

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6679:2008

ISO 10315:2000

Xuất bản lần 2

**THUỐC LÁ – XÁC ĐỊNH NICOTIN
TRONG PHẦN NGỨNG TỤ CỦA KHÓI THUỐC –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ**

*Cigarettes – Determination of nicotine in smoke condensates
Gas chromatographic method*

Lời nói đầu

TCVN 6679:2008 thay thế TCVN 6679:2000;

TCVN 6679:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 10315:2000, định
chính kỹ thuật 1:2000;

TCVN 6679:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC 126 *Thuốc
lá và sản phẩm thuốc lá* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thuốc lá Xác định nicotin trong phần ngưng tụ của khói thuốc

Phương pháp sắc ký khí

Cigarettes – Determination of nicotine in smoke condensates

Gas chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định nicotin trong phần ngưng tụ khói thuốc lá bằng sắc ký khí. Việc hút thuốc và thu lấy lượng khói chính thống thường được tiến hành theo TCVN 6680 (ISO 4387). Tuy nhiên, phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng để xác định nicotin trong phần ngưng tụ của khói thuốc lá thu được bằng phương pháp phi tiêu chuẩn.

CHÚ THÍCH Ở những nước không có điều kiện sử dụng phương pháp sắc ký khí thì tham khảo TCVN 7098 (ISO 3400) để xác định hàm lượng nicotin alkaloid tổng số. Trong những trường hợp này, các giá trị thu được bằng phương pháp mô tả trong TCVN 7098 (ISO 3400) phải kèm theo chú thích trong biểu thị kết quả.

2 Tài liệu viện dẫn

các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6680 (ISO 4387), Thuốc lá điếu – Xác định tổng hàm lượng chất hạt và chất hạt khô không chứa nicotin bằng máy hút thuốc phân tích thông thường.

TCVN 6681 (ISO 13276), Thuốc lá và sản phẩm thuốc lá – Xác định độ tinh khiết của nicotin – Phương pháp khối lượng sử dụng axit tungstosilicic.

3 Nguyên tắc

Hoà tan vào trong dung môi chứa chất chuẩn nội phần khói ngưng tụ từ lượng khói chính. Xác định hàm lượng nicotin của một phần dung dịch bằng phương pháp sắc ký khí và tính hàm lượng nicotin trong toàn bộ phần ngưng tụ của khói thuốc.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích

4.1 Khí mang: Heli hoặc nitơ có độ tinh khiết cao.

4.2 Khí phụ trợ: Không khí và hydro có độ tinh khiết cao dùng cho detector ion hóa ngọn lửa.

4.3 Propan-2-ol, có hàm lượng nước tối đa 1,0 mg/ml

4.4 Chất chuẩn nội: *n*-heptadecan hoặc quinaldin (độ tinh khiết ít nhất 99 %).

Có thể sử dụng carvon, *n*-octadecan hoặc các chất chuẩn nội thích hợp sau khi đánh giá độ tinh khiết và xác định chất chuẩn nội không cùng giải hấp với các hợp chất khác trong dịch chiết khói. Diện tích pic của chất chuẩn nội trên mẫu phải được kiểm soát về sự ổn định. Trong trường hợp thay không ổn định, cần thực hiện phép phân tích dịch chiết mẫu khói thuốc không có chất chuẩn nội trong dung dịch chiết để khẳng định sự không có mặt của pic trong dịch rửa giải chất chiết khói ở cùng một thời điểm như chất chuẩn nội (xem điều 9).

4.5 Dung môi chiết: propan-2-ol (4.3) chứa nồng độ chất chuẩn nội phù hợp (4.4) thông thường trong dải nồng độ từ 0,2 mg/ml đến 0,5 mg/ml.

Dung môi không được bảo quản trong phòng thử nghiệm kiểm soát nhiệt độ thì phải được đưa về nhiệt độ cân bằng $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi sử dụng

4.6 Chất đối chứng: nicotin đã biết độ tinh khiết và phù hợp với TCVN 6681 (ISO 13276)

Bảo quản chất đối chứng này ở nhiệt độ từ 0 °C đến 4 °C và tránh ánh sáng

Cũng có thể sử dụng nicotin salixylat đã biết độ tinh khiết và phù hợp với TCVN 6681 (ISO 13276)

4.7 Dung dịch hiệu chuẩn

Hòa tan nicotin (4.6) trong dung môi (4.5) thành một dãy ít nhất bốn dung dịch hiệu chuẩn có nồng độ bao trùm dải nồng độ dự kiến tìm trong phần mẫu thử (thông thường từ 0,02 mg/ml đến 2,0 mg/ml). Bảo quản các dung dịch này ở nhiệt độ từ 0 °C đến 4 °C và tránh ánh sáng.

Các dung dịch và dung môi được bảo quản ở nhiệt độ thấp phải được đưa về nhiệt độ $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau

5.1 Máy sắc ký khí: có trang bị detector ion hóa ngọn lửa, máy ghi và tích phân kế hoặc các thiết bị xử lý dữ liệu khác phù hợp (xem điều 9)

5.2 Cột: có đường kính trong từ 2 mm đến 4 mm và độ dài tối nhất từ 1,5 m đến 2 m

Cột tốt nhất được làm bằng thủy tinh nhưng cũng có thể sử dụng các vật liệu khác như thép không gỉ trợ ve mặt hoá học hoặc niken. Pha tinh: 10 % PEG 20 000 cộng với 2 % kali hydroxit tẩm trên chất mang đã được silan hóa và qua rửa axit, cỡ hạt từ 150 μm (100 mesh) đến 190 μm (80 mesh) (xem điều 9).

6 Cách tiến hành

6.1 Phần mẫu thử

Chuẩn bị phần mẫu thử bằng cách hòa tan phần ngưng tụ của khói thu được bằng cách cho hút bằng máy một lượng điều thuốc đã biết trước vào thể tích dung môi không đổi, 20 ml dung môi (4.5) đối với đĩa 44 mm hoặc 50 ml đối với đĩa 92 mm, đảm bảo rằng đĩa được phủ đầy mẫu thử. Thể tích có thể điều chỉnh để có được nồng độ nicotin phù hợp nằm trong đường hiệu chuẩn (xem 6.3) với điều kiện là lượng điều thuốc phải đủ cho việc chiết phần ngưng tụ khói hiệu quả. Việc phân tích phải được thực hiện càng sớm càng tốt nhưng nếu bảo quản thì mẫu thường được bảo quản ở 0 °C đến 4 °C và tránh ánh sáng. Về phương pháp hút chuẩn, xem TCVN 6680 (ISO 4387).

6.2 Cài đặt thiết bị

Lắp đặt thiết bị và vận hành máy sắc ký khí (5.1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phải đảm bảo pic của dung môi, chất chuẩn nội, nicotin và pic của các thành phần khói khác, đặc biệt là neophytadien (trong một số tình huống nhất định pic của nicotin có thể bị yếu đi) phải được tách tốt.

Các điều kiện vận hành thích hợp là

- nhiệt độ cột, 170 °C (đẳng nhiệt),
- nhiệt độ bơm, 250 °C;
- nhiệt độ detector, 250 °C;
- khí mang, heli hoặc nitơ với tốc độ dòng khoảng 30 ml/min;
- thể tích bơm, 2 μl

Với các điều kiện trên, thời gian phân tích vào khoảng từ 6 min đến 8 min (xem điều 9).

6.3 Hiệu chuẩn sắc ký khí

Bơm một lượng (2 μl) từng dung dịch hiệu chuẩn (4.7) vào sắc ký khí. Ghi lại diện tích (hay chiều cao) pic của nicotin và chất chuẩn nội. Tiến hành xác định ít nhất hai lần.

TCVN 6679:2008

Tính tỷ lệ diện tích (hay chiều cao) pic của nicotin và chất chuẩn nội của từng dung dịch hiệu chuẩn. Và đồ thị của nồng độ nicotin theo tỷ lệ diện tích hoặc tính phương trình hồi qui tuyến tính (nồng độ nicotin theo tỷ lệ diện tích) từ các dữ liệu này. Đồ thị phải tuyến tính và đường thẳng hồi qui phải đi qua gốc toạ độ. Sử dụng độ dốc của phương trình hồi qui.

Thực hiện qui trình hiệu chuẩn đầy đủ này hàng ngày. Ngoài ra, cứ sau 20 lần bơm mẫu lại bơm một lần chuẩn có nồng độ ở khoảng giữa. Nếu nồng độ đã tính của dung dịch này khác với giá trị ban đầu quá 3 % thì phải lặp lại quy trình hiệu chuẩn đầy đủ.

6.4 Xác định

Bơm một lượng (2 μ l) phần mẫu thử (6.1) vào sắc ký khí. Tính tỷ lệ pic của nicotin/pic chuẩn nội từ dữ liệu diện tích pic (hoặc chiều cao pic).

Tiến hành hai lần xác định trên cùng một phần mẫu thử (6.1).

Tính giá trị trung bình từ hai lần xác định.

Khi các kết quả thu được từ số lượng kênh hút riêng rẽ và sử dụng bộ lấy mẫu tự động thì phần mẫu đơn lẻ từ bẫy khói được coi là đầy đủ.

7 Biểu thị kết quả

Sử dụng đồ thị hoặc phương trình hồi qui tuyến tính ở 6.3 để tính nồng độ nicotin trong phần mẫu thử. Từ nồng độ của nicotin trong phần mẫu thử này tính được lượng nicotin trong phần ngưng tụ khói thuốc. Chia lượng nicotin này cho số điều thuốc đã hút. Biểu thị kết quả thử nghiệm bằng milligam trên điều thuốc, m_i , đối với mỗi kênh, chính xác đến 0,01 mg và giá trị trung bình trên điều thuốc chính xác đến 0,1 mg.

8 Độ lặp lại và độ tái lập

Một nghiên cứu cộng tác liên phòng thử nghiệm quốc tế, gồm 30 phòng thử nghiệm tham gia và 6 mẫu đã được thử nghiệm, tiến hành năm 1990, cho thấy khi các điều thuốc được hút theo TCVN 6680 (ISO 4387) và dung dịch khói thuốc được phân tích theo phương pháp này thu được các giá trị về độ lặp lại (r) và độ tái lập (R) dưới đây.

Chênh lệch giữa hai kết quả đơn lẻ thu được trên các mẫu thuốc là điều đã được đánh dấu, do cùng một người thao tác, sử dụng cùng một thiết bị trong khoảng thời gian ngắn nhất, không được vượt quá giới hạn lặp lại (r) trung bình không quá một trong 20 trường hợp xác định thông thường và thao tác chính xác phương pháp.

Chênh lệch giữa các kết quả đơn lẻ thu được trên các mẫu thuốc lá điều đã được đánh dấu của hai phòng thử nghiệm không được vượt quá giới hạn tái lập (R) trung bình không quá một trong 20 trường hợp xác định thông thường và thao tác chính xác phương pháp.

Dữ liệu phân tích đã cho kết quả đánh giá tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1 – Kết quả ước tính bằng phân tích dữ liệu

Giá trị trung bình m_N mg trên điều thuốc	Độ lặp lại r mg trên điều thuốc	Độ tái lập R mg trên điều thuốc
0,091	0,040	0,069
0,179	0,046	0,069
0,326	0,050	0,076
0,673	0,077	0,109
0,835	0,079	0,142
1,412	0,107	0,195

Để tính r và R , một kết quả thử nghiệm đã được xác định theo hàm lượng trung bình thu được khi hút 20 điều thuốc trong một phép thử đơn lẻ.

Chi tiết hơn về sự tương tác giữa r và R với các yếu tố khác, xem Báo cáo 91/1 của CORESTA.

Đối tượng của dung sai liên quan đến lấy mẫu được nêu trong TCVN 6684 (ISO 8243).

9 Qui trình sắc ký khí thay thế và chú ý khi phân tích

9.1 Yêu cầu chung

Các cột sắc ký khí thay thế, cột nhồi và cột mao dẫn phải cho thấy phù hợp với phép xác định nicotin trong phần ngưng tụ của khói thuốc. Nếu sử dụng các dụng cụ này, cần đảm bảo rằng pic của nicotin, chất chuẩn nội phải được tách tốt khỏi các pic của các thành phần khói khác và dung môi.

Tham khảo dữ liệu trong điều 8 đối với cột đối chứng; không sẵn có dữ liệu thích hợp cho quy trình thay thế.

9.2 Cột thay thế

9.2.1 Cột nhồi

Có thể sử dụng pha tĩnh sau đây thay cho pha tĩnh mô tả trong 5.2:

- 2 % Versamid 900¹⁾ cộng với 1 % kali hydroxit, hoặc
- 7 % PEG 20 000 cộng với 3 % polyphenyl ete (6 vòng), hoặc
- nap PEG 20 000 mức thấp hơn (có hoặc không có kali hydroxit)

9.2.2 Cột mao dẫn

Cột mao dẫn silica nóng chảy (0,2 mm đến 0,53 mm ID) có bề dày màng bằng hoặc nhỏ hơn 1 µm, có khả năng phân tích các hợp chất có tính phân cực có thể được sử dụng.

Pha tinh đã khử hoạt tính poly(etylen glycol) ví dụ như CAM (Kỹ thuật J & W), Carbowax-amin (Supelco)¹⁾, Stabilowax-DB (Restek)¹⁾ và CP WAX-51 (Chrompack)¹⁾ cho dữ liệu tương tự như PEG 20 000 công với cột nhồi kali hydroxit trong 9.2.1

9.3 Hệ thống bơm

Các cột thay thế được mô tả trong 9.2.1 và 9.2.2 cần sử dụng hệ thống bơm. Các điều kiện vận hành phù hợp có thể thay đổi phụ thuộc vào loại cột được sử dụng và có thể cần theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phải cài đặt nhiệt độ tủ sấy đẳng nhiệt hoặc chương trình nhiệt độ tủ sấy, thời gian lưu giữ, khí mang, tốc độ dòng và tỷ lệ chia dòng đối với loại cột mao dẫn đã được sử dụng. Ví dụ đối với cột mao dẫn có bề dày màng 15 m, 0.32 mm ID, 0,25 µm, các điều kiện điển hình có thể như sau:

- nhiệt độ lò sấy: 160 °C (lưu giữ 4,5 min) lên đến 200 °C với tốc độ 30 °C/min (lưu giữ 1,5 min);
- khí mang: khí heli ở tốc độ dòng khoảng 25 mm/s;
- tỷ lệ chia dòng: 20:1.

Sử dụng các điều kiện trên, thì thời gian phân tích khoảng từ 7 min đến 8 min

9.4 Chất chuẩn nội thay thế

Chất chuẩn nội thay thế cũng được đánh giá. Các chất này là carvon, quinaldin và *n*-octadecan. Các chất này có thể được sử dụng sau khi đánh giá và kiểm tra độ tinh khiết để đảm bảo rằng chúng không cùng rửa giải với các thành phần khác trong chất chiết khói sẽ được phân tích. Diện tích pic của chất chuẩn nội trên mẫu phải được kiểm soát ổn định.

Khi thấy không ổn định, phải tiến hành phân tích mẫu khói thuốc không chứa chất chuẩn nội trong dịch chiết để khẳng định sự không có mặt của pic trong dịch rửa giải chất chiết khói ở cùng thời điểm như chất chuẩn nội.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin về hàm lượng của nicotin trong một điếu thuốc đã hút, phương pháp đã sử dụng, các điều kiện có thể ảnh hưởng đến kết quả (như: áp suất khí quyển trong khi hút). Báo cáo thử nghiệm cũng phải đầy đủ các chi tiết để nhận biết thuốc là đã hút.

¹⁾ Đây là tên thương mại các ví dụ về sản phẩm bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn của ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này

Phụ lục A

(tham khảo)

Sử dụng phương pháp này với việc xác định hàm lượng nước bằng sắc ký

Sử dụng phương pháp này kết hợp hoặc đồng thời với phương pháp xác định hàm lượng nước bằng sắc ký khí trong phần ngưng tụ khói thuốc được qui định trong TCVN 6936-1 (ISO 10362-1). Có thể tiến hành như sau:

- thêm một lượng thích hợp chất chuẩn nội, phù hợp cho việc xác định nước vào dung môi đã mô tả trong 4.5;
- tốt nhất nên sử dụng heli làm khí mang;

bơm một lượng dung dịch ngưng tụ của khói thuốc vào cột dùng để phân tích nước, đã được nối với detector dẫn nhiệt, cũng như vào cột phân tích nicotin và detector đã mô tả trong phương pháp này.

Việc phân tích tự động, đồng thời nicotin và nước có thể đạt được bằng cách sử dụng hệ thống chia dòng hoặc hệ thống bơm mẫu tự động với hai điểm bơm. Khi xác định tuần tự-nicotin và nước từ cùng một mẫu, tiến hành phân tích nước trước để tránh hấp thụ nước vào mẫu làm ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7096 (ISO 3308), Máy hút thuốc lá phân tích thông dụng – Định nghĩa và các điều kiện chuẩn.
 - [2] TCVN 7098 (ISO 3400), Thuốc lá điếu – Xác định alkaloit trong phần ngưng tụ khói – Phương pháp đo phổ
 - [3] TCVN 5078 (ISO 3402), Thuốc lá và các sản phẩm thuốc lá – Môi trường bảo ôn và thử nghiệm.
 - [4] TCVN 6680 (ISO 4387), Thuốc lá điếu – Xác định tổng hàm lượng chất hạt và chất hạt khô không chứa nicotin bằng máy hút thuốc phân tích thông thường
 - [5] TCVN 6684 (ISO 8243), Thuốc lá điếu – Lấy mẫu.
 - [6] TCVN 6936 -1 (ISO 10362-1), Thuốc lá điếu – Xác định hàm lượng nước trong phần ngưng tụ khói - Phần 1: Phương pháp sắc ký khí.
 - [7] CORESTA, Report 91/1, information bulletin of cooperation centre for scientific research relative to tobacco, 1991-1 (ISSN-0525-6240).
-