

---

---

**Косметика. Аналитические методы.  
Нитрозамины: Обнаружение и  
определение содержания N-  
нитрозодиэтанолamina (NDELA) в  
косметике методом жидкостной  
хроматографии высокого  
разрешения одновременно с масс-  
спектрометрическим обнаружением  
(HPLC-MS-MS)**

*Cosmetics – Analytical methods – Nitrosamines: Detection and  
determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA in cosmetics) by  
HPLC-MS-MS*

<https://standards.iteh.ai/cosmetics-analytical-methods-nitrosamines-detection-and-determination-of-n-nitrosodiethanolamine-nde-la-in-cosmetics-by-hplc-ms-ms>  
147776522890/iso-15819-2008

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

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

ISO 15819:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a2cbcd9-c601-466b-b181-147776522a9b/iso-15819-2008>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2008

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы этого документа могут быть объектом патентных прав. Организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 15819 подготовлен Техническим Комитетом ISO/TC 217, *Косметические средства*.

[ISO 15819:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a2cbcd9-c601-466b-b181-147776522a9b/iso-15819-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a2cbcd9-c601-466b-b181-147776522a9b/iso-15819-2008>

## Введение

Воздействие на человека N-нитрозаминов может происходить из разных источников таких, как окружающая среда, продукты питания или продукты личной гигиены. В результате действия их канцерогенного потенциала на некоторые животные виды, для сохранения здоровья человека считается очень важным свести к минимуму воздействие N-нитрозаминов. Среди N-нитрозаминов, N-нитрозодизетаноламин (NDELA) признан потенциальным загрязнителем косметики.

В данном контексте разработаны несколько аналитических методов для обнаружения и определения его в косметике. Разработан анализ методом газовой хроматографии/тепловой энергии, методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) в сочетании либо с фотолизом и колориметрической оценкой, либо с определением масс-спектрометрией (MS). Этот последний метод использует передовую технологию для обеспечения максимальной специфичности в отношении NDELA, минимизирует риск артефактного образования интересующего аналита и позволяет провести точную оценку количества.

Данный аналитический метод использует жидкостную хроматографию высокого разрешения совместно с масс-спектрометрией для отделения и обнаружения на уровне следов NDELA из косметического ингредиента или матрицы продукта с максимальной специфичностью для NDELA.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 15819:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a2cbcd9-c601-466b-b181-147776522a9b/iso-15819-2008>

# Косметика. Аналитические методы. Нитрозамины: Обнаружение и определение содержания N- нитрозодиэтанолamina (NDELA) в косметике методом жидкостной хроматографии высокого разрешения одновременно с масс-спектрометрическим обнаружением (HPLC-MS-MS)

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт описывает метод обнаружения и количественного определения N-нитрозодиэтанолamina (NDELA) в косметических средствах и сырьевых материалах, применяемых в косметике.

Данный метод не применяется ни для обнаружения и/или количественного определения нитрозаминов в иных, чем NDELA, ни для обнаружения и/или количественного определения NDELA в продуктах, отличных от косметических средств или сырьевых материалов, применяемых в косметике.

Если продукт имеет возможность загрязнения либо NDELA ингредиентами, либо в результате образования NDELA составом ингредиентов, этот метод должен применяться для количественного определения NDELA. Соответственно, этот метод не следует применять для обычных типовых испытаний косметических изделий. По причине широкого разнообразия косметической продукции в данной области применения, для этого метода может потребоваться адаптация к некоторым матрицам.

Поэтому отдельно разрабатывается международный стандарт, предназначенный для альтернативных методов тестирования нитрозаминов в косметических продуктах. Могут применяться и другие методы при условии, что они проверены на способность обнаружения NDELA и подтверждены в вопросах восстановления и количественного определения аналита.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными для применения настоящего документа. Для жестких ссылок применяется только цитируемое издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 3696:1987, *Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания*

## 3 Принцип

Экстракция нитрозамина NDELA в косметических пробах выполняется водой в присутствии дейтерированного d8-NDELA, используемого в качестве внутреннего стандарта. Очистка выполняется либо с помощью экстракции в твердой фазе (очистка SPE, см. 6.3.1) с картриджем C18 или жидкость-жидкостной экстракцией с помощью дихлорметана (очистка CM, см.3.2), когда пробы не растворимы в воде. Экстракты анализируются методом HPLC-MS-MS (жидкостной хроматографии высокого разрешения одновременно с масс-спектрометрическим обнаружением).

Количественный анализ NDELA производится путем сравнения отношения ионов главных фрагментов NDELA и d8-NDELA с калибровочной кривой.

Подтверждение присутствия NDELA выполняется с помощью молекулярного иона или двух диагностических ионов.

## 4 Реактивы

Во время проведения анализа, если не заявлено иначе, используют только реактивы признанного аналитического качества и только дистиллированную воду или воду класса 1 в соответствии с ISO 3696:1987. Растворитель должен быть качества соответствующего анализу HPLC (жидкостной хроматографии высокого разрешения).

- 4.1 **Метанол** (MeOH), качество для HPLC.
- 4.2 **Этанол** (EtOH), качество для HPLC.
- 4.3 **Дихлорметан**, качество для HPLC.
- 4.4 **N-нитрозодиэтаноламин**, с известной чистотой более чем 95 %.
- 4.5 **d8-N- нитрозодиэтаноламин**, с известной чистотой более чем 95 %.
- 4.6 **Ацетат аммония** (NH<sub>4</sub>Ac), аналитического качества.
- 4.7 **Раствор ацетата аммония 1 моль/л**, получен растворением 77,08 г NH<sub>4</sub>Ac в 1,0 л воды.
- 4.8 **Элюент А: 2 ммоль NH<sub>4</sub>Ac в воде**, получен отбором 2 мл из раствора 1 моль/л NH<sub>4</sub>Ac (4.7) и разведенный до 1 л водой.
- 4.9 **Элюент В: 2 ммоль NH<sub>4</sub>Ac в 90 % MeOH/вода**, получен отбором 2 мл из раствора 1 моль/л NH<sub>4</sub>Ac (4.7) и дополнен 900 мл MeOH и 98 мл воды.

## 5 Аппаратура

Используется стандартная лабораторная посуда и оборудование с добавлением:

- 5.1 **Миксер Vortex**.
- 5.2 **Станция обработки проб**, в случае применения SPE (такая, станция обработки проб как Vacmaster<sup>®1)</sup>, IST).
- 5.3 **Центрифуга**, способная достигать не менее 20 000 G.
- 5.4 **Колонки экстракции твердой фазы**, т. н.. Bakerbond<sup>®1)</sup> C18 – 6 мл, 500 мг обращенной фазы октадецилсилана, связанного с силикагелем, 40 APD, 60 Å.
- 5.5 **Оборудование HPLC-MS-MS**, состоит из:

---

1) Vacmaster<sup>®</sup>, Bakerbond<sup>®</sup> и Spherisorb<sup>®</sup> являются примерами подходящих изделий, имеющих в продаже. Данная информация представлена для удобства пользователей настоящего международного стандарта и не является подтверждением ISO данной продукции.

**5.5.1 Аппаратура жидкостной хроматографии высокого разрешения**, состоящая из резервуара с элюентом, насоса, системы впрыскивания, процессора обработки данных, т. н. интегратора с плоттером, соединенная с тандемным масс-спектрометром, использующим ионизацию с электрическим распылением.

**5.5.2 Аналитическая разделительная колонна HPLC с обращенной фазой, C18**, т.н. Spherisorb® ODS II<sup>1)</sup> защищена предохранительной колонной, размеры для:

разделительной колонны

- длина: 150 мм
- внутренний диаметр: 4,6 мм
- размер сферических частиц: 5 мкм

предохранительной колонны

- длина: 10 мм
- внутренний диаметр: 4,6 мм
- размер сферических частиц: 5 мкм

## 6 Подготовка и сохранение проб

### 6.1 Общие положения

**ПРЕДОСТОРОЖНОСТЬ** — Большинство N-нитрозаминов являются потенциальными канцерогенами и поэтому необходимо предпринимать все возможные меры предосторожности во избежание воздействия на человека.

Все операции, включающие обращение с N-нитрозаминами или их растворами, следует проводить под соответственно вентилируемым вытяжным колпаком или в перчаточной камере

**ПРИМЕЧАНИЕ** Обычно применяемые резиновые хирургические перчатки не обеспечивают полную защиту. Их следует снимать и выбрасывать сразу же после использования и не носить в течение длительных периодов.

Следует подумать о безопасном удалении любого раствора материала, содержащего N-нитрозамины.

N-Нитрозодиэтаноламин должен храниться при отсутствии света при температуре от 2 °C до 8 °C.

Ультрафиолет UV разрушает N-нитрозамины, поэтому все растворы (эталон/экстракты) должны храниться так, чтобы предотвратить ухудшение или изменение состава.

Впрыскивание для анализа должно проводиться в течение 30 мин от приготовления экстрагируемой пробы.

### 6.2 Приготовление стандартных растворов (эталонных)

**6.2.1** Готовят исходные растворы NDELA (A), содержащие 1,016 мг/мл в этаноле и хранят их при отсутствии света при –20 °C.

**6.2.2** Готовят исходные растворы d8-NDELA (d8A) (d8A), содержащие 1,016 мг/мл в этаноле и хранят их при отсутствии света при –20 °C

**6.2.3** Готовят рабочие растворы (B, C, D, E и F) путем последовательных 10-кратных разведений раствора 1,016 мг/мл. Все растворы должны храниться при отсутствии света при температуре от 2 °C до 8 °C.

Рабочие растворы	Объем исходного или рабочего раствора	Объем воды	Окончательная концентрация	Стабильность
Рабочий раствор В	100 мкл раствора А	900 мкл	0,101 645 мг/мл	1 день
Рабочий раствор С	100 мкл раствора В	900 мкл	10,164 5 мкг/мл	1 день
Рабочий раствор D	100 мкл раствора С	900 мкл	1,016 45 мкг/мл	1 день
Рабочий раствор E	100 мкл раствора D	900 мкл	101,645 нг/мл	1 день
Рабочий раствор F	100 мкл раствора E	900 мкл	10,164 5 нг/мл	1 день

**6.2.4** Готовят рабочие растворы d8 (d8B, d8C, d8D и d8E) путем последовательных 10-кратных разведений раствора 1,016 мг/мл. Все растворы должны храниться при отсутствии света при температуре от 2 °C до 8 °C.

Рабочие растворы d8	Объем исходного или рабочего раствора	Объем воды	Окончательная концентрация	Стабильность
Рабочий раствор d8B	1 мл d8A	9 мл	0,101 645 мг/мл	1 день
Рабочий раствор d8C	1 мл d8B	9 мл	10,164 5 мкг/мл	1 день
Рабочий раствор d8D	1 мл d8C	9 мл	1,016 45 мкг/мл	1 день
Рабочий раствор d8E	1 мл d8D	9 мл	101,645 нг/мл	1 день

**6.2.5** Стандартные растворы готовят путем разведения рабочих растворов. Строится стандартная кривая от 1,0 нг/мл до 80 нг/мл. Внутренний стандарт d8-NDELA был при 20 нг/мл в каждом растворе. Все растворы должны храниться при отсутствии света при температуре от 2 °C до 8 °C.

Стандартные растворы	Объем рабочего раствора	Рабочий раствор d8E	Объем H <sub>2</sub> O	Окончательная концентрация	Stability
Стандартный раствор 1	800 мкл E	200 мкл	–	81,32 нг/мл	1 день
Стандартный раствор 2	400 мкл E	200 мкл	400 мкл	40,66 нг/мл	1 день
Стандартный раствор 3	200 мкл E	200 мкл	600 мкл	20,33 нг/мл	1 день
Стандартный раствор 4	100 мкл E	200 мкл	700 мкл	10,16 нг/мл	1 день
Стандартный раствор 5	100 мкл F	200 мкл	700 мкл	1,02 нг/мл	1 день

## 6.3 Приготовление пробы

### 6.3.1 Очистка SPE

Взвешивают около 1,0 г пробы (записывают точную массу), добавляют 400 мкл рабочего раствора d8D и доводят до 20,0 мл водой. Встряхивают в течение 15 мин. Центрифугируют в течение 10 мин при необходимости.

Кондиционируют колонну твердофазной экстракции C18 с помощью 3 мл метанола, а затем 3 мл воды с расходом потока около 3,0 мл/мин. Не позволяют колонне высохнуть.

Загружают 5 мл препарата SE сверху колонны твердофазной экстракции C18 и выбрасывают первые 3 мл раствора. Собирают следующие 2 мл (с расходом потока около 3,0 мл/мин) в пробирку.

При необходимости фильтруют собранный раствор через соответствующий фильтр.



### 6.3.2 Альтернативное приготовление пробы для не дисперсных в воде проб (очистка DCM)

Отвешивают около 0,2 г пробы (записывают точную массу) в центрифужную пробирку, добавляют 800 мкл рабочего раствора d8E и встряхивают в течение 1 мин. Добавляют 4 мл дихлорметана и встряхивают в течение 1 мин. Добавляют 3,2 мл воды и встряхивают в течение 5 мин.

Центрифугируют при 20 000 G в течение 5 мин.

Порция верхнего водного слоя используют для хроматографического анализа.

## 7 Процедура

### 7.1 Общие положения

При обоих типах приготовления проб окончательный экстракт анализируется на NDELA методом HPLC-MS-MS.

### 7.2 Условия хроматографического анализа

Мобильная фаза: Элюент А – 2 ммоль  $\text{NH}_4\text{Ac}$  в воде (4.8)

Элюент В – 2 ммоль  $\text{NH}_4\text{Ac}$  в 90 %  $\text{MeOH}$ /воде (4.9)

Градиент:

Интервал мин	% А	% В
0 – 7	70	30
7 – 10	70→0	30→100
10 – 17	0	100
17 – 20	0→70	100→30
20 – 30	70	30

Расход потока: 0,2 мл/мин

Объем впрыскивания: 20 мкл

Температура колонной печи: 30 °C

Цикл впрыскивания: Каждый цикл состоит из пяти калибровочных точек, пяти экстракций пробы и одной контрольной пробы (стандартный раствор). Не менее чем после каждых четырех циклов (20 экстракций проб) строится новая калибровочная кривая.

Окно сбора данных работает от 7 мин до 11 мин.

### 7.3 Условия LC-MS-MS (жидкостной хроматографии одновременно с масс-спектрометрическим обнаружением)

Электроспрей, положительный режим.

ПРИМЕР Соответствующие параметры для квадрупольного масс-спектрометра (такого, как QUATTRO ULTIMA®)

Установки источника

Капиллярное напряжение	3,50 кВ
Конусное напряжение	20 V
Капиллярная температура	120 °C
Температура десольватации	350 °C
Расход газа в конусе	93 л/ч (N <sub>2</sub> )
Расход газа при десольватации	398 л/ч (N <sub>2</sub> )

Установки анализатора

Разрешение для низких масс LM 1	13,5
Разрешение для высоких масс HM 1	13,5
Столкновение	8
Разрешение для низких масс LM 2	13,5
Разрешение для высоких масс HM 2	13,5
Множитель	650 V

Характеристические ионы 134,9 (M+H), 104 и 74 (дочерние ионы) идентифицируют присутствие NDELA в пробе.

Определение количества NDELA осуществляют, используя отношение интенсивности ионов двух главных фрагментов 104 (от NDELA) и 111 (от d8-NDELA).

## 8 Вычисление результатов

### 8.1 Определение значения *R*

Для каждого впрыскивания (калибровочной точки, экстракта пробы и контрольной пробы) определяется значение *R* как отношение интенсивностей между интенсивностью от ионов 104 в результате расщепления иона NDELA M+H и интенсивностью от иона 111 в результате расщепления иона d8-NDELA M+H (см. пример на Рисунке A.2).

Эти значения *R* используются для определения калибровочной кривой, а также концентрации *c*, как указано в 8.4.

### 8.2 Калибровочная кривая

Строят калибровочную кривую путем нанесения концентрации стандартных эталонов NDELA (см. 6.2.5) относительно их значения *R*.

Для количественной оценки калибровочная кривая должна иметь коэффициент корреляции более чем или равный 0,990.

### 8.3 Экспериментальные условия для достоверности измерения

Относительные интенсивности двух обнаруженных ионов (104 и 74) из приготовленных проб, выраженные как процент интенсивности самого интенсивного иона, должны соответствовать