
**Косметические средства.
Аналитические методы. Нитрозамины :
Обнаружение и определение N-
нитрозодиэтанолamina (NDELA) в
косметике методом жидкостной
хроматографии высокого разрешения
(HPLC), пост-колоночным фотолизом и
получением производных**

Cosmetics — Analytical methods — Nitrosamines: Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC, post-column photolysis and derivatization

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec16901-a819-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009>

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



Ссылочный номер
ISO 10130:2009(R)

© ISO 2009

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 10130:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2009

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
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Принцип	1
3 Реактивы	1
4 Аппаратура.....	2
5 Приготовление и хранение пробы	3
5.1 Общие положения	3
5.2 Приготовление эталонов	4
5.2.1 Первичный основной раствор.....	4
5.2.2 Вторичный основной раствор	4
5.2.3 Рабочие растворы.....	4
5.3 Приготовление пробы	4
5.3.1 Общие положения	4
5.3.2 Очистка SPE.....	5
5.3.3 Вариант приготовления пробы для не дисперсных в воде образцов (очистка DCM)	5
6 Процедура	5
6.1 Общие положения	5
6.2 Условия проведения хроматографии	5
6.3 Настройка реакционной системы.....	6
7 Расчет результатов	6
7.1 Калибровочная кривая.....	6
7.2 Экспериментальные условия для достоверности измерения.....	6
7.3 Расчет концентраций	6
8 Протокол испытания.....	7
Приложение А (информативное) Примеры калибровочных кривых и типичные хроматограммы	8
Приложение В (нормативное) Фотолиз и реакция нитрита с реактивом Грисса, образующая азокраситель	11
Приложение С (нормативное) Конфигурация системы пост колоночного реактора	12
Библиография.....	13

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 10130 подготовлен Техническим Комитетом ISO/TC 217, *Косметические средства*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10130:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009>

Введение

Воздействие *N*-нитрозаминов на человека может происходить из разных источников, таких как окружающая среда, продукты питания и личной гигиены. Для сохранения здоровья человека, по результатам воспринимаемого канцерогенного потенциала для некоторых видов животных, очень важным признано сведение к минимуму воздействие *N*-нитрозаминов. Среди *N*-нитрозаминов, *N*-нитрозодиэтаноламин (NDELA) признан как потенциальный загрязнитель косметических средств.

В данном контексте разработаны несколько аналитических методов для обнаружения и определения присутствия NDELA в косметических средствах. Примерами этих методов являются газовая хроматография/анализ тепловой энергии, жидкостная хроматография высокого разрешения в сочетании либо с определением масс-спектрометрией, либо с фотолизом и колориметрической квантификацией. В последнем методе используется специальная технология, обеспечивающая особенность NDELA, с целью минимизировать риск искусственного образования вещества, определяемого при анализе, и провести точное определение количества.

Данный аналитический метод использует жидкостную хроматографию высокого разрешения (HPLC) в сочетании с пост-колоночным фотолизом и получением производных с целью разделить и выявить уровни микроэлементов NDELA из косметических ингредиентов или матрицы продукта с особенностью для NDELA.

Настоящий международный стандарт ссылается на совместное исследование (Ссылка [2]) семи лабораторий, опубликованное в 2006. Критерий достоверности приведен в Ссылке [2].

ISO 10130:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009>

Косметические средства. Аналитические методы. Нитрозамины: Обнаружение и определение *N*- нитрозодиэтанолamina (NDELA) в косметике методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC), пост-колоночным фотолизом и получением производных

1 Область применения

В настоящем международном стандарте описан метод обнаружения и определения количества *N*-нитрозодиэтанолamina (NDELA) в косметических средствах и сырье, применяемом в косметике, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC), пост-колоночным фотолизом и получением производных.

Данный метод не применяется ни к обнаружению и/или определению количества нитрозаминов, отличающихся от NDELA, ни к обнаружению и/или определению NDELA в продуктах, не относящихся к косметике или к сырию, используемому в косметических средствах.

Если продукт имеет возможность либо загрязнения NDELA от ингредиентов, либо от образования NDELA из состава ингредиентов, то метод применяется для тестирования косметических продуктов и является альтернативой ISO 15819.

Данный метод не применяется к матрицам, содержащим окислительные красители.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009>

2 Принцип

Извлечение нитрозаминa NDELA из косметических проб выполняется с помощью воды. Очистка выполняется либо с применением твердофазного извлечения (очистка SPE, см. 5.3.2) с картриджем C18 либо с применением дихлорметана (очистка DCM, см. 5.3.3), если пробы не диспергируют в воде. Экстракты анализируют методом HPLC, пост колоночным фотолизом и получением производных. NDELA отделяют от косметической матрицы, применяя обратнофазную жидкостную хроматографию. *N*-нитрозная связь разрывается УФ фотолизом с образованием иона нитрита. Согласно реакции Грисса, нитритная функциональная группа диазотируется сульфаниламидом в кислой среде, а затем соединяется с *N*-(1-нафтил) этилендиамин дигидрохлоридом (NED), образуя азокраситель пурпурного цвета, который количественно определяется методом спектрофотометрии при максимальной длине волны, λ_{max} , равной 540 нм (см. Приложение B).

Присутствие NDELA может подтверждаться повторением анализа без фотолиза (тогда нитритный ион не образуется, поскольку *N*-нитрозная связь не разорвана). Отсутствие хроматографического пика во время удержания NDELA на хроматограмме подтверждает, что пик, наблюдаемый при первом анализе, соответствует NDELA.

3 Реактивы

3.1 **Метанол**, с чистотой для HPLC.

3.2 **Вода**, с чистотой для HPLC.

3.3 **Дихлорметан**, с чистотой для HPLC.

3.4 **N-Нитрозодиэтаноламин**, с известной чистотой выше 95 %. CAS No. [116-57-7].

3.5 **Ортофосфорная кислота**, 85 %, аналитической чистоты.

3.6 **Ацетат аммония**, аналитической чистоты.

3.7 **Раствор ацетата аммония**, 1 моль/л.

Растворяют 77,08 г ацетата аммония (3.6) в 1,0 л воды (3.2).

3.8 **Раствор ацетата аммония**, 0,02 моль/л.

Берут 20 мл раствора 1 моль/л-ацетата аммония (3.7) и разбавляют до 1 л водой (3.2).

3.9 **N-(1-Нафтил) этилендиамин дигидрохлорид**, с известной чистотой выше 98 %. CAS No. [1465-25-4].

Этот реактив должен быть герметизирован и храниться в темноте.

3.10 **Сульфаниламид**, с известной чистотой выше 99 %. CAS No. [63-74-1].

3.11 **Реактив Грисса**.

Растворяют 0,25 г N-(1-нафтил) этилендиамин дигидрохлорида (3.9) в воде (3.2) и разбавляют до 250 мл в мерной колбе. Растворяют 4,0 г сульфаниламида (3.10) в 250 мл 5 %-ого (масса/объем) водного раствора 85 %-ной ортофосфорной кислоты (3.5). Смешивают реактивы вместе в склянке из янтарного стекла и держат смесь в темноте.

Смесь может использоваться в течение пяти дней и должна оставаться в любом случае бесцветной, если она храниться при температуре от 2 °C до 8 °C.

4 Аппаратура

Используют стандартную лабораторную посуду и оборудование, а также следующее.

4.1 **Механический смеситель или миксер Vortex®** ¹⁾.

4.2 **Стеклянная пробирка высокого разрешения**, 20 мл с зоной расчерченной линиями Poly-Cone® с навинчивающимися колпачками.

4.3 **Микротрубка 1,5 мл**, для центрифугирования из полипропилена.

4.4 **Смесительный тройник с низким мертвым объемом**.

4.5 **Станция обработки пробы**, для применения SPE (такая как Vacmaster® или Visiprep®¹⁾) станции обработки проб.

4.6 **Центрифуга**, с возможностью достижения не менее 20 000 г с температурным регулированием.

4.7 **Колонны твердофазной экстракции**, т. н. Sep Pak®¹⁾ картриджи C18 Waters или Bakerbond®¹⁾ C18-6 мл, 500 мг октадецилсилана обратной фазы соединенный с силикагелем, имеющим средний диаметр частиц 40 мкм (APD), 60 Å.

1) Миксеры компаний Poly-Cone®, Vortex®, Vacmaster®, Visiprep®, Waters или Bakerbond®, Sep Pak®, Spherisorb® и Veam Boost® являются примерами подходящих изделий, имеющихся в продаже. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего международного стандарта и не является одобрением ISO этих изделий.

4.8 Жидкостной хроматограф высокого разрешения, оборудованный импульсным демпфером, резервуаром для элюирования, насосом, системой впрыскивания, системой обработки данных, т.н. интегратором, в сочетании с детектором УФ/видимого диапазона, оснащенного вольфрамовой лампой с чувствительностью 0,001 AUFS или 0,0005 AUFS (AUFS: оптических единиц полного сканирования).

4.9 Насос для подачи реактива Грисса: насос низкого давления без пульсации, либо может использоваться второй насос жидкостной хроматографии (LC) с теми же характеристиками, что и первый.

4.10 Узел фотолиза: фотохимический реактор, состоящий из реактивной катушки плетеной тефлоном PTFE "высокого давления", с внутренним диаметром 5 м или 6 м × 0,3 мм, располагающейся вокруг УФ-лампы низкого давления с излучением при 254 нм (т.н. Фотореакторы Beam Boost®¹).

4.11 Пост колоночный модуль или колонная печь, оборудованная реактивной катушкой, оплетенной тефлоном (PTFE) 1 мм, и смесительным тройником с низким мертвым объемом. Катушка свернута разнообразным образом, чтобы предотвратить расширение полосы (Ссылка [3]).

4.12 Разделительная колонна HPLC аналитической обратной фазы, C18, т.н. Spherisorb®¹ октадецилсилана (ODS) II, защищенная оградительной колонной.

Разделительная колонна

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

Оградительная колонна

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

4.13 Конфигурация пост колоночной системы реактора (см. Приложение С).

После клапана впрыскивания соединительные трубки должны быть по возможности короче

Колонна напрямую подсоединена к системе впрыскивания, которая снабжена контуром отбора пробы на 50 мкл или 100 мкл. Фотохимический реактор (1), снабженный трубчатой реактивной катушкой с открытой структурой плетения и ультрафиолетовой лампой 254 нм, подсоединен к выходу колонны. Выход фотохимического реактора соединен с одной ветвью смесительного тройника (2). Вторая ветвь тройника подсоединена к насосу с реактивом для получения производных (3). Третья ветвь подсоединена к трубчатому реактору, который состоит из плетеной тефлоновой PTFE трубки под пост колоночным модулем (4). Выход трубчатого реактора подсоединен к УФ/видимому детектору (5). Извлеченные из адсорбента пики контролируются с помощью микрокомпьютера, оснащенного пакетом программ с коммерческой интеграцией.

5 Приготовление и хранение пробы

5.1 Общие положения

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Большинство *N*-нитрозаминов является потенциальными канцерогенами и необходимо предпринять все возможные меры предосторожности во избежание воздействия на человека.

Все операции, связанные с обращением с *N*-нитрозаминами или их растворами, должны проходить в адекватно вентилируемом вытяжном шкафу или перчаточном боксе.

Часто применяемые резиновые хирургические перчатки не обеспечивают полной защиты. Их необходимо снимать и выбрасывать сразу же после использования и не носить длительные периоды времени.

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

Ультрафиолет (УФ) разлагает *N*-нитрозамины, поэтому *N*-нитрозодиэтаноламин и все растворы (эталонные/экстракты) должны храниться при отсутствии света при температуре от 2 °C до 8 °C.

Впрыскивание для анализа должно проводиться в пределах 24 ч после приготовления пробы экстракта.

5.2 Приготовление эталонов

5.2.1 Первичный основной раствор

Готовят первичный основной эталонный раствор (S_0) из NDELA, содержащий 1 мг/мл в воде. Этот раствор может храниться максимум шесть месяцев в темноте при температуре от 2 °C до 8 °C.

5.2.2 Вторичный основной раствор

Из первичного основного раствора (S_0), готовят разведение 1/100 в воде, чтобы получить вторичный основной раствор 10 мкг/мл (S_1). Вторичное разведение S_1 в отношении 1/100 выполняется для получения вторичного основного раствора (S_2) с отношением 100 нг/мл. Все эти растворы хранятся максимум одну неделю в темноте при температуре от 2 °C до 8 °C.

5.2.3 Рабочие растворы

Последовательно разводят вторичный основной раствор (S_2) водой, чтобы получить стандартные титрованные растворы 1 нг/мл, 2 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл и 20 нг/мл (см. Рис. А.1.) Эти растворы готовятся каждый день и хранятся в темноте (см. Таблицу 1).

Линейность эталонной калибровочной кривой проверяют в диапазоне от 1 нг/мл до 100 нг/мл (см. Рисунок А.2).

Типичные хроматограммы представлены на Рисунках А.3 и А.4.

Таблица 1 — Приготовление рабочих растворов

Рабочие растворы	Объем вторичного основного раствора (S_2)	Окончательный объем	Окончательная концентрация	Стабильность	Условия
Рабочий раствор W_1	100 мкл	10 мл	1 нг/мл	1 день	Хранится в темноте
Рабочий раствор W_2	200 мкл	10 мл	2 нг/мл	1 день	Хранится в темноте
Рабочий раствор W_3	500 мкл	10 мл	5 нг/мл	1 день	Хранится в темноте
Рабочий раствор W_4	1 мл	10 мл	10 нг/мл	1 день	Хранится в темноте
Рабочий раствор W_5	2 мл	10 мл	20 нг/мл	1 день	Хранится в темноте

5.3 Приготовление пробы

5.3.1 Общие положения

Когда косметический продукт является дисперсным (растворимым) в воде, необходимо проводить очистку твердофазной экстракцией (SPE) (см. 5.3.2).

Когда косметический продукт не диспергирует в воде, необходимо проводить очистку дихлорметаном (DCM) (см. 5.3.3).

В итоге, для любого косметического продукта необходимо оценить критерий его дисперсности, чтобы применить соответствующую очистку для продукта. Не следует проводить очистку SPE и очистку DCM на одном и том же продукте; соответствующая очистка должна выбираться согласно его дисперсности. Продукт не дисперсный в воде должен подвергаться очистке DCM.

5.3.2 Очистка SPE

Взвешивают около 2,0 г пробы в стеклянной пробирке (4.2) и отмечают точную массу, диспергируют и доводят до 20 мл водой. Трясут 15 мин в механическом смесителе или 1 мин в миксере Vortex®. Центрифугируют 10 мин (подготовка SPE).

Кондиционируют картридж твердофазной экстракции C18 с 3 мл метанола, а затем 3 мл воды с расходом около 3,0 мл/мин. Не позволяют картриджу высохнуть.

Загружают 5 мл препарата SPE сверху картриджа C18 твердофазной экстракции и выбрасывают первые 3 мл раствора. Собирают следующие 2 мл (с расходом около 3,0 мл/мин) в пробирку для хроматографического анализа.

При необходимости фильтруют собранный раствор через соответствующий фильтр.

5.3.3 Вариант приготовления пробы для не дисперсных в воде образцов (очистка DCM)

Взвешивают около 0,4 г пробы в стеклянной пробирке (4.2) и отмечают точную массу. Добавляют 4,0 мл дихлорметана и трясут 1 мин. Добавляют точно 4 мл воды и трясут 5 мин.

Кладут аликвотную часть верхней водной фазы в микротрубку (4.3). Центрифугируют при 20 000 г в течение 10 мин.

Впрыскивают верхний водный слой в хроматографическую систему.

6 Процедура

6.1 Общие положения

Для обоих типов приготовления проб окончательный экстракт анализируется на определение NDELA методом HPLC с применением УФ-фотолиза и реакции Грисса.

6.2 Условия проведения хроматографии

Насос LC Насос, оснащенный импульсным демпфером

Тип колонны См. 4.12

Тип оградительной колонны См. 4.12

Объем впрыскивания 50 мкл или 100 мкл

Мобильная фаза 0,02 моль/л раствора ацетата аммония (3.8)

Расход мобильной фазы 0,5 мл/мин

Расход реактива Грисса 0,5 мл/мин