Transférer 4,00 ml de chacune des quatre solutions mères d'étalons internes dans une fiole jaugée de 100 ml et diluer au volume avec de l'acétonitrile. Homogénéiser le tout. La concentration est d'environ 40 $\mu\text{g/ml}$ de NNN-d4, de NNK-d4, de NAT-d4 et de NAB-d4.

7.3.2.3 Solution de dopage contenant les étalons internes

Transférer 5,00 ml de la solution composée du mélange d'étalons internes dans une fiole jaugée de 100 ml et diluer au volume avec de l'acétonitrile. Homogénéiser le tout. La concentration est d'environ 2 000 ng/ml de NNN-d4, de NNK-d4, de NAT-d4 et de NAB-d4.

7.3.3 Préparation des solutions d'étalonnage

7.3.3.1 Solution mère

Peser respectivement, à 0,1 mg près, environ 10 mg de NNN, de NAT, de NAB et de NNK. Transférer quantitativement 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 $\mu\text{g/ml}$.

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

Transférer 4,00 l de chacune des trois solutions mères de NNN, de NNK et de NAT, et 1,00 ml de la solution mère de NAB dans une fiole jaugée de 100 ml et diluer au volume avec de l'acétonitrile. Homogénéiser le tout. La concentration sera d'environ 40 $\mu\text{g/ml}$ de NNN, de NNK et de NAT et d'environ 10 $\mu\text{g/ml}$ de NAB.

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

Transférer 2,50 ml de la solution étalon (I) composée d'un mélange de TSNAs dans une fiole jaugée de 250 ml et diluer au volume avec de l'acétonitrile/de l'eau déionisée (30 %/70 %). Homogénéiser le tout. La concentration de NNN, de NNK et de NAT sera d'environ 400 ng/ml, et la concentration de NAB sera d'environ 100 ng/ml.

7.3.3.4 Solutions d'étalonnage de TSNA

Préparer sept solutions étalons de travail qui couvrent la plage de concentration concernée. Le [Tableau 1](#) montre un exemple de préparation de la solution d'étalonnage.

Les solutions d'étalonnage de TSNA sont préparées dans sept fioles jaugées de 100 ml, contenant chacune 10 ml de la solution d'acétate d'ammonium à 100 mM. Transférer 1,00 ml de la solution de dopage contenant les étalons internes (2 000 ng/ml) dans chacune des sept fioles jaugées. Ensuite, ajouter le volume approprié de solution étalon (II) composée d'un mélange de TSNAs, indiqué dans le [Tableau 1](#) ci-dessous. Puis ajouter le volume d'acétonitrile indiqué dans le [Tableau 1](#) ci-dessous. Enfin, diluer chacune des sept fioles au volume avec la solution d'acétate d'ammonium à 100 mM, puis bien homogénéiser. Calculer les concentrations d'extraits pour chaque étalon et les enregistrer.

NOTE Les solutions mères des TSNAs individuelles et les étalons internes deutérés dans l'acétonitrile peuvent être achetés aux concentrations requises.

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

Solution d'étalonnage	Volume de solution étalon (II) composée d'un mélange de TSNAs (ml)	Volume de solution de dopage contenant les étalons internes à 2 000 ng/ml (ml)	Volume d'acétonitrile (ml)	Concentration de NNN (ng/ml)	Concentration de NNK (ng/ml)	Concentration de NAT (ng/ml)	Concentration de NAB (ng/ml)
Étalon 1	0,125	1,00	22	0,5	0,5	0,5	0,125
Étalon 2	0,250	1,00	22	1,0	1,0	1,0	0,250
Étalon 3	0,50	1,00	22	2,0	2,0	2,0	0,50
Étalon 4	1,00	1,00	22	4,0	4,0	4,0	1,00
Étalon 5	2,00	1,00	22	8,0	8,0	8,0	2,00
Étalon 6	5,00	1,00	21	20	20	20	5,00
Étalon 7	25,0	1,00	15	100	100	100	25,0

La plage de linéarité doit être déterminée pour l'instrument spécifique utilisé. Il convient que le laboratoire réalise des études de stabilité pour déterminer la durée de conservation des solutions étalons et d'étalons internes.

8 Échantillonnage

8.1 Généralités

L'échantillonnage est réalisé de manière que l'échantillon d'essai du laboratoire soit représentatif de la population à soumettre à l'essai.

8.2 Préparation des échantillons

Une prise d'essai doit être préparée et analysée pour chaque échantillon d'essai.