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

ISO 15819:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15819:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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

Contents

	Page
Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Réactifs	2
5 Appareillage	2
6 Préparation et conservation d'échantillons	3
6.1 Généralités.....	3
6.2 Préparation des solutions étalons.....	4
6.3 Préparation de l'échantillon.....	5
7 Mode opératoire	6
7.1 Généralités.....	6
7.2 Conditions chromatographiques.....	6
7.3 Conditions CLHP-SM-SM.....	7
8 Calcul des résultats	7
8.1 Détermination de la valeur R	7
8.2 Courbe d'étalonnage.....	7
8.3 Mode opératoire de vérification de la validité et ses critères.....	8
8.4 Calcul des concentrations.....	8
9 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Exemples d'une courbe d'étalonnage et de chromatogrammes	10
Bibliographie	12

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://www.iso.org/standards).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 15819:2008), qui a fait l'objet d'une révision technique.

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 avec 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 pour la NDELA.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 15819:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15819:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>

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 N-nitrosodiéthanolamine (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 s'applique pas aux 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 (se référer à l'ISO 12787).

Par voie de conséquence, les Normes internationales consacrées à d'autres méthodes d'essai des nitrosamines dans les cosmétiques sont élaborées séparément. D'autres 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

ISO 12787:2011, *Cosmétiques — Méthodes analytiques — Critères de validation pour les résultats analytiques utilisant des techniques chromatographiques*

3 Principe

L'extraction de la NDELA des échantillons cosmétiques est réalisée avec de l'eau en présence de d8-NDELA deutérée utilisée en tant qu'étalon interne (IS). 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).

L'identification de NDELA est obtenue à l'aide de l'ion moléculaire et de deux ions qualifiants. La quantification de NDELA est réalisée par comparaison du ratio obtenu entre les ions fragments majoritaires de la NDELA et du d8-NDELA avec une courbe d'étalonnage.

Conformément à l'ISO 12787, l'absence de NDELA dans l'échantillon pourrait être confirmée par une seconde analyse. Une préparation dopée à une valeur cible pourrait être effectuée pour évaluer la limite de détection de la NDELA dans l'échantillon.

Si un effet matrice est observé avec un impact significatif sur la performance de la méthode (sensibilité, exactitude, etc.) pour un produit cosmétique spécifique, il est possible d'utiliser une procédure d'étalonnage par ajouts dosés (se référer à l'ISO 12787).

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. Les solvants doivent être de qualité pour analyse CLHP-SM.

4.1 **Méthanol (MeOH)**, qualité CLHP-SM.

4.2 **Éthanol (EtOH)**, qualité CLHP-SM.

4.3 **Dichlorométhane (DCM)**, qualité CLHP-SM.

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 (adapté à l'analyse par CLHP-SM).

4.7 **Solution d'acétate d'ammonium 1 mol/l**, pour la préparation de 1,0 l, dissoudre 77,08 g de NH₄Ac dans 1,0 l d'eau.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>

4.8 **Éluant A: 2 mmol de NH₄Ac dans l'eau**, pour la préparation de 1,0 l, à partir de 2 ml de NH₄Ac à 1 mol/l (4.7), complété à 1 l avec de l'eau.

4.9 **Éluant B: 2 mmol de NH₄Ac dans 90/10 MeOH/eau (v/v)**, réalisé, pour la préparation de 1,0 l, à partir de 2 ml de NH₄Ac à 1 mol/l (4.7), complété à 1 l avec un mélange de 90/10 de MeOH/eau (v/v).

5 Appareillage

Utiliser une verrerie et un équipement de laboratoire courant, ainsi que:

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)}].

5.3 **Centrifugeuse à haute vitesse** (idéalement 20 000 G).

NOTE Si une vitesse de centrifugeuse inférieure à 20 000 G est utilisée, faire attention à un possible problème de colmatation pendant le processus de purification SPE. Si nécessaire, une étape de filtration supplémentaire avec un filtre à membrane de 0,2 µm de porosité pourrait être utilisée.

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

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 (diamètre moyen de particules), 60 Å.

5.5 Équipement CLHP-SM-SM

5.5.1 Chromatographe en phase liquide à haute performance, consistant en un réservoir d'éluant, une pompe, un système d'injection, un système de traitement des données, par exemple un intégrateur avec traceur, couplé à un spectromètre de masse en mode ionisation par électrospray.

5.5.2 Colonne analytique de séparation CLHP en phase inverse, C18, par exemple Spherisorb^{®2)} ODS II protégée par une colonne de garde dont les dimensions sont les suivantes:

- colonne de séparation
 - longueur: 100 mm;
 - diamètre interne: 2,1 mm;
 - taille des particules sphériques: 5 µm;
- colonne de garde
 - longueur: 10 mm;
 - diamètre interne: 2,1 – 3,0 mm;
 - taille des particules sphériques: 5 µm.

L'utilisation d'une colonne de garde est facultative. En cas d'utilisation, son diamètre interne doit, de préférence, être le même que celui de la colonne de séparation. Il convient d'ajuster la condition à la marque utilisée pour la colonne analytique de séparation CLHP en phase inverse.

6 Préparation et conservation d'échantillons

6.1 Généralités

AVERTISSEMENT — La plupart des N-nitrosamines sont des cancérigènes notoires 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.

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.

Procéder à l'élimination en toute sécurité de toute solution de produit contenant des N-nitrosamines (en utilisant des boîtes ou des récipients pour les déchets chimiques dangereux par exemple).

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.

2) Spherisorb[®] est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

Il est généralement recommandé d'effectuer l'analyse CLHP-SM-SM dans les 30 min suivant la préparation des extraits d'échantillon. Si l'analyse est retardée, il convient de vérifier la stabilité.

6.2 Préparation des solutions étalons

6.2.1 Préparer avec exactitude une solution mère (A) de NDELA contenant environ 1,0 mg/ml dans de l'éthanol et la stocker à l'abri de la lumière à une température inférieure à -18 °C. Noter la concentration exacte.

6.2.2 Préparer avec exactitude une solution mère (d8A) de d8-NDELA contenant environ 1,0 mg/ml dans de l'éthanol et la stocker à l'abri de la lumière à une température inférieure à -18 °C. Noter la concentration exacte.

6.2.3 Préparer des solutions de travail (B, C, D, E et F) par dilutions successives de la solution mère (A). 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	Volume de solution mère ou de travail	Volume d'eau	Concentration finale	Stabilité
Solution de travail B	100 µl de A	900 µl	100,0 µg/ml	1 j
Solution de travail C	100 µl de B	900 µl	10,0 µg/ml	1 j
Solution de travail D	100 µl de C	900 µl	1,0 µg/ml	1 j
Solution de travail E	100 µl de D	900 µl	100,0 ng/ml	1 j
Solution de travail F	100 µl de E	900 µl	10,0 ng/ml	1 j

NOTE Les utilisateurs peuvent déterminer les volumes réels utilisés pour la préparation dès lors que la concentration finale est garantie.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aea04017-b22e-4be4-ac22-47d0da31a9b1/iso-15819-2014>

6.2.4 Préparer des solutions de travail d8 (d8B et d8C) par dilutions successives de la solution mère (d8A). 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	20 µl de d8A	20 ml	1,0 µg/ml	1 j
Solution de travail d8C	200 µl de d8B	1 800 µl	100,0 ng/ml	1 j

NOTE Les utilisateurs peuvent déterminer les volumes réels utilisés pour la préparation dès lors que la concentration finale est garantie.

6.2.5 Préparer des solutions étalons en diluant les solutions de travail. Une courbe d'étalonnage de 1,0 ng/ml à 80,0 ng/ml est réalisée, en utilisant au moins cinq des sept solutions étalons indiquées dans le tableau ci-dessous. Il convient d'inclure une solution étalon correspondant à la limite de quantification (ou inférieure) requise. L'étalon interne de d8-NDELA est 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.

Solutions étalons	Volume de solutions de travail	Solution de travail d8C	Volume d'eau	Concentration finale		Stabilité
				NDELA	d8-NDELA	
Solution étalon 1	800 µl de E	200 µl	-	80,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 2	400 µl de E	200 µl	400 µl	40,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 3	200 µl de E	200 µl	600 µl	20,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 4	100 µl de E	200 µl	700 µl	10,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 5	500 µl de F	200 µl	300 µl	5,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 6	250 µl de F	200 µl	550 µl	2,5 ng/ml	20 ng/ml	1 j
Solution étalon 7	100 µl de F	200 µl	700 µl	1,0 ng/ml	20 ng/ml	1 j

NOTE 1 En fonction de la sensibilité de l'instrument, la courbe d'étalonnage et la préparation de l'échantillon pourraient être adaptées en vue de minimiser un potentiel effet matrice (voir 6.3.3).

NOTE 2 Les utilisateurs peuvent déterminer les volumes réels utilisés pour la préparation dès lors que la concentration finale est garantie.

6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Purification SPE

Peser exactement environ 1,0 g d'échantillon (noter la masse exacte), ajouter 400 µl de solution de travail d8B et compléter à 20,0 ml avec de l'eau. Agiter pendant 15 min. Si nécessaire, utiliser également, en prenant des précautions appropriées, un bain de sonication et/ou centrifuger pendant 10 min. Afin d'éviter la génération supplémentaire de nitrosamine, il convient de minimiser la sonication.

NOTE À condition que la sensibilité CLHP-SM-SM le permette, une masse d'échantillon plus petite et/ou un volume d'eau initial plus important peu(ven)t être utilisé(s) pour s'adapter à certaines matrices et réduire de potentiels problèmes de suppression de l'ionisation dus aux composants de la matrice coélus. Lors du changement de volume d'eau, mettre en adéquation la concentration de l'étalon interne dans la solution étalon et dans la solution échantillon. Dans le cas contraire, un calcul correct ne peut pas être effectué.

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 sécher.

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

Si nécessaire, préparer l'échantillon en trois exemplaires.

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

Peser exactement environ 0,2 g de l'échantillon (noter la masse exacte) dans un tube à centrifuger, ajouter 800 µl de solution de travail d8C et agiter pendant 1 min. Ajouter 4 ml de dichlorométhane et agiter pendant 1 min. Ajouter 3,2 ml d'eau et agiter pendant 5 min.

NOTE À condition que la sensibilité CLHP-SM-SM le permette, une masse d'échantillon plus petite et/ou un volume d'eau initial plus important peu(ven)t être utilisé(s) pour s'adapter à certaines matrices et réduire de potentiels problèmes de suppression de l'ionisation dus aux composants de la matrice coélus. Lors du changement de volume d'eau, mettre en adéquation la concentration de l'étalon interne dans la solution étalon et dans la solution échantillon. Dans le cas contraire, un calcul correct ne peut pas être effectué.

Centrifuger à la vitesse la plus élevée possible (idéalement 20 000 G) pendant 5 min. Une partie de la phase aqueuse supérieure est utilisée pour l'analyse chromatographique.

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