
**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 Standards

(<https://standards.iteh.ai>)

Document Preview

[ISO 21766:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021>



iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 21766:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

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
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
7.2.1 Solution d'extraction, solution d'acétate d'ammonium à 100 mM dans l'eau	3
7.2.2 Phase mobile A de CLHP: eau, résistivité $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ à 25 °C	4
7.2.3 Phase mobile B de CLHP: acide acétique à 0,1 % dans le méthanol	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 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	16

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 brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de brevets. 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 le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

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

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO 21766:2018), dont elle constitue une révision mineure.

Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- la désignation et le numéro CAS de la NNK-d4 (voir [5.12](#)) ont été mis à jour;
- la nomenclature des nitrosamines deutérées indiquées de [5.6](#) à [5.13](#) a été harmonisée.

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 (TSNA) 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.^[2] 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, le tabac de remplissage des cigarettes et le tabac 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, le tabac de remplissage des cigarettes et le tabac de remplissage des cigares ont été déterminées via une étude collaborative internationale menée en 2017 et impliquant 18 laboratoires.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 21766:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021>

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 de déterminer l'applicabilité de toute autre restriction avant son utilisation.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de quantification de quatre nitrosamines spécifiques du tabac (TSNA) 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 TSNA dosées 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:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

nitrosamines spécifiques du tabac

TSNA

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

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 TSNA dans les produits du tabac sont rapportés en ng/g, en l'état, de même que la masse humide.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue pendant l'analyse. Les solvants doivent être de qualité 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 CLHP ou supérieure.
- 5.3 **Méthanol**, de qualité CLHP ou supérieure.
- 5.4 **Acétate d'ammonium**, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.5 **Acide acétique**, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.6 **N-Nitrosoanabasine (NAB)**, numéro CAS 1133-64-8, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.7 **N-Nitrosoanatabine (NAT)**, numéro CAS 71267-22-6, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.8 **4-(N-méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)**, numéro CAS 64091-91-4, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.9 **N-Nitrosornicotine (NNN)**, numéro CAS 80508-23-2, $w \geq 98 \%$ (fraction massique).
- 5.10 **N-Nitrosoanabasine deutérée (NAB-d4)**, numéro CAS 1020719-68-9, $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.
- 5.11 **N-Nitrosoanatabine deutérée (NAT-d4)**, numéro 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)**, numéro CAS 764661-24-7, $w \geq 98 \%$, d'une pureté isotopique $w \geq 99 \%$.
- 5.13 **N-Nitrosornicotine deutérée (NNN-d4)**, numéro 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 **Passeur 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 (ambrés).**
- 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).

7 Préparation

7.1 Préparation de la verrerie

[ISO 21766:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/0dfae40e-c98e-4f3c-86bf-621bcd1818ec/iso-21766-2021)

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.

1) La colonne Waters XTerra® MS C18, 2,5 µm, 2,1 × 50 mm a été jugée adaptée. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. 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.

7.2.2 Phase mobile A de CLHP: eau, résistivité $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ à 25 °C

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

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 µg/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 µg/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 µg/ml.

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

Transférer 4,00 ml 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 µg/ml de NNN, de NNK et de NAT et d'environ 10 µg/ml de NAB.