



中华人民共和国国家标准

GB/T 35956—2018/ISO 15819:2014

化妆品中 N-亚硝基二乙醇胺(NDELA)的 测定 高效液相色谱-串联质谱法

Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in
cosmetics—HPLC-MS-MS

[ISO 15819:2014, Cosmetics—Analytical methods—Nitrosamines;
Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in
cosmetics by HPLC-MS-MS, IDT]

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 15819:2014《化妆品 分析方法 化妆品中 N-亚硝基二乙醇胺(NDELA)的测定 高效液相色谱-串联质谱法》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改：

- a) 将标准名称修改为《化妆品中 N-亚硝基二乙醇胺(NDELA)的测定 高效液相色谱-串联质谱法》；
- b) 删除国际标准的前言和引言；
- c) 增加资料性附录 NA。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)归口。

本标准起草单位：上海市日用化学工业研究所、江苏省产品质量监督检验研究院(国家化妆品质量监督检验中心)、北京宝洁技术有限公司。

本标准主要起草人：徐清皓、金其璋、蒋燕、卢剑。

化妆品中 N-亚硝基二乙醇胺(NDELA)的 测定 高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准描述一种方法,用于检测和定量测定化妆及其原料中的 NDELA。此方法不适用于检测和/或定量测定 NDELA 以外的亚硝基胺类化合物,也不适用于测定化妆品及其原料以外产品中的 NDELA。如果一个产品有可能受到来自其原料的 NDELA 污染或由其原料而生成 NDELA,那么,本标准方法应被用来定量测定 NDELA。本方法不用于化妆品的常规测定。因为在应用范围内有许多类别的化妆品,故本方法对于某些基质,可能需要有个采纳、改编的过程(参考 ISO 12787)。因此,正在分别开发其他的国际标准,这些标准将适用于测定化妆品中的其他亚硝基胺类物质。如果其他的测定方法在回收率和定量上能被证明适合测定 NDELA,那么这些方法也可以使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 3696:1987 分析实验室用水 规格和试验方法(Water for analytical laboratory use—Specification and test methods)

ISO 12787:2011 化妆品 分析方法 使用色谱技术对分析结果的确认准则(Cosmetics—Analytical methods—Validation criteria for analytical results using chromatographic techniques)

3 原理

在氘代 d8-NDELA 内标物存在情况下,用水提取出化妆品样品中的 NDELA。净化步骤可以采用 C₁₈ 装载的固相萃取小柱(固相萃取净化,见 6.3.1),或当样品在水中不分散时,可采用二氯甲烷液-液萃取(DCM 净化,见 6.3.2)。提取物采用 HPLC-MS-MS 分析(高效液相色谱串联质谱检测)。

利用分子离子和两个特征离子来鉴定 NDELA。通过比较在标准曲线上 NDELA 和 d8-NDELA 的主要碎片离子的比例来定量 NDELA。

根据 ISO 12787,可以用第二个分析来确证样品中不存在 NDELA。在目标值处的标准添加法可以用来评估样品中 NDELA 的检测限。

对于特定的化妆品,如果发现其基体效应对本检测方法的实施有显著的影响(灵敏度、准确度等),则可以采用标准添加校准程序(参考 ISO 12787)。

4 试剂

在分析试验中,除非另有说明,仅使用分析纯试剂和蒸馏水或符合 ISO 3696:1987 标准的 1 级水。溶剂应具有适合 HPLC-MS 的品质。

4.1 甲醇,HPLC-MS 级。

4.2 乙醇,HPLC-MS 级。

4.3 二氯甲烷, HPLC-MS 级。

4.4 N-亚硝基二乙醇胺, 纯度高于 95%。N-亚硝基二乙醇胺标准物质信息参见附录 NA 中的表 NA.1。

4.5 氘代 d8-N-亚硝基二乙醇胺, 纯度高于 95%。

4.6 醋酸铵, 分析纯(适合 HPLC-MS)。

4.7 1 mol/L 醋酸铵溶液, 77.08 g 醋酸铵溶于 1.0 L 水。

4.8 洗脱液 A: 2 mmol 醋酸铵水溶液, 取 2 mL 1 mol/L 醋酸铵溶液(4.7), 用水定容至 1 L。

4.9 洗脱液 B: 2 mmol 醋酸铵甲醇水溶液(甲醇与水体积比为 9:1), 取 2 mL 1 mol/L 醋酸铵溶液(4.7), 用 9:1(体积比)甲醇水溶液定容至 1 L。

5 仪器

使用标准实验室玻璃仪器和设备, 外加以下设备:

5.1 涡旋混合器。

5.2 样品处理站, SPE 应用中的样品处理站(如 Vacmaster)。

5.3 高速离心机(最佳为 20 000 G)。

注: 如果使用离心速度低于 20 000 G 的离心机, 要注意在 SPE 净化过程中可能发生的堵塞问题。如有必要, 可增加通过 0.2 μm 孔径的膜过滤器的过滤步骤。

5.4 固相萃取小柱, 例如 Bakerbond ¹⁾ C₁₈-6 mL, 500 mg 反相, 十八烷基硅烷键合到硅胶上, 40APD (平均直径), 60Å。

5.5 高效液相色谱串联质谱设备。

5.5.1 高效液相色谱仪, 包括洗脱液储存器、泵、进样系统、数据处理器, 例如带有绘图器的积分仪, 连接到利用电喷雾离子化的串联质谱仪上。

5.5.2 分析用反相高效液相色谱分离柱, C₁₈, 例如 Spherisorb ²⁾ ODS II, 配有保护柱, 柱尺寸如下:

——分离柱

- 长度: 100 mm;
- 内径: 2.1 mm;
- 球形粒子大小: 5 μm ;

——保护柱

- 长度: 10 mm;
- 内径: 2.1 mm~3.0 mm;
- 球形粒子大小: 5 μm 。

可以选择是否使用保护柱。如果使用, 它的内径最好与分离柱的内径相同。宜根据分析反相高效液相色谱分离柱的品牌调整使用条件。

6 样品制备与储存

6.1 综述

警告: 大多数 N-亚硝胺是强致癌物质, 为避免人体接触, 应采取所有可能的预防措施。

- 1) Bakerbond 和 Vacmaster 是适合本实验的商业化产品例子, 给出该信息是为了方便使用本方法的用户, 它并不表示 ISO 对本产品的担保。
- 2) Spherisorb 是适合本实验的商业化产品例子, 给出该信息是为了方便使用本方法的用户, 它并不表示 ISO 对本产品的担保。

拿取 N-亚硝胺或其溶液的所有操作宜在通风充分的通风橱或手套式操作箱内进行。

常用的橡胶外科手套不能提供彻底的防护,因此不能长期穿戴,在使用后宜立即脱下并处置。

安全处置任何含有 N-亚硝胺的溶液(例如使用处置有害化学废料的罐头的提桶)。

NDELA 应在 2℃~8℃ 环境下避光保存。

紫外线会使 NDELA 降解,因此溶液(包括标准溶液和提取液)在储存中应采取措施防止变质和组分改变。

样品萃取后,通常宜在 30 min 内进行 HPLC-MS-MS 分析。如果分析延迟,建议验证其稳定性。

6.2 标准溶液制备

6.2.1 精确配制大约含有 1.0 mg/mL NDELA 的乙醇储备液 A,避光、低于-18℃ 保存。记录精确浓度。

6.2.2 精确配制大约含有 1.0 mg/mL d8-NDELA 的乙醇储备液 d8A,避光、低于-18℃ 保存。记录精确浓度。

6.2.3 用连续稀释储备液 A 法,制备工作溶液(B、C、D、E、F)。所有溶液应在 2℃~8℃ 环境下避光保存。

工作溶液	储备液或工作溶液体积	水体积	最终浓度	稳定期
工作溶液 B	100 μ L 储备液 A	900 μ L	100.0 μ g/mL	1 d
工作溶液 C	100 μ L 工作溶液 B	900 μ L	10.0 μ g/mL	1 d
工作溶液 D	100 μ L 工作溶液 C	900 μ L	1.0 μ g/mL	1 d
工作溶液 E	100 μ L 工作溶液 D	900 μ L	100.0 ng/mL	1 d
工作溶液 F	100 μ L 工作溶液 E	900 μ L	10.0 ng/mL	1 d

注:只要最终浓度是可靠的,则使用者可以确定用于制备的实际体积。

6.2.4 用连续稀释储备液(d8A)法,制备 d8 工作溶液(d8B 和 d8C)。所有溶液应在 2℃~8℃ 环境下避光保存。

工作溶液	储备液或工作溶液体积	水体积	最终浓度	稳定期
工作溶液 d8B	20 μ L 储备液 d8A	20 mL	1.0 μ g/mL	1 d
工作溶液 d8C	200 μ L 工作溶液 d8B	1 800 μ L	100.0 ng/mL	1 d

注:只要最终浓度是可靠的,则使用者可以确定用于制备的实际体积。

6.2.5 稀释工作溶液以制备标准溶液。利用下表 7 个标准溶液中至少 5 个标准溶液,制成 1.0 ng/mL~80.0 ng/mL 的标准曲线。对应于所要求的定量限(或下限)的标准溶液宜被包括在内。每个溶液内标物 d8-NDELA 的浓度为 20 ng/mL。所有溶液应在 2℃~8℃ 环境下避光保存。

标准溶液	工作溶液体积	工作溶液 d8C 体积	水体积	最终浓度		稳定期
				NDELA	d8-NDELA	
标准溶液 1	800 μ L 工作溶液 E	200 μ L	—	80.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d
标准溶液 2	400 μ L 工作溶液 E	200 μ L	400 μ L	40.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d
标准溶液 3	200 μ L 工作溶液 E	200 μ L	600 μ L	20.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d

(续)

标准溶液	工作溶液体积	工作溶液 d8C 体积	水 体积	最终浓度		稳定期
				NDELA	d8-NDELA	
标准溶液 4	100 μ L 工作溶液 E	200 μ L	700 μ L	10.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d
标准溶液 5	500 μ L 工作溶液 F	200 μ L	300 μ L	5.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d
标准溶液 6	250 μ L 工作溶液 F	200 μ L	550 μ L	2.5 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d
标准溶液 7	100 μ L 工作溶液 F	200 μ L	700 μ L	1.0 ng/mL	20.0 ng/mL	1 d

注 1: 为了使可能的基质效应最小化,标准曲线和样品制备可根据仪器灵敏度调整。

注 2: 只要最终浓度是可靠的,则使用者可以确定用于制备的实际体积。

6.3 样品制备

6.3.1 SPE 净化

精确称取约 1.0 g 样品(记录精确质量数),加入 400 μ L 的 d8B 工作溶液,用水定容至 20.0 mL。摇动 15 min,此为样品提取液。如有必要,可小心超声和/或离心 10 min。为避免亚硝胺进一步产生,宜尽量减少超声。

注: 为减少因基质组分共洗脱所造成的电离抑制问题,在 HPLC-MS-MS 灵敏度允许的情况下,可以采用较少的样品量和/或较大的初始水体积。当改变水的体积时,应保持标准溶液和样品溶液中内标物的浓度一致,除非无法执行正确的计算。

C₁₈固相萃取小柱以大约 3.0 mL/min 流速依次用 3.0 mL 甲醇、3.0 mL 水活化。注意不要使柱子干透。

取大约 5 mL 样品提取液装入上述 C₁₈固相萃取小柱中,弃去前 3 mL 流出液。收集之后大约 2 mL 的流出液(流速约为 3.0 mL/min)于小瓶中。

如果需要,平行制备三份样品。

6.3.2 在水中不分散的样品的另一种样品制备方法(二氯甲烷净化)

精确称取约 0.2 g 样品(记录精确质量数)于离心管中,加入 800 μ L 的 d8C 工作溶液,摇动 1 min。加入 4 mL 二氯甲烷,摇动 1 min。加入 3.2 mL 水,摇动 5 min。

注: 为减少因基质组分共洗脱所造成的电离抑制问题,在 HPLC-MS-MS 灵敏度允许的情况下,可以采用较少的样品量和/或较大的初始水体积。当改变水的体积时,应保持标准溶液和样品溶液中内标物的浓度一致,除非无法执行正确的计算。

以尽可能高的速度离心(理想的为 20 000 G)5 min。取上层部分水溶液用于色谱分析。

如有必要,用合适的过滤器过滤收集液。

如果需要,平行制备三份样品。

6.3.3 进一步稀释样品液和标准溶液(可选)

为尽可能减少基质组分共洗脱所产生的潜在影响(这种影响会抑制 NDELA 离子化,限制方法的灵敏度),建议对样品提取液和相应的标准溶液进行另外的稀释。用水稀释样品提取液和标准水溶液至灵

敏度能适合所应用的特定 HPLC-MS-MS 系统。

6.3.4 样品储存

如有必要,样品可低于 8 ℃ 环境下避光储存。

7 检测步骤

7.1 综述

上述两种样品制备方法,最终提取液都是用 HPLC-MS-MS 分析 NDELA。

7.2 色谱条件

流动相:洗脱液 A——2 mmol 醋酸铵水溶液(4.8)

洗脱液 B——2 mmol 醋酸铵(体积比 = 90 : 10)甲醇水溶液(4.9)

梯度:

时间间隔/min	洗脱液 A/%	洗脱液 B/%
0~1.5	97	3
1.5~1.6	97→0	3→100
1.6~4.0	0	100
4.0~4.1	0→97	100→3
4.1~6.0	97	3

流速: 0.4 mL/min。

进样量: 20 μ L。

柱温: 30 ℃。

样品储存: ≤ 8 ℃, 避光(推荐)。

样品运行: 每次运行包括至少 5 个标准曲线点, 每 15 个样品提取液至少有一个对照样(一个标准溶液)(如果样品量少于 15 个, 至少要带一个对照样)。允许运行至少 20 个样品提取液, 如果证明有足够的托盘稳定性, 可以有更大的运行数目。

对于某些被确证的基质, 液相色谱条件可能需要调整。(见 ISO 12787)。

7.3 HPLC-MS-MS 条件

电喷雾, 正离子模式。

以三重四极杆质谱仪为例(如 AB Sciex 5 500³⁾)给出适当的参数:

源设置

——离子喷雾电压(ISV)	2 800 V
——去簇电压(DP)	26 V
——源温度(TEM)	650 ℃
——雾化器气(GS1)	70 units(氮气)
——涡轮气(GS2)	70 units(氮气)

3) AB Sciex 5 500 是适合本实验的商业化产品例子, 参数设置取决于所用液相色谱串联质谱系统。给出该信息是为了方便使用本方法的用户, 它并不表示 ISO 对本产品的担保。

- 气帘气 (CUR) 30 units(氮气)
- 分析器设置
- 扫描模式 多反应监测(MRM)对(NDELA 用两个选择反应监测,对内标物用一个选择反应监测)
- Q1 分辨率 unit
- Q3 分辨率 unit
- 碰撞活化解离气体(CAD) 12 unit(氮气)

特征离子 135(M+H),104 和 74(碎片离子)鉴定样品中存在 NDELA。

通过 NDELA 的两个主要碎片离子 104(来自 NDELA)和 111[来自 d8-NDELA 的 143(M+H)]的离子峰强度比率来定量 NDELA。

8 结果计算

8.1 R 值的测定

对每次进样(包括校准曲线点,样品提取液和对照样),测定 R 值,R 值被定义为 NDELA(M+H)离子的碎片离子 104 和 d8-NDELA(M+H)离子的碎片离子 111 的离子峰强度比率。(见例,图 A.2)。
这些 R 值被用来确定校准曲线和浓度 c(如 8.4 中所示)。

8.2 校准曲线

以标准溶液中 NDELA 的浓度对 R 值作图,得到校准曲线。
用于定量测定的校准曲线,其相关系数应大于或等于 0.990(见例,图 A.1)。

8.3 有效性检查程序及其标准

在相同实验条件下测定校准标准溶液和样品溶液,样品溶液两个监测离子(104 和 74)的相对强度(以最强离子强度百分比计),应与校准标准溶液的这两个监测离子的相对强度相符,二者容差应符合表 1。

通过测试已加入检测限以上浓度的 NDELA 样品,核对检测方法的有效性。

表 1 相对离子强度的最大允许偏差

相对离子强度 (相对于基础离子强度的百分数)	允许的相对偏差
>50%	±20%
>20%~50%	±25%
>10%~20%	±30%
≤10%	±50%

8.4 浓度计算

利用 R 值测定被提取样品的浓度 c(ng/mL),直接从校准曲线上读出浓度。
用式(1)计算未知样品的 NDELA 浓度:

$$W = c \times V / m \dots\dots\dots(1)$$

式中:

W ——每克化妆品样品中 NDELA 质量分数,单位为纳克每克(ng/g);

c ——提取液中 NDELA 浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

m ——化妆品样品称取质量,单位为克(g);

V ——化妆品稀释体积,单位为毫升(mL)(例如,用于 SPE 净化是 20 mL ,用于二氯甲烷净化是 4 mL)。

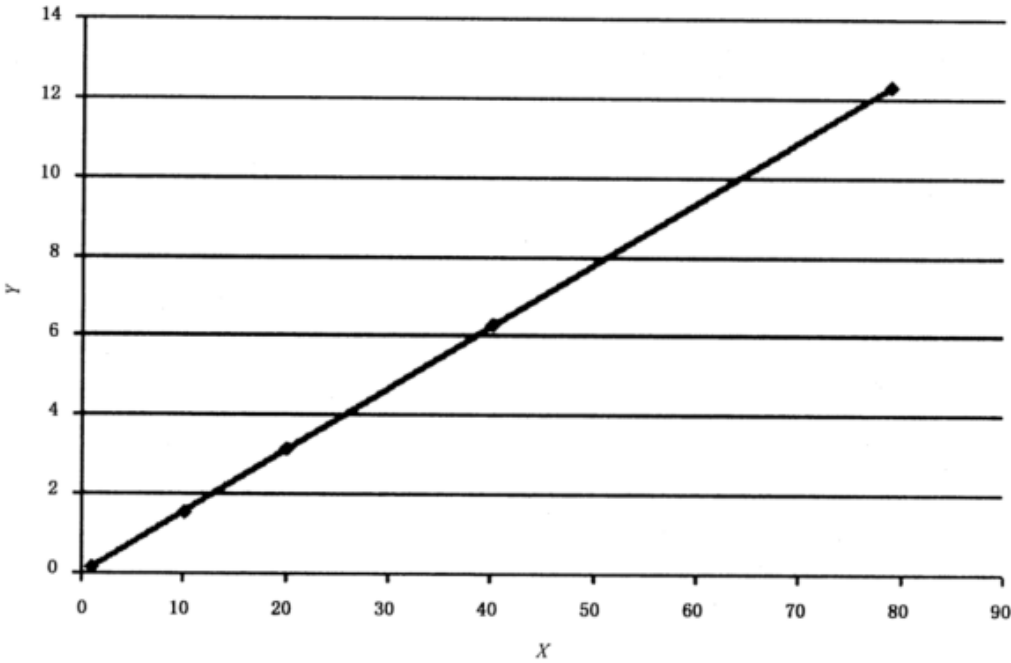
注:倘若利用不同体积,那么 V 值可以调整(见 6.3.1 和 6.3.2 中的注)。

9 检测报告

检测报告应至少包括以下信息:

- a) 识别样品的所有必要信息;
- b) 识别进行测试的实验室的所有必要信息;
- c) 本标准的参考文献;
- d) 取样形式和日期(如果知道);
- e) 实验室收到样品的日期;
- f) 测试日期;
- g) 结果和结果的表达单位;
- h) 采用的净化方法;
- i) 任何检测过程中发现的特殊点;
- j) 可能影响结果的本方法中未指明的任何操作或选用的操作;
- k) 报告负责人的身份及签名。

附录 A
(资料性附录)
校准曲线和色谱图示例



说明：
X —— 标准溶液中 NDELA 浓度(ng/mL)；
Y —— R 值。

图 A.1 NDELA 校准曲线的示例

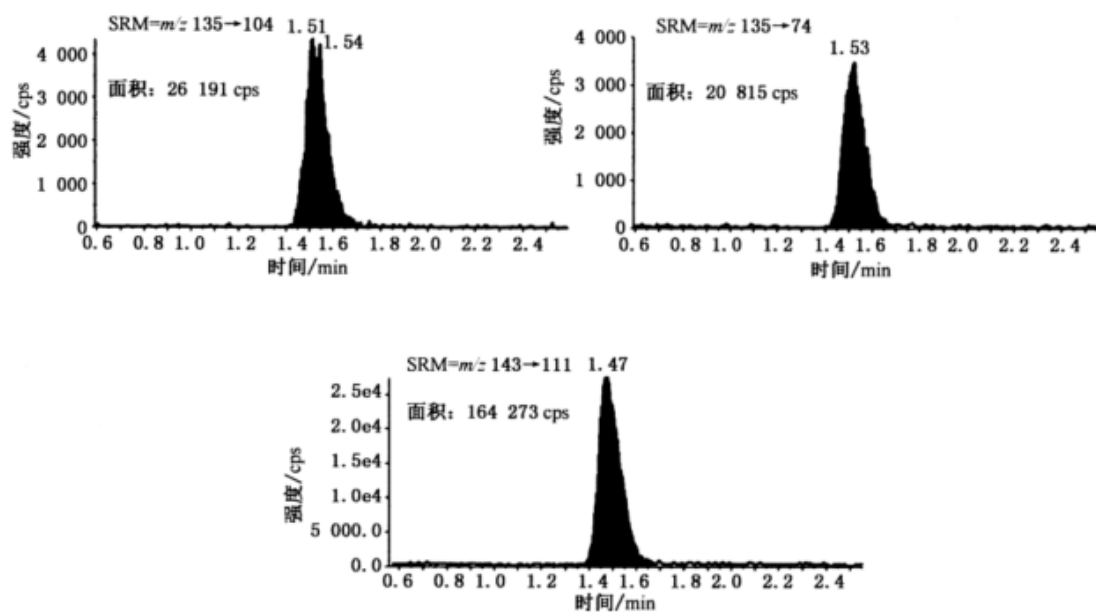


图 A.2 HPLC-MS-MS 色谱示例

由分析 1.0 ng/mL 校准溶液获得,该浓度对应于基质中含有 NDELA 20 ng/g。数据获得方法:采用 AB Sciex 5 500 三重四极杆质谱仪分析,对样品的水提取物再用水稀释 4 倍。NDELA(定量选择离子反应监测 SRM);上右图:NDELA(第二个选择离子反应监测 SRM);下图:d8-NDELA(内标液选择离子反应监测 SRM)。

附 录 NA

(资料性附录)

N-亚硝基二乙醇胺标准物质信息

表 NA.1 N-亚硝基二乙醇胺中文名称、英文名称、英文缩写、CAS 号、分子式、相对分子质量及结构式

序号	中文名称	英文名称	英文缩写	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
1	N-亚硝基二乙醇胺	N-nitrosodiethanolamine	NDELA	1116-54-7	$C_4H_{10}N_2O_3$	134.13	

参 考 文 献

- [1] 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results [notified under document number C (2002) 3044]
-