

Première édition
2008-06-01

Version corrigée
2008-08-15

**Cosmétiques — Méthodes analytiques —
Nitrosamines: Recherche et dosage de la
N-nitrosodiéthanolamine (NDELA) dans
les produits cosmétiques par
CLHP-SM-SM**

*Cosmetics — Analytical methods — Nitrosamines: Detection and
determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by
HPLC-MS-MS*
(standards.iteh.ai)

ISO 15819:2008

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



Numéro de référence
ISO 15819:2008(F)

© ISO 2008

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15819:2008

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



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2008

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée 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.

L'ISO 15819 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

La présente version corrigée de l'ISO 15819:2008, inclut une modification du titre ainsi que quelques modifications rédactionnelles.

[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>

Introduction

L'exposition humaine aux N-nitrosamines peut se produire au contact de sources diverses présentes dans l'environnement, la nourriture ou les produits de soin personnels. Ces substances ayant montré un effet cancérigène notoire sur plusieurs espèces animales, il est reconnu qu'une restriction d'exposition aux N-nitrosamines est d'une importance primordiale pour la préservation de la santé humaine. Parmi les N-nitrosamines, il a été établi que la N-nitrosodiéthanolamine (NDELA) est un contaminant potentiel des cosmétiques.

Dans ce contexte, plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour rechercher et doser sa présence dans les cosmétiques, comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à l'analyse d'énergie thermique, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) couplée soit à une photolyse avec quantification colorimétrique soit à une détermination par spectrométrie de masse (SM). Cette dernière méthode nécessite l'usage de techniques avancées pour garantir une spécificité maximale dans la recherche de la NDELA, afin de limiter le risque de formation artefactuelle de l'analyte considéré et de permettre une quantification précise de la substance.

La présente méthode analytique emploie la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse afin de séparer et de rechercher la NDELA à l'état de trace dans un ingrédient ou dans une matrice de produit cosmétique, avec une spécificité maximale concernant la 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)

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

Cosmétiques — Méthodes analytiques — Nitrosamines: Recherche et dosage de la N-nitrosodiéthanolamine (NDELA) dans les produits cosmétiques par CLHP-SM-SM

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode de recherche et de quantification de la NDELA dans les cosmétiques et les matières premières utilisées dans les cosmétiques.

La présente méthode n'est applicable ni à la recherche et/ou à la quantification de nitrosamines autres que la NDELA, ni à la recherche et/ou à la quantification de la NDELA dans les produits autres que les cosmétiques ou les matières premières utilisées dans les cosmétiques.

Si un produit peut être contaminé par la NDELA à partir de ses ingrédients ou que la composition d'ingrédients cosmétiques peut entraîner la formation de NDELA, alors la méthode sera appliquée pour la détermination de la quantité de NDELA. Par conséquent, cette méthode ne sera pas appliquée dans les essais de routine relatifs aux produits cosmétiques. En raison du large éventail de cosmétiques considéré dans ce domaine d'application, la présente méthode pourrait nécessiter d'être adaptée à certaines matrices.

Par voie de conséquence, les Normes internationales consacrées à d'autres méthodes d'essai des nitrosamines dans les cosmétiques sont élaborées séparément. Ces méthodes peuvent être employées à condition que la recherche de NDELA ait été vérifiée et que ces méthodes soient validées en termes de récupération et de quantification de l'analyte.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

3 Principe

L'extraction de la nitrosamine NDELA dans les échantillons de cosmétiques est réalisée avec de l'eau en présence de d8-NDELA deutérée utilisée en tant qu'étalon interne. Une purification est effectuée soit par extraction en phase solide (purification SPE, voir 6.3.1) à l'aide d'une cartouche C18, soit par extraction liquide-liquide à l'aide de dichlorométhane (purification DCM, voir 6.3.2) lorsque les échantillons ne peuvent pas se disperser dans l'eau. Les extraits sont analysés par CLHP-SM-SM (chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection spectrométrique de masse).

La quantification de NDELA est réalisée par comparaison de la proportion d'ions fragments majoritaires de NDELA et de d8-NDELA à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

La confirmation de la présence de NDELA est obtenue à l'aide de l'ion moléculaire et de deux ions qualifiants.

4 Réactifs

Sauf indication contraire, n'utiliser, au cours de l'analyse, que des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou de l'eau de qualité 1, conformément à l'ISO 3696:1987. Le solvant doit être de qualité pour analyse CLHP.

- 4.1 **Méthanol** (MeOH), qualité CLHP.
- 4.2 **Éthanol** (EtOH), qualité CLHP.
- 4.3 **Dichlorométhane**, qualité CLHP.
- 4.4 **N-nitrosodiéthanolamine**, de pureté connue, supérieure à 95 %.
- 4.5 **d8-N-nitrosodiéthanolamine**, de pureté connue, supérieure à 95 %.
- 4.6 **Acétate d'ammonium** (NH₄Ac), qualité analytique.
- 4.7 **Solution d'acétate d'ammonium 1 mol/l**, préparée par dissolution de 77,08 g de NH₄Ac dans 1,0 l d'eau.
- 4.8 **Éluant A: 2 mmol de NH₄Ac dans l'eau**, préparé avec 2 ml de NH₄Ac à 1 mol/l (4.7), complété à 1,0 l avec de l'eau.
- 4.9 **Éluant B: 2 mmol de NH₄Ac dans 90 % de MeOH/eau**, préparé avec 2 ml de NH₄Ac à 1 mol/l (4.7), complété avec 900 ml de MeOH et 98 ml d'eau.

(standards.iteh.ai)

5 Appareillage

ISO 15819:2008

Utiliser une verrerie et un équipement de laboratoire normalisés, ainsi que les éléments suivants:

- 5.1 **Agitateur de type vortex.**
- 5.2 **Station de traitement d'échantillon**, pour application SPE (telle que la station de traitement d'échantillon Vacmaster^{®1)}, IST).
- 5.3 **Centrifugeuse**, pouvant atteindre au moins 20 000 G.
- 5.4 **Colonnes d'extraction en phase solide**, par exemple Bakerbond^{®1)} C18 – 6 ml, avec 500 mg d'octadécylsilane en phase inverse fixée sur gel de silice, 40 APD, 60 Å.
- 5.5 **Équipement CLHP-SM-SM** composé de
 - 5.5.1 **Chromatographe en phase liquide à haute performance**, consistant en un réservoir d'éluant, une pompe, un système d'injection, un traitement des données, par exemple un intégrateur avec traceur, couplé à un spectromètre de masse à ionisation par électrospray.

1) Vacmaster[®], Bakerbond[®] et Spherisorb[®] sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

5.5.2 Colonne analytique de séparation CLHP en phase inverse C18, par exemple Spherisorb® ODS II¹⁾ protégée par une colonne de garde dont les dimensions sont les suivantes:

colonne de séparation

- longueur: 150 mm
- diamètre interne: 4,6 mm
- taille des particules sphériques: 5 µm

colonne de garde

- longueur: 10 mm
- diamètre interne: 4,6 mm
- taille des particules sphériques: 5 µm

6 Préparation et conservation d'échantillons

6.1 Généralités

AVERTISSEMENT — La plupart des N-nitrosamines sont très cancérigènes et toutes les précautions possibles doivent donc être prises afin d'éviter l'exposition humaine à ces substances.

Il convient d'effectuer toute opération impliquant la manipulation de N-nitrosamines ou de solutions les contenant sous une hotte aspirante ventilée ou dans une boîte à gants adaptée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a2cbcd9-c601-466b-b181->

NOTE Les gants de chirurgie en latex fréquemment employés n'assurent pas une protection complète. Il convient de les retirer, de s'en débarrasser immédiatement après usage et de ne pas les porter pendant un long moment.

Il convient d'attacher de l'importance à l'élimination en toute sécurité de toute solution de produit contenant des N-nitrosamines.

La N-nitrosodiéthanolamine doit être stockée à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Les UV détériorent les N-nitrosamines; toutes les solutions contenant cette substance (étalons/extraits) doivent donc être stockées de façon à empêcher que leur composition ne se détériore et ne s'altère.

Les injections pour analyse doivent être faites dans les 30 min suivant la préparation par extraction de l'échantillon.

6.2 Préparation des étalons

6.2.1 Préparer des solutions mères (A) de NDELA contenant 1,016 mg/ml dans de l'éthanol et les stocker à l'abri de la lumière à -20 °C.

6.2.2 Préparer des solutions mères (d8A) de d8-NDELA contenant 1,016 mg/ml dans de l'éthanol et les stocker à l'abri de la lumière à -20 °C.

6.2.3 Préparer des solutions de travail (B, C, D, E et F) en les diluant successivement au dixième de la solution de 1,016 mg/ml. Toutes les solutions doivent être stockées à l'abri de la lumière à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Solutions de travail	Volume de solution mère ou de travail	Volume d'eau	Concentration finale	Stabilité
Solution de travail B	100 µl de A	900 µl	0,101 645 mg/ml	1 jour
Solution de travail C	100 µl de B	900 µl	10,164 5 µg/ml	1 jour
Solution de travail D	100 µl de C	900 µl	1,016 45 µg/ml	1 jour
Solution de travail E	100 µl de D	900 µl	101,645 ng/ml	1 jour
Solution de travail F	100 µl de E	900 µl	10,164 5 ng/ml	1 jour

6.2.4 Préparer des solutions de travail d8 (d8B, d8C, d8D et d8E) en les diluant successivement au dixième de la solution de 1,016 mg/ml. Toutes les solutions doivent être stockées à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Solutions de travail d8	Volume de solution mère ou de travail	Volume d'eau	Concentration finale	Stabilité
Solution de travail d8B	1 ml de d8A	9 ml	0,101 645 mg/ml	1 jour
Solution de travail d8C	1 ml de d8B	9 ml	10,164 5 µg/ml	1 jour
Solution de travail d8D	1 ml de d8C	9 ml	1,016 45 µg/ml	1 jour
Solution de travail d8E	1 ml de d8D	9 ml	101,645 ng/ml	1 jour

ITeh STANDARD PREVIEW

6.2.5 Préparer des solutions étalons en diluant les solutions de travail. Une courbe normalisée de 1,0 ng/ml à 80 ng/ml est réalisée. L'étalon interne de d8-NDELA était à 20 ng/ml dans chaque solution. Toutes les solutions doivent être stockées à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

ISO 15819:2008

Solutions étalons	Volume de solution de travail	Solution de travail d8E	Volume de H ₂ O	Concentration finale	Stabilité
Solution étalon 1	800 µl de E	200 µl	—	81,32 ng/ml	1 jour
Solution étalon 2	400 µl de E	200 µl	400 µl	40,66 ng/ml	1 jour
Solution étalon 3	200 µl de E	200 µl	600 µl	20,33 ng/ml	1 jour
Solution étalon 4	100 µl de E	200 µl	700 µl	10,16 ng/ml	1 jour
Solution étalon 5	100 µl de F	200 µl	700 µl	1,02 ng/ml	1 jour

6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Purification SPE

Peser environ 1,0 g d'échantillon (noter la masse exacte), ajouter 400 µl de solution de travail d8D et compléter à 20,0 ml avec de l'eau. Agiter pendant 15 min. Centrifuger pendant 10 min, si nécessaire.

Conditionner la colonne C18 d'extraction en phase solide avec 3,0 ml de méthanol puis avec 3,0 ml d'eau à un débit d'environ 3,0 ml/min. Ne pas laisser la colonne se dessécher.

Ajouter 5 ml de la préparation SE à la colonne C18 d'extraction en phase solide ci-dessus et éliminer les trois premiers millilitres de la solution. Récupérer les 2,0 ml suivants (à un débit d'environ 3,0 ml/min) dans un flacon.

Si nécessaire, filtrer la solution récupérée dans un filtre adapté.

6.3.2 Autre mode de préparation pour les échantillons non dispersibles dans l'eau (purification DCM)

Peser environ 0,2 g d'échantillon (noter la masse exacte) dans un tube à centrifuger, ajouter 800 µl de solution de travail d8E et agiter pendant 1 min. Ajouter 4 ml de dichlorométhane et agiter pendant 1 min. Ajouter 3,2 ml d'eau et agiter 5 min.

Centrifuger à 20 000 G pendant 5 min.

Une partie de la phase aqueuse supérieure est utilisée pour l'analyse chromatographique.

7 Mode opératoire

7.1 Généralités

À l'aide des deux types de préparation d'échantillon, l'extrait final est analysé pour la recherche de NDELA par CLHP-SM-SM.

7.2 Conditions chromatographiques

Phase mobile: Éluant A – NH₄Ac à 2 mmol dans l'eau (4.8)

Éluant B – NH₄Ac à 2 mmol dans 90 % de MeOH/eau (4.9)

Gradient:

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Intervalle min	% A	% B
0-7	70	30
7-10	70→0	30→100
10-17	0	100
17-20	0→70	100→30
20-30	70	30

Débit: 0,2 ml/min

Volume d'injection: 20 µl

Température du four à colonne: 30 °C

Séquence d'injection: Chaque séquence se compose de cinq points d'étalonnage, de cinq extraits d'échantillon et d'un échantillon de contrôle (solution étalon). Une nouvelle courbe d'étalonnage est réalisée au moins après chaque série de quatre séquences (20 extraits d'échantillon).

La fenêtre d'acquisition va de 7 min à 11 min.

7.3 Condition CL-SM-SM

Électrospray, mode positif.

EXEMPLE Exemples de paramètres adaptés au spectromètre de masse quadripolaire (comme le QUATTRO ULTIMA®).