

---

---

**Cosmétiques — Méthodes analytiques —  
Nitrosamines: Recherche et dosage de la  
N-nitrosodiéthanolamine (NDELA) dans  
les cosmétiques par CLHP, photolyse et  
dérivation post-colonne**

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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 10130:2009

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



**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 10130:2009

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



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2009

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction.....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Principe.....</b>	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Réactifs.....</b>	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Appareillage .....</b>	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Préparation et conservation des échantillons.....</b>	<b>4</b>
<b>5.1</b> <b>Généralités .....</b>	<b>4</b>
<b>5.2</b> <b>Préparation des étalons.....</b>	<b>4</b>
<b>5.2.1</b> <b>Solution-mère .....</b>	<b>4</b>
<b>5.2.2</b> <b>Solutions stocks.....</b>	<b>4</b>
<b>5.2.3</b> <b>Solutions de travail .....</b>	<b>4</b>
<b>5.3</b> <b>Préparation des échantillons .....</b>	<b>5</b>
<b>5.3.1</b> <b>Généralités .....</b>	<b>5</b>
<b>5.3.2</b> <b>Purification SPE.....</b>	<b>5</b>
<b>5.3.3</b> <b>Autre mode de préparation des échantillons non dispersibles dans l'eau (purification DCM) .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b> <b>Mode opératoire.....</b>	<b>6</b>
<b>6.1</b> <b>Généralités .....</b>	<b>6</b>
<b>6.2</b> <b>Conditions chromatographiques.....</b>	<b>6</b>
<b>6.3</b> <b>Installation du système de réaction.....</b>	<b>6</b>
<b>7</b> <b>Calcul des résultats.....</b>	<b>7</b>
<b>7.1</b> <b>Courbe d'étalonnage.....</b>	<b>7</b>
<b>7.2</b> <b>Conditions expérimentales de validité du mesurage .....</b>	<b>7</b>
<b>7.3</b> <b>Calcul des concentrations.....</b>	<b>7</b>
<b>8</b> <b>Rapport d'essai.....</b>	<b>8</b>
<b>Annexe A (informative) Exemples de courbe d'étalonnage et de chromatogrammes .....</b>	<b>9</b>
<b>Annexe B (normative) Photolyse et réaction du nitrite au réactif de Griess jusqu'à formation du colorant azoïque .....</b>	<b>12</b>
<b>Annexe C (normative) Configuration du système de réacteur post-colonne.....</b>	<b>13</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>14</b>

## 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 10130 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

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

[ISO 10130:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009)

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

## 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 (TEA), la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) couplée, soit à une détermination par spectrométrie de masse, soit à une photolyse avec quantification colorimétrique. Cette dernière méthode nécessite l'usage d'une technologie particulière dans le but de garantir une sélectivité maximale lors de la recherche de la NDELA, afin de limiter le plus possible le risque de formation artefactuelle de l'analyte recherché et de permettre une quantification précise de la substance.

La présente méthode analytique emploie la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) associée à une photolyse et à une dérivation post-colonne afin de séparer et de rechercher les traces de NDELA dans un ingrédient cosmétique ou dans une matrice de produit présentant une sélectivité à la NDELA.

La présente Norme internationale fait référence à une étude menée en collaboration par sept laboratoires (Référence [2]) et publiée en 2006. Des critères de validation sont donnés dans la Référence [2].

[ISO 10130:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009)

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

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

ISO 10130:2009

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

# Cosmétiques — Méthodes analytiques — Nitrosamines: Recherche et dosage de la *N*-nitrosodiéthanolamine (NDELA) dans les cosmétiques par CLHP, photolyse et dérivation post-colonne

## 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 par CLHP, photolyse et dérivation post-colonne.

La présente méthode ne s'applique pas à la recherche et/ou à la quantification des 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 est susceptible d'être contaminé par la NDELA contenue dans ses ingrédients ou que la formation de NDELA est possible du fait de la composition en ingrédients, alors la méthode est à appliquer lors des essais des produits cosmétiques et constitue une alternative à l'ISO 15819.

La présente méthode ne s'applique pas aux matrices contenant des colorants d'oxydation.

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

## 2 Principe

L'extraction de la nitrosamine NDELA des échantillons cosmétiques est réalisée avec de l'eau. La purification est effectuée soit par extraction en phase solide (purification SPE, voir 5.3.2) à l'aide d'une cartouche C18, soit à l'aide de dichlorométhane (purification DCM, voir 5.3.3) lorsque les échantillons ne peuvent pas se disperser dans l'eau. Les extraits sont analysés par CLHP, photolyse et dérivation post-colonne. La NDELA est séparée de la matrice cosmétique par chromatographie en phase liquide inverse. La liaison *N*-nitroso est coupée par photolyse UV avec formation d'ion nitrite. Selon la réaction de Griess, le groupe fonctionnel nitrite est diazoté par du sulfanilamide en milieu acide puis associé à du chlorhydrate de *N*-(1-naphthyl)éthylène diamine (NED) pour former un colorant azoïque pourpre qui est ensuite dosé quantitativement par spectrophotométrie à  $\lambda_{\max}$  540 nm (voir Annexe B).

La présence de NDELA peut être confirmée en procédant à une nouvelle analyse sans photolyse (aucun ion nitrite n'est alors produit car la liaison *N*-nitroso n'est pas coupée). L'absence de pic chromatographique au temps de rétention de la NDELA sur le chromatogramme confirme que le pic observé lors de la première analyse correspond bien à la NDELA.

## 3 Réactifs

- 3.1 Méthanol, qualité CLHP.
- 3.2 Eau, qualité CLHP.
- 3.3 Dichlorométhane, qualité CLHP.

**3.4 N-Nitrosodiéthanolamine**, de pureté connue supérieure à 95 %. Numéro CAS: [116-57-7].

**3.5 Acide orthophosphorique 85 %**, de qualité analytique.

**3.6 Acétate d'ammonium**, de qualité analytique.

**3.7 Solution d'acétate d'ammonium**, à 1 mol/l.

Dissoudre 77,08 g d'acétate d'ammonium (3.6) dans 1,0 l d'eau (3.2).

**3.8 Solution d'acétate d'ammonium**, à 0,02 mol/l.

Prélever 20 ml de solution d'acétate d'ammonium 1 mol/l (3.7) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.2).

**3.9 Chlorhydrate de N-(1-naphthyl)éthylène diamine**, de pureté connue supérieure à 98 %. Numéro CAS: [1465-25-4].

Il convient que ce réactif soit scellé et conservé hermétiquement à l'abri de la lumière.

**3.10 Sulfanilamide**, de pureté connue supérieure à 99 %. Numéro CAS: [63-74-1].

**3.11 Réactif de Griess.**

Dissoudre, dans une fiole jaugée, 0,25 g de chlorhydrate de N-(1-naphthyl)éthylène diamine (3.9) dans de l'eau (3.2) et compléter à 250 ml. Dissoudre 4,0 g de sulfanilamide (3.10) dans 250 ml d'une solution aqueuse à 5 % (masse/volume) d'acide orthophosphorique 85 % (3.5). Mélanger les réactifs dans un flacon en verre ambré et conserver le mélange à l'abri de la lumière.

Le mélange peut être utilisé pendant 5 jours et doit, en tout cas, rester incolore lorsqu'il est conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

[ISO 10130:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-277fe2801098/iso-10130-2009)

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

## 4 Appareillage

Utiliser une verrerie et un matériel de laboratoire normalisés, ainsi que l'équipement suivant.

**4.1 Agitateur mécanique** ou **de type Vortex<sup>®1)</sup>**.

**4.2 Flacon en verre à haute performance**, de 20 ml, **avec un bouchon à vis** (type Poly-Cone<sup>®</sup> lined urea).

**4.3 Microtube en polypropylène**, de 1,5 ml destiné à la centrifugation.

**4.4 Té de mélange à faible volume mort.**

**4.5 Station de traitement d'échantillon**, pour application SPE (telle que les systèmes Vacmaster<sup>®</sup> ou Visiprep<sup>®1)</sup>).

**4.6 Centrifugeuse**, pouvant atteindre au moins 20 000g et pouvant réguler la température.

---

1) Vortex<sup>®</sup>, Poly-Cone<sup>®</sup>, Vacmaster<sup>®</sup>, Visiprep<sup>®</sup> 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.



**4.7 Colonnes d'extraction en phase solide**, par exemple Sep Pak<sup>®2)</sup> cartouches C18 ou Bakerbond<sup>®2)</sup> C18 – 6 ml, avec 500 mg d'octadécylsilane en phase inverse fixée sur gel de silice, de 40 µm de diamètre de particule moyen (APD), 60 Å.

**4.8 Chromatographe pour chromatographie en phase liquide à haute performance**, muni d'un amortisseur d'impulsions, d'un réservoir d'éluant, d'une pompe, d'un système d'injection, d'un système de traitement des données, c'est-à-dire un intégrateur, couplé à un détecteur UV/visible équipé d'une lampe à filament de tungstène d'une sensibilité de 0,001 AUFS ou de 0,000 5 AUFS (unités d'absorbance pleine échelle).

**4.9 Système d'alimentation en réactif de Griess**: une pompe basse pression sans pulsation, ou une seconde pompe CL dotée des mêmes propriétés que la première peuvent être utilisées.

**4.10 Unité de photolyse**: un réacteur photochimique comprenant un tube en PTFE tressé supportant de hautes pressions long de 5 m à 6 m et de diamètre interne de 0,3 mm, disposé comme une gaine autour d'une lampe UV à basse pression émettant à la longueur d'onde 254 nm (par exemple des photoréacteurs Beam Boost<sup>®2)</sup>).

**4.11 Module post-colonne ou four à colonne**, équipé d'un réacteur en PTFE tressé de 1 ml et d'un té de mélange à faible volume mort. Le réacteur est une gaine de tube tressé de manière à éviter l'étalement des pics (voir Référence [3]).

**4.12 Colonne analytique de séparation CLHP en phase inverse C18** (par exemple Spherisorb<sup>®</sup> ODS (octadécylsilane) II<sup>2)</sup> protégée par une colonne de garde.

**Colonne de séparation** iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

- longueur: 150 mm
- diamètre intérieur: 4,6 mm [ISO 10130:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-27762801098/iso-10130-2009)
- taille des particules sphériques: 5 µm <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec1b901-a8f9-445f-91d7-27762801098/iso-10130-2009>

#### Colonne de garde

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

**4.13 Configuration du système de réacteur post-colonne** (voir Annexe C).

Les tubes de raccordement en aval de la vanne d'injection doivent être aussi courts que possible.

La colonne est directement reliée à un système d'injection équipé d'une boucle d'échantillonnage de 50 µl ou de 100 µl. Un réacteur photochimique (1) muni d'un réacteur tubulaire translucide tressé et d'une lampe UV émettant à 254 nm est relié à la sortie de la colonne. La sortie du réacteur photochimique est reliée à une des branches du té de mélange (2). La deuxième branche du té est connectée à la pompe permettant d'introduire le réactif de dérivation (3). La troisième branche est reliée au module post-colonne composé d'un réacteur en tube PTFE tressé (4). La sortie du module post-colonne est reliée au détecteur UV/visible (5). Les pics élués sont enregistrés par un micro-ordinateur équipé d'un progiciel commercial d'intégration.

2) Sep Pak<sup>®</sup> cartouches C18 ou Bakerbond<sup>®</sup>, Beam Boost<sup>®</sup>, Spherisorb<sup>®</sup> 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 Préparation et conservation des échantillons

### 5.1 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 adaptées.

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.

Étant donné que les UV détériorent les *N*-nitrosamines, la *N*-nitrosodiéthanolamine et toutes les solutions (étalons/extraits) doivent être stockées à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Les injections pour analyse doivent être réalisées dans les 24 h suivant la préparation par extraction de l'échantillon.

### 5.2 Préparation des étalons

ITeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

#### 5.2.1 Solution-mère

Préparer une solution-mère étalon,  $S_0$ , de NDELA à 1 mg/ml dans de l'eau. Cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de six mois.

#### 5.2.2 Solutions stocks

À partir de la solution-mère,  $S_0$ , préparer une dilution au 1/100 dans de l'eau afin d'obtenir une solution stock,  $S_1$ , à 10 µg/ml. Préparer une seconde solution stock,  $S_2$ , à 100 ng/ml par dilution au 1/100 de la solution stock  $S_1$ . Toutes ces solutions sont conservées à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant une durée maximale d'une semaine.

#### 5.2.3 Solutions de travail

En diluant progressivement la solution stock,  $S_2$ , à 100 ng/ml avec de l'eau, préparer des étalons à 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml et 20 ng/ml. (Voir Figure A.1.) Ces solutions sont préparées tous les jours et conservées à l'abri de la lumière (voir Tableau 1).

Vérifier la linéarité de la courbe d'étalonnage sur la plage de 1 ng/ml à 100 ng/ml (voir Figure A.2).

Un chromatogramme type est présenté aux Figures A.3 et A.4.

Tableau 1 — Préparation des solutions de travail

Solution de travail	Volume de solution stock $S_2$	Volume final ml	Concentration finale ng/ml	Stabilité jour	Condition
Solution de travail, $W_1$	100 $\mu$ l	10	1	1	Conservée à l'abri de la lumière
Solution de travail, $W_2$	200 $\mu$ l	10	2	1	Conservée à l'abri de la lumière
Solution de travail, $W_3$	500 $\mu$ l	10	5	1	Conservée à l'abri de la lumière
Solution de travail, $W_4$	1 ml	10	10	1	Conservée à l'abri de la lumière
Solution de travail, $W_5$	2 ml	10	20	1	Conservée à l'abri de la lumière

### 5.3 Préparation des échantillons

#### 5.3.1 Généralités

Lorsque le produit cosmétique est dispersible (soluble) dans l'eau, la purification par extraction en phase solide (purification SPE) doit s'appliquer (voir 5.3.2).

Lorsque le produit cosmétique n'est pas dispersible dans l'eau, la purification par dichlorométhane (purification DCM) doit s'appliquer (voir 5.3.3).

Concernant les cosmétiques, il est nécessaire d'évaluer les critères de dispersibilité du produit afin de choisir la méthode de nettoyage la mieux adaptée. Les purifications SPE et DCM ne doivent pas être utilisées sur le même produit. La méthode de purification la mieux adaptée à chaque produit doit être utilisée. Un produit non dispersible dans l'eau doit être traité dans les conditions de purification DCM.

#### 5.3.2 Purification SPE

Peser environ 2,0 g d'échantillon dans un flacon en verre (4.2) et noter la masse exacte. Ensuite disperser et compléter à 20 ml avec de l'eau. Agiter pendant 15 min avec un agitateur mécanique ou pendant 1 min avec un agitateur de type Vortex®. Centrifuger pendant 10 min (préparation SPE).

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

Déposer 5 ml de la préparation SE sur la cartouche C18 d'extraction en phase solide citée ci-dessus et éliminer les trois premiers millilitres de solution. Recueillir les 2 ml suivants (à un débit d'environ 3,0 ml/min) dans un flacon afin de les soumettre à l'analyse chromatographique.

Filtrer si nécessaire la solution récupérée avec un filtre adapté.

#### 5.3.3 Autre mode de préparation des échantillons non dispersibles dans l'eau (purification DCM)

Peser environ 0,4 g de l'échantillon (noter la masse exacte) dans un flacon en verre (4.2). Ajouter 4,0 ml de dichlorométhane et agiter pendant 1 min. Ajouter précisément 4 ml d'eau et agiter pendant 5 min.

Verser une aliquote de la phase aqueuse supérieure dans un microtube (4.3).

Centrifuger à 20 000g pendant 10 min.

Injecter la phase aqueuse supérieure dans le système chromatographique.