

Sur un traitement du tabac en vue de diminuer la teneur en hydrocarbures polycycliques de la fumée de cigarettes

Par P. Waltz et M. Häusermann¹

Résumé

Du tabac Maryland coupé a été extrait avec du chlorure de méthylène. 2,8% de matières extractibles, dont 0,51% de paraffines, ont été enlevés. Des cigarettes sans filtre rigoureusement semblables ont été fabriquées avec du tabac témoin et du tabac traité. Dans la fumée des cigarettes non traitées, il a été trouvé 28,8 mg de condensat de fumée brut par cigarette, 1,67 µg de 3,4-benzopyrène (B) par 100 cigarettes, 2,23 µg de B par 100 g de tabac fumé, ou une concentration de 0,58 ppm de B dans le condensat de fumée brut. Dans la fumée des cigarettes traitées, les valeurs correspondantes sont de 24,0 mg, 1,52 µg, 2,03 µg et 0,64 ppm. A la suite de l'extraction du tabac, le condensat de fumée a donc été diminué de 16,7% et le B de 9,0% sur la base d'un même nombre de cigarettes fumées, tandis que la concentration du B dans le condensat de fumée s'est accrue de 10,3%.

Ces valeurs, trouvées dans des conditions rigoureusement standardisées et avec les meilleures méthodes actuelles, montrent clairement que la préextraction du tabac avec du chlorure de méthylène ne permet pas d'obtenir une réduction spécifique du 3,4-benzopyrène dans la fumée.

La diminution obtenue par cette préextraction sur le condensat et le 3,4-benzopyrène peut être comparée à celle d'un filtre d'une efficacité faible.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirksamkeit eines patentierten Extraktionsverfahrens untersucht, das die selektive Reduktion von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen im Rauch von Zigaretten bewirken soll.

Schnitttabak einer Maryland-Mischung wurde mit Methylenchlorid nach den Angaben der Autoren durch Eintauchen behandelt, wobei 2,8% der Trockensubstanz (0,51% Paraffine) aus dem Tabak extrahiert wurden. Aus dem behandelten und einem Kontrollmuster wurden unter Standardbedingungen in allen anderen Kriterien identische Zigaretten hergestellt und anschließend auf derselben Rauchmaschine unter Standardbedingungen abgeraucht. Im Rauch der Kontrollzigaretten wurden gefunden: 28,8 mg Feuchtkondensat pro Zigarette, 1,67 µg 3,4-Benzopyren (B) pro 100 Zigaretten, 2,23 µg B pro 100 g verrauchten Tabak respektive 0,58 ppm B im Feuchtkondensat. Die Vergleichszahlen der behandelten Zigaretten sind 24,0 mg Feuchtkondensat, 1,52 µg respektive 2,03 µg respektive 0,64 ppm B. Die Tabakextraktion hat also eine Reduktion der Kondensate von 16,7%, des B von 9,0% bewirkt. Durch die Behandlung ist die Konzentration des B im Rauchkondensat um 10,3% angestiegen.

Diese Untersuchungen – unter rigoros standardisierten Bedingungen und mit den neuesten Analysemethoden durchgeführt – zeigen, daß keine selektive Reduktion des B und damit wohl aller polyzyklischen Kohlenwasserstoffe stattfindet.

Die Verminderung der Kondensatmengen und damit des B ist schwach und kann der Wirkung eines sehr schlechten Filters gleichgesetzt werden.

¹ Adresse des auteurs: Fabriques de Tabac Réunis S. A., Neuchâtel-Serrières

1. Introduction

En soumettant du tabac coupé à une extraction à chaud avec du cyclohexane, et en fumant les cigarettes fabriquées avec le tabac ainsi épuisé, *Campbell* et *Lindsay* [1] ont constaté une diminution de 55% du rendement en 3,4-benzopyrène (*B*) dans la fumée, par rapport au *B* contenu dans la fumée de cigarettes fabriquées avec du même tabac non traité (abaissement de 0,9 à 0,4 μg de *B* dans la fumée de 100 g de tabac effectivement fumé). *Neukomm* et *Bonnet* [2] ont constaté un effet analogue avec des tabacs extraits au tétrachlorure de carbone. Dans le cas de cigarettes du type Maryland, ils ont constaté une diminution de 32,5% de la fumée condensée et de 63,9% de *B* par rapport à l'unité cigarette fumée. Dans des publications postérieures [4, 5] ce même groupe de chercheurs n'a pu observer qu'une diminution de 33% de *B* et de 27% de fumée condensée en utilisant comme solvant le chlorure de méthylène, ce qui signifie que la concentration du *B* dans la fumée condensée est apparemment restée inchangée, l'effet du traitement étant limité à une réduction non sélective du condensat de fumée.

Récemment, *Matthey* [6] a publié des résultats d'analyses comparatives faites sur des cigarettes dont le tabac a subi une extraction au tétrachlorure de carbone. Pour l'exemple de cigarettes du type Maryland sans filtre, et par rapport au même nombre de cigarettes fumées, il constate une diminution des «goudrons chloroformiques» de 12% et des «goudrons totaux» de 27%, tandis que le *B* est réduit de 58%.

Les informations sont donc divergentes quant à l'effet de la préextraction du tabac sur le rendement en *B* dans la fumée. En examinant de près les publications citées, on constate des divergences entre les techniques utilisées par les différents auteurs concernant le type de tabac, le solvant, la température d'extraction, le module de la cigarette, les conditions de fumage artificiel, de piégeage et de conservation de la fumée, ainsi que de la technique analytique de dosage du *B*. Il n'est donc pas inadmissible d'attribuer les résultats divergents des différents groupes de chercheurs à des divergences dans les techniques de travail. D'autre part, une vérification des données s'impose, afin d'établir clairement l'effet d'une préextraction du tabac sur le rendement en *B* de la fumée de cigarette.

Depuis les travaux des auteurs cités, la technique du fumage artificiel a été considérablement améliorée et ses conditions paramétriques ont été standardisées sur une échelle internationale. De plus, le procédé analytique de dosage du *B* a été rendu plus rapide, plus exact et plus précis. Mettant à profit ces conditions de travail plus favorables, et vouant tous les soins au traitement du tabac ainsi qu'à la fabrication, le conditionnement et la sélection des cigarettes à fumer, nous avons répété les travaux de *Mouron et al.* et de *Matthey* pour l'exemple d'un tabac Maryland extrait avec du chlorure de méthylène.

Pour nos travaux, le catalyseur organométallique originalement préconisé par les auteurs (Brevet belge [2]) a été omis sur leurs informations. De même, le tétrachlorure de carbone – d'une toxicité élevée – a été remplacé par le chlorure de méthylène proposé par les auteurs pour une application industrielle du procédé et qui, sur la base des travaux des mêmes auteurs [4], entraîne pratiquement la même réduction du 3,4-benzopyrène dans la fumée de cigarettes pré-extraites.

2. Traitement du tabac

Dix fois 10 kg de tabac sont prélevés dans un même lot de tabac coupé Maryland. Les charges sont numérotées de 1 à 10, et l'humidité et la nicotine déter-

Charge No	% H ₂ O	% Nicotine	Matières extraites au CH ₂ Cl ₂	Paraffines
	avant traitement	avant ¹	% ²	% ²
1	15,6	1,31	4,22	0,76
2	14,8	1,36	4,53	0,90
3	15,2	1,31	4,39	0,65
4	15,4	1,35	4,38	0,90
5	15,3	1,27	4,75	0,74
Moyenne 1 à 5: non traité	15,3	1,32	4,5	0,79
6	15,7	1,28	1,78	0,31
7	15,5	1,28	1,92	0,25
8	15,5	1,28	—	—
9	15,5	1,31	1,41	0,13
10	15,0	1,30	1,68	0,22
Moyenne 6 à 10: traité	15,4	1,29	1,7	0,23
Rendement du traitement (%)			62	75
¹ Moyenne de trois déterminations				
² Procédé sous Annexe I				

Tableau 1 Contrôle analytique du traitement

minées sur 3 échantillons prélevés dans chaque charge. Les charges 6 à 10, destinées à l'extraction, sont portées à une humidité de 18% par conservation dans un climat humide. Chacune des charges 6 à 10 est ensuite traitée comme suit:

Enfermée dans une cage en treillis métallique fin, elle est immergée complètement dans une cuve contenant 75 litres de chlorure de méthylène. Pendant 30 minutes d'immersion, la cage est retirée dix fois du solvant. Le tabac est rincé trois fois 10 minutes dans 3 bains consécutifs, contenant chacun 65 litres de chlorure de méthylène. On laisse égoutter le solvant et élimine le solvant supplémentaire dans uneessoreuse centrifuge. Le tabac est ensuite étendu en plein air, sur des toiles propres, et retourné fréquemment afin d'accélérer l'évaporation du solvant. On pulvérise ensuite de l'eau sur le tabac et l'étend en couche mince dans une salle climatisée à 20° et 70% d'humidité relative. Avant la fabrication des cigarettes, qui a lieu deux jours après le traitement, le tabac des charges 6 à 10 est mélangé et conditionné à une teneur d'eau de 15%.

L'homogénéité du traitement est vérifiée par des dosages de nicotine et par une extraction-test sur chaque charge. Le Tableau 1 résume les résultats de ce contrôle.

L'efficacité du traitement par extraction est donc de 62% sur les matières extractibles totales et de 75% sur les paraffines extractibles, le témoin « extractibilité 100% » étant défini par un procédé empirique d'extraction au laboratoire. Par rapport au tabac témoin, le tabac traité contient 2,8% de produits extraits en moins, ce qui correspond à la limite d'extractibilité indiquée par Mouron et al. [4].

3. Fabrication des cigarettes

Le tabac traité présente la particularité d'être plus rigide que le tabac avant extraction. On dit que son « pouvoir de remplissage » est plus grand. Cela se traduit par des cigarettes plus légères à dureté égale. Lors de la fabrication des cigarettes, nous avons veillé à ce facteur, afin d'obtenir le même poids moyen dans les cigarettes témoins et traitées. Environ 20000 cigarettes ont été fabriquées avec chaque type de tabac.

Propriétés physiques des cigarettes: sans filtre, longueur 85 mm, diamètre 8,0 mm, poids moyen 1080 mg, poids net du tabac 1026 mg, humidité moyenne du tabac 12,2%, résistance à l'air 75 mm CE (cig. témoins) et 70 mm CE (cig. traitées).

Teneur en nicotine (% alcaloïdes totaux sur tabac anhydre): $1,26 \pm 0,05\%$ (18 dosages) dans les cigarettes témoins et $0,85 \pm 0,08\%$ (65 dosages) dans les cigarettes à tabac traité. Les prises d'échantillon ont été effectuées au hasard dans le lot entier de cigarettes. La teneur en nicotine des deux tabacs est d'une constance remarquable si l'on considère que des limites d'erreur de

$\pm 0,03\%$ (95%) doivent être attribuées à la méthode analytique elle-même; la régularité du traitement du tabac est donc assurée entre les charges 6 à 10. *A la suite du traitement, le tabac a perdu 33% de sa nicotine originale.* A titre de comparaison, nous mentionnons les 16% de diminution constatés par *Matthey* [6] après l'extraction de tabac Maryland avec du tétrachlorure de carbone.

4. Fumage des cigarettes

Après un conditionnement de 2 semaines dans un climat de 20° et de 60% d'humidité relative, les cigarettes sont sélectionnées d'après leur poids. Pour tous les fumages des cigarettes témoins et traitées, le poids total d'une cigarette est compris entre 1060 et 1100 mg (% H₂O du tabac 12,2%), poids moyen 1080 mg ou 1026 mg de tabac net, ce qui correspond à 749 mg de tabac réellement fumé pour une longueur de mégot de 23 mm.

Conditions paramétriques du fumage: l'aspiration de 2 secondes de durée toutes les 60 secondes, d'un volume de 35 ml. La cigarette est consommée jusqu'à 23 mm de longueur de mégot. (*Matthey* [6] fait une aspiration toutes les 15 secondes et laisse un mégot de 20 mm.)

Machine à fumer: machine décrite par *Waltz et al.* [8] permettant le fumage simultané de 10 cigarettes portées alternativement devant le piège électrostatique. Ce dernier, d'un volume de 80 ml, est opéré sous une tension de 18 kV.

Pour un essai, cette machine a été remplacée par un dispositif à fumage multiple (30 cigarettes sont portées alternativement devant le piège)¹ combinée avec un piège à solvant vibré, selon *Barkemeyer et Seehofer* [9]. L'intention était de comparer les rendements en *B* obtenus avec les deux systèmes fon-

	Cigarettes à tabac témoin	Cigarettes à tabac traité	Cigarettes à tabac traité % diminution
mg de tabac fumé par cigarette	749	749	
Nombre de bouffées par cigarette	8,7	9,0	
mg de condensat total anh. par cigarette	26,7	22,2	17
mg de nicotine-fumée par cigarette	1,78	1,15	35

Tableau 2 Fumages témoins (moyennes sur deux fois 10 cigarettes par type)

¹ Fabricant: Heinrich Borgwaldt, Friesenweg 4, Hamburg-Bahrenfeld

damentalement différents de fumage et de piégeage, et d'obtenir la certitude que le piégeage électrostatique n'altère pas le *B*.

Fumages témoins: deux fois 10 cigarettes des deux types ont été fumées dans les conditions standard, afin de déterminer leurs rendements en condensat total anhydre et en nicotine-fumée (Tableau 2).

A la suite de l'extraction du tabac avec du chlorure de méthylène, le condensat total anhydre a été diminué de 17% (*Matthey* [6] observe une diminution de 12% sur les «goudrons chloroformiques» et de 27% sur les «goudrons totaux», ces derniers n'étant toutefois pas comparables à notre condensat total anhydre) et la nicotine-fumée de 35%, donc dans la même mesure que la nicotine-tabac (*Matthey* [6] fait la même constatation).

5. Dosage du 3,4-benzopyrène (*B*)

La fumée provenant du fumage de 150 à 200 cigarettes, déposée dans 15 à 20 pièges électrostatiques, est extraite avec un volume minimum d'un mélange froid d'éthanol et d'hexane (2 : 1); lorsque le piège à solvant est employé, la fumée est directement condensée dans ce mélange. Le volume total de la solution est de 200 à 250 ml.

Elle est immédiatement soumise à une série d'opérations de partage entre phases liquides non miscibles et de chromatographie sur colonne, en vue de séparer le *B* des autres corps présents dans la fumée particulaire et de le purifier pour le dosage spectrophotométrique. A l'exception de quelques modifications (en particulier, la localisation du *B* dans les fractions chromatographiques sur chromatoplaques), nous avons suivi le procédé analytique élaboré par les Laboratoires du S.E.I.T.A. [7]. Ce procédé consiste en quatre opérations:

- a) Partage entre hexane et éthanol-eau.
- b) Chromatographie sur gel de silice.
- c) Chromatographie sur poudre de cellulose acétylée.
- d) Dosage spectrophotométrique.

a) Partage entre hexane et éthanol-eau

Pour un volume de la solution de fumée de 210 ml, ajouter 70 ml d'eau, agiter et séparer les deux phases. Laver la phase inférieure avec 60, 55, 50 et 50 ml d'hexane, réunir toutes les phases hexaniques (contenant le *B*) et les évaporer à sec dans un évaporateur rotatif, à une température ne dépassant pas 40°.

b) Chromatographie sur gel de silice

70 g de silice standardisée (Annexe 2) sont introduits dans une colonne de 2 cm de diamètre, dans une suspension d'hexane exempt de benzène (Annexe 3).

Le résidu de l'évaporation a est appliqué quantitativement sur la colonne, en utilisant un volume minimum d'hexane exempt de benzène (15 ml au maximum, tous les rinçages compris). L'élution de la colonne se fait avec 500 à 600 ml d'hexane de même qualité. On prend des fractions de 10 à 15 ml au débit de 40 à 50 ml par heure. Le *B* est élué entre 300 et 500 ml.

Il est localisé dans les fractions avec une technique de chromatographie sur couche mince (Annexe 4). Toutes les fractions contenant du *B* sont ensuite réunies et évaporées à sec.

e) Chromatographie sur poudre de cellulose acétylée

La cellulose acétylée se prête particulièrement bien à la séparation des hydrocarbures aromatiques. En utilisant le solvant éthanol-toluène-eau (17:4:1) préconisé par *Spotswood* [3], le *B* est obtenu en pureté suffisante pour le dosage spectrophotométrique après le passage sur une colonne de poudre de cellulose acétylée.

5 g de poudre de cellulose acétylée (préparation Annexe 5) sont suspendus dans le solvant éthanol-toluène-eau (17:4:1); la suspension est versée dans une colonne de 1 cm de diamètre. Après le tassement de la poudre, on obtient une couche de 22 cm de hauteur. Le résidu d'évaporation b est appliqué sur la couche avec 1 ml de mélange éthanol-toluène (17:5). Le transfert sur la colonne est rendu quantitatif par des rinçages successifs avec le solvant 17:4:1, d'un volume total ne dépassant pas 3 ml. Développement et élution de la colonne avec le solvant 17:4:1 au débit de 20 ml par heure (l'application d'une légère pression peut être nécessaire). L'avancement du *B* est suivi sous l'éclairage UV (366 m μ); la zone est d'une fluorescence violette intense, nettement détachée des autres substances fluorescentes avançant toutes plus rapidement. Le *B* quitte la colonne à partir de 50 à 55 ml d'élution; il est recueilli dans une fiole jaugée de 25 ml.

d) Dosage spectrophotométrique

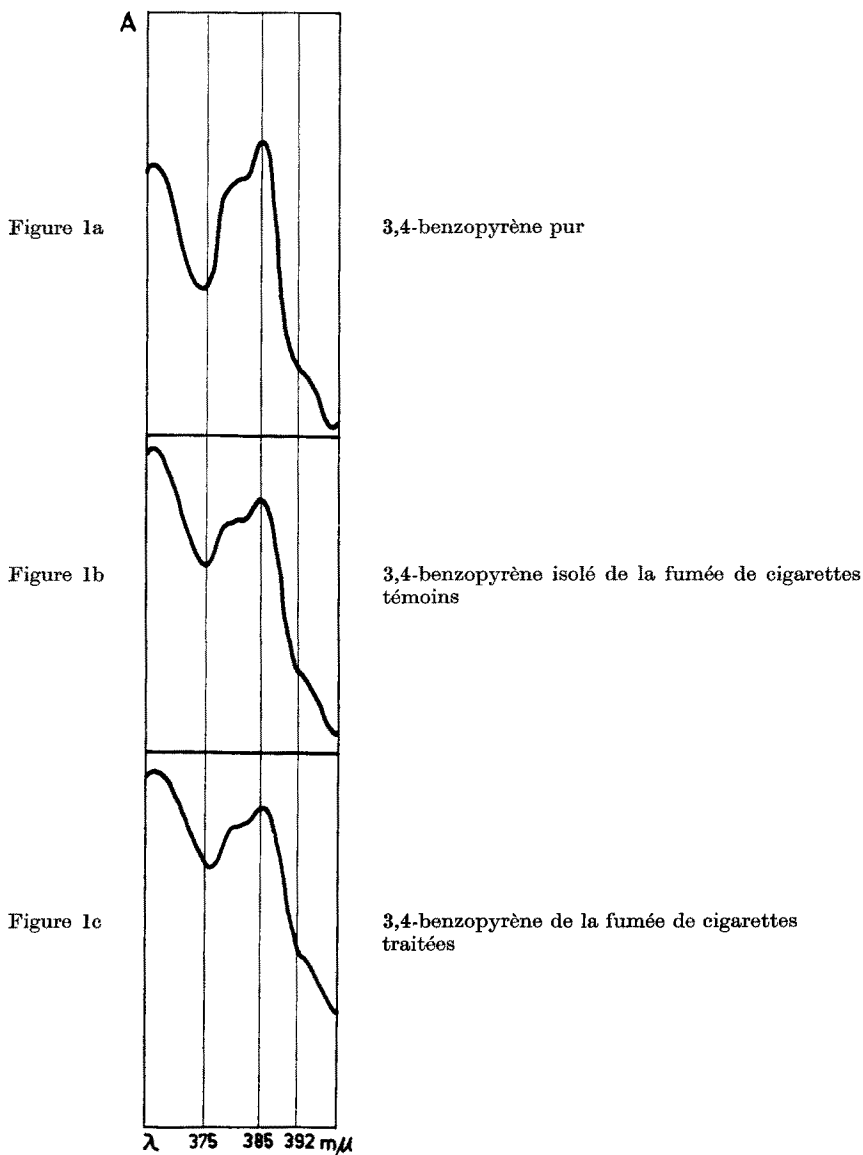
L'éluat de la chromatographie c est mélangé et versé dans une cuve de quartz de 10 cm de chemin optique. On enregistre le spectre de la solution (référence: air) entre les longueurs d'onde de 350 et 425 m μ , et on retient les absorbances à 375 (minimum), 385 (maximum) et 392 (inflexion) m μ . La hauteur nette ΔA du pic 385 m μ se calcule selon l'expression

$$\Delta A = A_{385} - \frac{7A_{375} + 10A_{392}}{17};$$

elle est proportionnelle à la concentration de *B* dans la solution de mesure. L'étalonnage avec des solutions de *B* pur donne l'expression

$$\mu\text{g de } B \text{ par ml} = 1,32 \Delta A.$$

Les Fig. 1a, b et c donnent trois spectres d'absorption trouvés avec du *B* pur, du *B* isolé de la fumée de cigarettes témoins et du *B* isolé de la fumée de cigarettes traitées.



Spectres d'absorption du 3.4-benzopyrène (*B*) (A Extinction, λ Longueur d'onde)

e) Contrôle de la méthode par surcharge

Fumer de 300 à 400 cigarettes et séparer la solution du condensat de fumée en deux parties égales. Ajouter une quantité de *B* connue (de 3 à 5 µg) à une des parties, et procéder ensuite au dosage du *B* dans chaque partie. En faisant ce contrôle avec les deux types de cigarettes, nous avons obtenu une récupération de 95% (cigarettes témoins) et de 97,5% (cigarettes traitées) du *B* ajouté. Le rendement analytique (c'est-à-dire l'exactitude) de la méthode est donc de 95% au moins. A notre connaissance, aucune autre méthode de dosage du *B* publiée jusqu'à ce jour, ne donne un aussi bon rendement. Bien que le procédé

Essai No	Nombre de cig. par essai	Nombre de bouffées par cig.	Condensat brut mg ¹		3,4-Benzopyrène dans fumée			
			Total	Par cig.	ppm	µg		
					dans cond. tot.	total	par 100 cig.	par 100 g de tabac fumé
Cigarettes témoins								
1	150	9,0	4390	29,3	0,58	2,54	1,69	2,26
2	160	8,5	4730	29,5	0,55	2,62	1,64	2,19
3	150	8,6	4210	28,1	0,60	2,53	1,68	2,24
4	150	9,0	4230	28,2	0,60	2,54	1,69	2,26
5 ²	150	8,5	—	—	—	2,46	1,64	2,19
Moyenne cigarettes témoins:				28,8	0,58	—	1,67	2,23
Cigarettes traitées								
1	200	8,4	4790	23,9	0,62	2,95	1,48	1,98
2	170	8,7	4230	24,9	0,62	2,62	1,54	2,06
3	170	8,6	3930	23,1	0,67	2,62	1,54	2,06
Moyenne cigarettes traitées:				24,0	0,64	—	1,52	2,03
% Diminution:				16,7	—	—	9,0	9,0
% Augmentation:				—	10,3	—	—	—
<p>¹ Le rendement en condensat brut (contenant de 10 à 15% d'eau) n'est pas aussi reproductible que celui en condensat anhydre. On ne constate pas moins une réduction moyenne de 16,7% en condensat brut dans les cigarettes traitées, valeur correspondant assez bien aux 17% de réduction en condensat anhydre lors des fumages témoins (Tableau 2).</p> <p>² Machine à fumer à 30 têtes, combinée avec un piège à solvant selon <i>Barkemeyer</i> et <i>Seehofer</i> [9].</p>								

Tableau 3

complet – fumage compris – puisse être exécuté en moins de deux jours, on obtient le même rendement excellent après une durée de travail de quatre jours. La reproductibilité de la méthode est d'ailleurs très bonne également pour les quantités très faibles de B en jeu ($3 \mu\text{g}$ de B au maximum par analyse).

6. Résultats

Cinq dosages ont été faits sur les cigarettes témoins et trois essais sur les cigarettes traitées. Les résultats de ces analyses sont consignés dans le Tableau 3.

7. Discussion des résultats

Du point de vue méthodique, nous retenons la bonne reproductibilité des résultats et le fait que le rendement en B ne dépend pas du type de piège à fumée. Considérant également que le rendement de la méthode analytique est de 95 % au moins, nous pouvons conclure que les résultats du Tableau 3 donnent une image fidèle de la production de B lors du fumage des cigarettes sous essai, dans des conditions rigoureusement standardisées.

Quant à la teneur absolue de B dans la fumée des *cigarettes non traitées*, une comparaison avec des valeurs communiquées par différents auteurs semble s'imposer (Tableau 4). Il est à noter toutefois qu'une comparaison directe n'est pas possible, les bases de référence étant différentes dans chaque cas: la concentration de B dans la fumée précipitée dépend de la définition de cette dernière en « condensat brut », « condensat anhydre », « goudrons totaux » ou « goudrons chloroformiques » et peut varier du simple au double selon ce choix, et la référence au nombre de cigarettes (ou au poids de tabac fumé) n'est valable que si les conditions paramétriques du fumage sont identiques. A cela s'ajoute le facteur cigarette proprement dit (type de tabac et de papier, format, etc.). Les valeurs comparatives du Tableau 4 doivent donc être interprétées avec circonspection.

Sous cette réserve, nous comparons nos valeurs à celles d'autres auteurs et de *Matthey* [6] en particulier, parce que cet auteur a examiné, parmi d'autres, des cigarettes Maryland du même type que les nôtres, et qu'il décrit les conditions de fumages de façon assez détaillée pour permettre un recoupage valable avec nos propres résultats.

Il ressort de travaux récents que la *qualité* d'un condensat de fumée – en ce qui concerne la teneur en B et certaines autres substances – ne change guère lorsque les conditions paramétriques du fumage artificiel sont modifiées dans des limites définies, tandis que sa *quantité* en dépend directement. Si l'on maintient la longueur du mégot ainsi que la durée et le volume d'une bouffée, le nombre de bouffées nécessaires pour la consommation de la cigarette ne dépend plus que de l'intervalle entre deux bouffées [10]. Dans ces conditions parti-

Type de tabac	ppm dans condensat	μg par 100 cigarettes	μg par 100 g de tabac fumé	Référence
Maryland	0,58	1,67	2,23	Ce travail
Tabac noir	—	1,7	—	S. E. I. T. A. [7]
Maryland	0,30	0,39	—	Mouron et al. [4]
Maryland	0,21	0,37	—	Mouron et al. [5]
Maryland	0,27 ¹	0,62	0,95	Matthey [6]
	0,17 ²			
Anglais	—	—	0,9	Campbell et al. [1]

¹ Dans « goudrons chloroformiques ».
² Dans « goudrons totaux ».

Tableau 4 3,4-Benzopyrène dans la fumée. Résultats comparatifs

culières, le rendement en condensat de fumée est pratiquement proportionnel au nombre de bouffées tirées par cigarette [10].

Cette condition étant approximativement remplie entre les essais de *Matthey* et les nôtres, une comparaison des résultats est possible. Fumant avec un intervalle de 60 secondes entre deux bouffées, nous trouvons, en moyenne, 8 à 9 bouffées par cigarette, tandis que *Matthey*, en choisissant un intervalle de 15 secondes, en obtient de 16 à 17 et produit, de ce fait, la quantité double de condensat de fumée et de *B* par cigarette. Or, tandis que nous déterminons 1,67 μg de *B* par cigarette (8.5 bouffées), *Matthey* n'en obtient que 0.62 μg (16.5 bouffées). Rapporté à l'unité bouffée, ceci correspond à 0.2 et 0.04 μg . *Matthey* ne détermine, selon toute vraisemblance, que le 20% environ du *B* présent dans la fumée des cigarettes Maryland *non traitées*.

Nous arrivons à la même conclusion si nous choisissons comme critère de comparaison, la concentration du *B* dans le condensat de fumée. Il est établi [10] que la masse des « goudrons chloroformiques » (*Matthey*) constitue un peu moins de 50% de la masse du condensat total brut (nos essais), tout en renfermant la totalité du *B*. La concentration de 0.27 ppm de *B* trouvée par *Matthey* dans les « goudrons chloroformiques » correspond donc à une concentration de 0,13 ppm environ dans le condensat total brut, ou aux 22% environ des 0,58 ppm que nous avons déterminé dans la fumée des cigarettes Maryland *non traitées*.

Bien que dérivée d'un recoupage nécessairement approximatif, cette divergence est trop grande pour ne pas devoir être prise en considération. Nous sommes obligés de constater que des sources d'erreur considérables – dues, soit au fumage des cigarettes, soit à la méthode de dosage du *B* – rendent incertains les résultats communiqués par *Matthey* sur les cigarettes Maryland *non traitées*.

Type de tabac Cig. sans filtre	Extract. du tabac avec	ppm dans cond.	μg par 100 cigarettes	μg par 100 g tabac	Référence
Maryland	CH_2Cl_2 froid	0,64 (+10)	1,52 (9)	2,03 (9)	Ce travail
Maryland	CH_2Cl_2 froid	0,27 (10)	0,26 (33)	—	Mouron et al. [4]
Maryland	CH_2Cl_2 + EtOH	0,14 (33)	0,18 (51)	—	Mouron et al. [5]
Maryland	CCl_4 froid	0,10 ¹ (41)	0,26 (58)	0,41 (57)	Matthey [6]
Anglais	Cyclohex. chaud	— —	— —	0,4 (56)	Campbell et al. [1]

¹ Condensat = « goudrons totaux ».

Tableau 5 3,4-Benzopyrène dans la fumée de cigarettes traitées. (Entre parenthèses: % de réduction).

Il est probable qu'un examen analogue des résultats communiqués par *Mouron* et al. [4, 5] ferait ressortir le même phénomène d'inexactitude méthodologique, car la méthode utilisée par *Matthey* a été mise au point par *Mouron* et al.

Un examen critique des résultats consignés dans le Tableau 5 sur les *cigarettes traitées* révèle le même phénomène. Toutes les valeurs communiquées par les auteurs mentionnés sont, selon toute vraisemblance, très nettement inférieures aux valeurs réelles. Considérant que la méthode utilisée par *Matthey* opère avec une perte analytique de 80% environ, il serait risqué d'attribuer une signification absolue au taux de diminution du *B* de 41% qu'il constate à la suite de la pré-extraction du tabac Maryland avec du tétrachlorure de carbone.

Nos propres essais, basés sur l'extraction du tabac avec du chlorure de méthylène, indiquent une diminution de 16,7% de condensat brut (Tableau 3) et 9% de *B* seulement (Tableau 5) par rapport à l'unité cigarette, et une augmentation de 10% de la concentration de *B* dans le condensat brut. Le traitement est donc inefficace en ce qui concerne la diminution *spécifique* du *B*. La diminution du rendement en condensat, par contre, ne justifie pas l'application technologique du procédé, car elle peut être réalisée très aisément par un filtre à cigarette d'une efficacité faible à moyenne.

8. Annexes

Annexe 1

Détermination des matières extractibles et des paraffines

25 g de tabac coupé d'une humidité de 17 à 18% sont introduits dans un ballon conique de 500 ml et couverts de 250 ml de chlorure de méthylène. Agiter toutes les 2 minutes et

filtrer après 30 minutes à travers un filtre plissé sec dans un ballon de 1000 ml. Répéter l'extraction avec 200 ml de solvant dans les mêmes conditions et filtrer dans le même ballon. Evaporer le filtrat jusqu'au volume de 25 ml environ et transvaser le résidu quantitativement dans un ballon taré de 100 ml. Evaporer à sec sur le bain-marie, en faisant passer un léger courant d'air dans le ballon, mettre le ballon sous le vide d'une trompe à eau pendant une minute, sécher au four pendant 15 minutes à 104° et laisser refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice. L'augmentation A du poids du ballon est due aux matières extraites du tabac.

Ajouter 3 ml de benzène dans le ballon pour dissoudre les matières extractibles et ajouter 50 ml de méthanol anhydre pour précipiter les paraffines. Refroidir à 5° et essorer sur un filtre taré en verre poreux, refroidi à 5° également. Sécher le filtre et le résidu par un courant d'air, et finir le séchage sur du gel de silice jusqu'à poids constant. L'augmentation B du poids du filtre est attribuée aux paraffines du tabac.

Les matières extractibles A et paraffines B sont rapportées à la masse *anhydre* du tabac mis en jeu.

Annexe 2

Préparation de la silice pour la chromatographie sur colonne

La poudre de silice du commerce, désignée «pour chromatographie» et d'une finesse de 0,15 à 0,20 mm, est couverte d'acide chlorhydrique à 20%, agitée fréquemment et laissée reposer pendant la nuit. Laver et décanter plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer les particules trop fines, essorer sur plaque de verre poreux et laver abondamment avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. Laver deux fois avec du méthanol, essorer et sécher au four à 104° jusqu'à l'élimination complète du méthanol. Réhumidification à l'air libre. La silice présente la qualité exigée lorsque 5 grammes de poudre, séchés pendant 2 heures à 104° dans une étuve à circulation d'air forcée, perdent de 10 à 11% du poids initial.

Annexe 3

Purification de l'hexane

4 litres d'hexane ordinaire (mélange de plusieurs hydrocarbures aliphatiques d'un PE de 68,8 à 69,0°) sont agités pendant 2 heures avec 400 ml d'oléum à 25% d'anhydride sulfurique. Séparer l'oléum et répéter la même opération encore trois fois avec de l'oléum frais. Séparer la couche hexane, laver à l'eau, à l'eau contenant 50 g d'hydroxide de sodium, encore deux fois à l'eau, et sécher sur du sulfate de sodium. Distiller sur une colonne à fractionner très efficace, en écartant les premiers 500 ml de distillat. Le produit pur ne doit pas contenir plus de 10 mg de benzène par litre (contrôle au spectrophotomètre: la bande d'absorption à 255 m μ du benzène ne doit pas dépasser une extinction de 0,040).

Le même procédé est applicable au cyclohexane qui peut remplacer l'hexane dans la chromatographie sur silice.

Annexe 4

Poudre de cellulose acétylée pour chromatoplaques et technique d'application de la chromatographie sur couches minces

Préparation de la poudre: dans un ballon de 3 litres à trois cols rodés, muni d'un thermomètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant descendant, introduire 370 g de poudre de cellulose («Filta-Floc Fine» de la Brown Company / Th.Christ S.A., Bâle) et 2,5 litres de benzène pur. Agiter et distiller lentement 1 litre de benzène. Compléter le volume avec 1 litre de benzène et distiller encore 600 ml. Placer le ballon dans un bain d'eau froide, remplacer le réfrigérant descendant par un réfrigérant ascendant et refroidir le contenu à 40 à 50°. Sans enlever du bain froid, introduire, en 5 à 10 minutes environ, 330 g d'anhydride acétique auquel on vient d'ajouter 2 ml d'acide perchlorique à 70%. La vitesse d'introduction doit être adaptée à la température du contenu du ballon qui,

pour des raisons de sécurité, ne doit pas atteindre le point d'ébullition. Agiter pendant trois heures à 50°, essorer la poudre sur un entonnoir de Buchner, et suspendre le gâteau dans 1 litre d'éthanol en le désintégrant avec un vibreur électromagnétique. Essorer et répéter la même opération au moins deux fois. Suspendre le gâteau dans 1,5 litres de méthanol, laisser reposer la suspension pendant plusieurs jours et décanter le liquide surnageant. La suspension tassée remplit un volume de 1,3 litres environ; elle est conservée dans un flacon bouché.

Préparer les chromatoplaques avec des portions de 50 ml environ de cette suspension, qui sont versés dans le réservoir de l'appareil utilisé (types CAMAG ou DESAGA). Les plaques couvertes sont séchées et conservées à l'air. Aucun adhésif n'est nécessaire pour la fixation de la poudre sur la plaque de verre.

Application des plaques: les fractions chromatographiques censées contenir du *B* sont évaporées par groupes de 2 à 5 tubes (30 à 75 ml). Dans le résidu (de quelques gouttes au maximum) on prélève, à l'aide d'un tube capillaire très fin, quelques μl qui sont appliqués sur le point de départ de la chromatoplaque. La plaque est développée avec le solvant éthanol-toluène-eau (17:4:1) qui avance de 10 cm en 30 minutes environ. La plaque est ensuite examinée sous une lampe UV (366 $m\mu$). Le benzopyrène se traduit par une tache de fluorescence violette d'un R_F de 0,15 à 0,20, très nettement détachée de toutes les autres substances fluorescentes. Bien que la quantité de *B* décelable sur chromatoplaque soit faible (0,01 μg est suffisant), les taches sont séparées de la plaque et le *B* récupéré par l'extraction de la poudre ainsi obtenue. Les tubes capillaires contenant du *B* sont rincés et les rinçages et extraits de poudre réunis avec les fractions contenant du *B*. Toutes les fractions sont réunies dans un même ballon et évaporées.

Annexe 5

Poudre de cellulose acétylée pour colonne

Introduire, dans un récipient de 5 litres muni d'un agitateur mécanique et d'un thermomètre, 2 litres de benzène pur et 800 ml d'anhydride acétique. Agiter le mélange et ajouter lentement 10 ml d'acide sulfurique à 98%. Chauffer le contenu à 55° et ajouter 220 g de poudre de cellulose («Filta-Floc Fine»). Agiter pendant 6 heures à 50°. Refroidir extérieurement et ajouter 400 ml d'éthanol en portions de 25 ml. Essorer sur un entonnoir de Buchner, suspendre le gâteau dans 600 ml d'éthanol et essorer l'alcool aussi complètement que possible. Répéter ce lavage trois fois au moins, étendre la poudre à l'air en couche mince et laisser évaporer le solvant. Compléter le séchage dans un évaporateur rotatif, sous un vide de 200 mm Hg poussé progressivement au vide complet, afin d'éviter l'entraînement de la poudre dans le réfrigérant. Conserver la poudre refroidie dans un récipient couvert, mais non pas fermé hermétiquement.

Références de littérature

- [1] J. M. Campbell et A. J. Lindsay, Brit. J. Cancer 10, 649-652 (1956)
- [2] S. Neukomm et J. Bonnet, Brevet belge 566664 (1958); brevet français 1219880 (1959); Deutsche Auslegeschrift 1082541 (1960)
- [3] T. M. Spotswood, J. Chromatog. 3, 101-110 (1960)
- [4] J.-C. Mouron, J. Bonnet et S. Neukomm, Oncologia 13, 271-278 (1960)
- [5] J.-C. Mouron, J. Bonnet et S. Neukomm, Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 67, 447-453 (1961)
- [6] E. Matthey, Z. Präventivmed. 6, 428-443 (1961)
- [7] S.E.I.T.A., Service des Laboratoires: Dosage de l'anthracène, du pyrène et du benzo-a-pyrène dans les condensats de fumée de cigarettes (janvier 1960 et mars 1961)
- [8] P. Waltz, M. Häusermann, E. Nyari et G. Montandon, Beitr. Tabakforsch. 1, 1-10 (1961)
- [9] H. Barkemeyer et F. Seehofer, ibid. 3, 93-96 (1961)
- [10] P. Waltz, M. Häusermann et E. Nyari, ibid. 3, 88 (1961)