Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

快速、高效地测定化妆品、个人护理产品和消费品中亚硝胺的方法

Michael Jones[1] 和 Christopher Glover [2]
[1]沃特世公司(英国曼彻斯特)
[2]诺森比亚大学(英国泰恩河畔纽卡斯尔)

应用优势

本应用纪要介绍了一种用于鉴定和定量消费品中的致癌性亚硝胺的方法，该方法具有以下优势:

- 通过缩短运行时间提高样品通量和减少溶剂用量。
- 单一、直接的LC-MS方法，可分析非挥发性和挥发性亚硝胺，且无需进行衍生化。
- 可定量分析浓度在法规限值50 µg/kg以下的N-亚硝胺。
- 可利用RADAR™数据采集软件挖掘出更多的未知物。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class系统
ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱
Xevo® TQ-S micro
MassLynx® MS软件
Oasis® HLB SPE小柱

关键词

亚硝胺，个人护理产品，化妆品，消费品，受管制物质，RADAR，PICS

简介

N-亚硝胺是一类已知对动物模型具有致癌和致突变作用的化合物，能够通过多种暴露途径作用于多个不同的组织位点[1-3]。无论是在制造过程还是产品储存过程中，消费品、化妆品和个人护理产品配方中都有可能会形成亚硝胺[4]。如果产品中除了硝化剂(例如亚硝酸、亚硝酸盐或氮氧化物)之外还存在仲胺，就会形成N-亚硝胺(一般在酸性条件下)。化妆品、个人护理产品和消费品中亚硝胺含量的分析应当被纳入产品安全性评估流程，以确保符合新的《化妆品和消费品法规》[5]。此外还有研究表明，存放超过五年的化妆品与同种产品的新鲜样品相比，其N-亚硝胺浓度更高[6]。这说明N-亚硝胺的形成是化妆品保质期的限制因素，我们应对其进行评估并将其纳入化妆品的常规安全性评估中。

在美国和欧盟，消费品制造商在产品商业化之前必须确保产品的安全性，在产品标签上列出所有成分并遵守有关成分和产品的所有既有限制条款。产品的任何潜在风险都会作为安全性评估的一部分进行评价。在欧盟，2013年生效欧盟指令1223/20095提高了对化妆品安全性的要求，并且为该领域的所有分析人员简化了分析方案。它提供了稳定且受到国际认可的分析方案，在加强产品安全的同时还考虑到了最新的技术进展。EU 1223/2009的附件 II 和附件 III 规定，化妆品中N-亚硝胺(及其它污染物)的浓度不得超过50 µg/kg。在美国，《食品、药品和化妆品法案》(1938)和《公平包装与标签法》(1966)规定，任何含有N-亚硝胺的化妆品均被视作掺假产品，因此美国FDA有权据此查封和清除市场上的此类产品[7,8]。在亚洲，东盟国家效仿上述欧盟法规制定了《东盟化妆品指令》[9]。中国、印度和日本也通过相同的方式监管化妆品。

欧盟指令2009/48/EC涉及可能被放入儿童口中的玩具、指画颜料和弹性体材料的安全性[10]。该指令还规定，N-亚硝胺的累积总量不得超过50 µg/kg。该法规适用于任何包含弹性体材料的玩具或设备，例如儿童安抚奶嘴和奶瓶奶嘴。采用此方法分析婴儿奶瓶奶嘴中的N-亚硝胺时的适用性也采用欧盟标准草案prEN 71 – 12:2012:E中的样品制备方案进行了测试。过去，用于分析化妆品配方和弹性体材料中N-亚硝胺的方法包括GC-TEA、GC-MS、HPLC与比色检测器联用的方法以及LC-ESI-MS11-15。LC方法的运行时间为12～35 min，而GC方法的运行时间为20～40 min。据报道，TEA分析非常耗时，因此样品通量非常有限。此外，它通常只适用于分析挥发性亚硝胺。

本应用纪要介绍了采用Waters® ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S micro联用的方法对此前曾在化妆品和个人护理产品配方中检出的8种挥发性及非挥发性N-亚硝胺进行的分析。与之前的方法相比，该方法具有若干优点，例如选择性和灵敏度均优于比色法和ESI-MS方法等等。此方法能够定量分析浓度在法规限值50 µg/kg以下的亚硝胺。其运行时间比HPLC和GC方法更短，有效节省了时间和成本。此方法采用RADAR数据采集方法，能够同时挖掘采集到全扫描数据，从而搜索其它污染物。

实验

采用Qiang等人[11]开发和验证的提取方案制备化妆品和个人护理产品样品以待分析。对样品进行超声提取处理之后，使用Oasis HLB SPE小柱净化样品。使用甲醇:丙酮(1:1)作为超声提取介质制备液体和凝胶样品。使用乙醇:丙酮(4:1)制备固体或半固体化妆品样品。

超声提取方案

- 借助涡旋混合，将1 g个人护理产品样品溶解于5.0 mL适用的提取介质中，然后超声处理30 min。
- 所得的提取混合液以6000 rcf离心15 min。
- 在40 °C的恒定氮气流中将2 mL上清液挥干，然后将其复溶于2 mL 30%甲醇水溶液中以备固相萃取处理。

SPE方案

- 向含有200 mg吸附剂的6 cc^3 Oasis HLB SPE小柱(部件号WAT106202)中灌注6 mL甲醇，然后灌注6 mL超纯水。
- 将样品加载到SPE小柱中，用3 mL 30%甲醇水溶液进行清洗。然后用6 mL MeOH从小柱中萃取出样品。
- 在N2下挥干样品，将其复溶于1 mL 2.5%甲醇水溶液中，然后使用0.2 µm的滤膜过滤，以备进样。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
运行时间:	9.1 min
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3
	1.7 µm, 2.1 x 100 mm
柱温:	40 °C
样品温度:	5 °C
流动相A:	水(含0.1%甲酸)
流动相B:	甲醇(含0.1%甲酸)
流速:	0.3 mL/min
进样体积:	20 µL

流动相梯度详见表1。

	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
1	初始	0.30	97.5	2.5	–
2	1.0	0.30	97.5	2.5	6
3	2.0	0.30	50.0	50.0	6
4	3.0	0.30	50.0	50.0	6
5	3.5	0.30	2.5	97.5	6
6	6.0	0.30	2.5	97.5	6
7	6.1	0.30	97.5	2.5	6

表1. ACQUITY I-Class的流动相梯度。

MS条件

MS系统:	Xevo TQ S-micro
电离模式:	APCI正离子模式
电晕针电压:	15 V
离子源温度:	150 °C
探头温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1200 L/h
锥孔气流速:	200 L/h
采集模式:	配备RADAR的MRM

使用MassLynx软件的IntelliStart™功能自动优化电离参数和离子对。IntelliStart是MassLynx的功能之一，能够提升易操作性并减少用户之间的差异，可用于监控系统健康状态、执行QC检查和协助方法开发。在本例中，我们利用IntelliStart的自动参数调谐功能来确定最优电离参数，例如施加于母离子的锥孔电压和MRM通道的碰撞气体能量等。表2汇总了所测分析物的最优参数，同时给出了有关分析物名称、化学式和CAS号的信息。

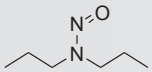
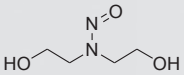
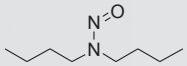
名称，化学式，CAS号	结构	保留时间 (min)	锥孔电压 (V)	通道	碰撞能量
N-亚硝基二甲胺，$C_2H_6N_2O$, 62-75-9		2.1	30	75.0→58.0*	13
N-亚硝基二乙胺，$C_4H_{12}N_2O$, 55-18-5		3.1	24	103.1→47.0	15
				103.1→75.0*	9
N-亚硝基二丙胺，$C_6H_{14}N_2O$, 621-64-7		4.2	26	131.1→43.1	11
				131.1→89.1*	8
N-亚硝基二乙醇胺，$C_4H_{10}N_2O_3$, 1116-54-7		1.4	10	135.0→74.0	8
				135.0→104.0*	4
N-亚硝基二丁胺，$C_8H_{18}N_2O$, 924-16-3		4.5	26	159.1→57.1*	12
				159.1→103.0	9
N-亚硝基吡咯烷，$C_4H_8N_2O$, 930-55-2		2.8	44	101.0→40.5	19
				101.0→55.0*	13
N-亚硝基哌啶，$C_5H_{10}N_2O$, 100-75-4		3.2	36	115.1→40.9	25
				115.1→69.1*	17
N-亚硝基吗啉，$C_4H_8N_2O_2$, 59-89-2		2.6	28	117.0→45.0*	13
				117.0→85.9	9

表2.此前曾在消费品配方中检出的脂肪族、环状和杂环N-亚硝胺、其结构、相关CAS号和经验化学式、预期保留时间、锥孔电压、MRM通道以及相关的碰撞能量值。

**表示定量通道。*

仪器控制、数据采集和结果处理

利用MassLynx软件控制ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQS-micro，并进行数据采集。使用TargetLynx™应用软件执行数据定量分析。

结果与讨论

将MRM模式的Xevo TQ S-micro (APCI正离子电离模式) 与ACQUITY I-Class系统联用，分析此前曾在化妆品配方中检出的8种N-亚硝胺。

如前所述，使用MassLynx软件的IntelliStart功能优化各分析物的MRM通道。LC条件 (色谱柱填料、梯度设置、进样体积等) 基于Al-Kaseem等人此前的研究[16]并经过了优化，以改善运行时间、洗脱顺序和信号强度。

图1所示为标准品的示例色谱图，标准品采用化妆品基质制备，其中的目标分析物含量相当于法规限值50 µg/kg。

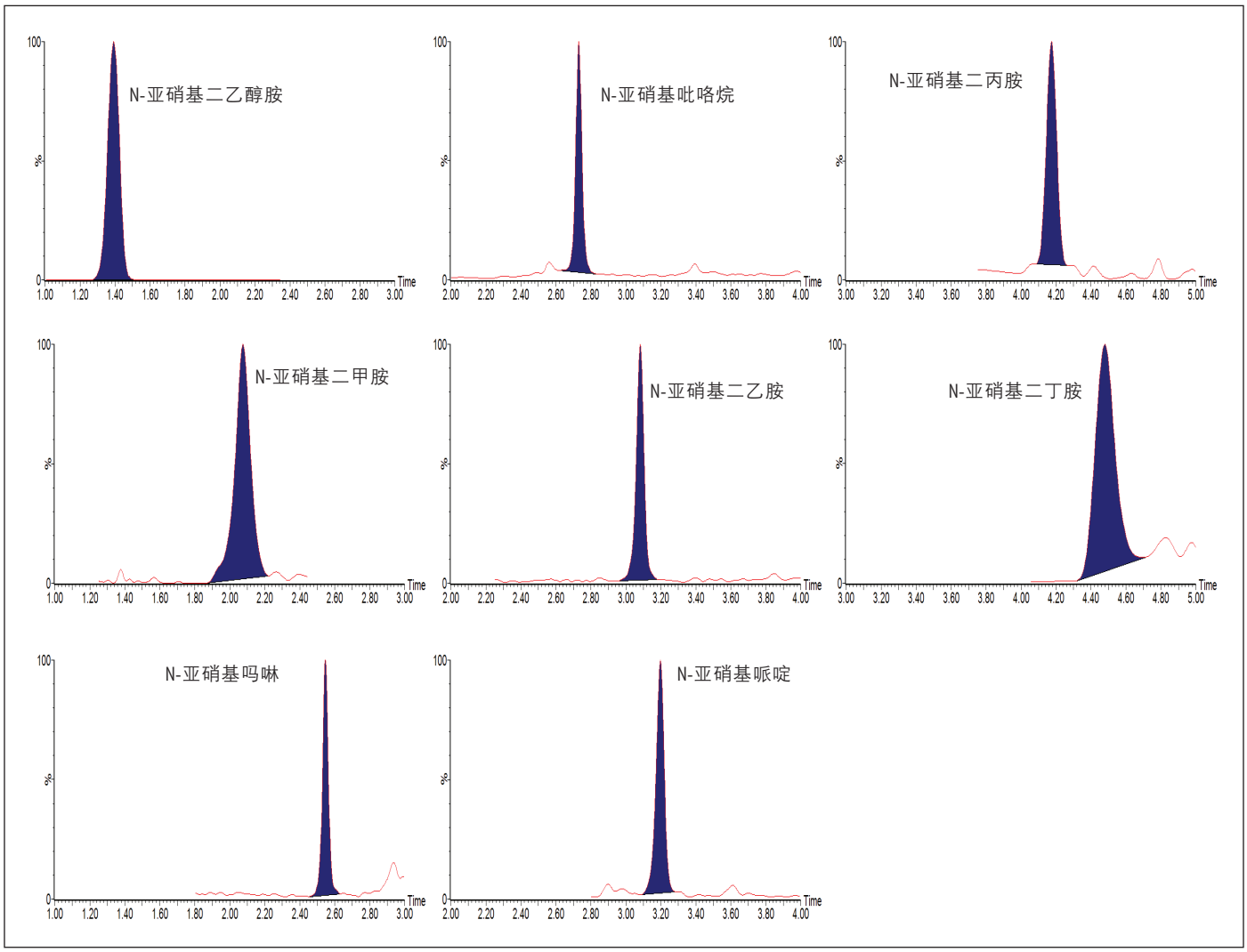


图1. 本研究分析的8种N-亚硝胺的基质加标标准品 (加标浓度为法规限值50 µg/kg) 的示例色谱图。

为所有被测化合物制备0.001 ppm至0.5 ppm的混合校准标准品并进行分析。结果表明，所有亚硝胺在0.01 ppm至0.5 ppm (法规限值0.05 ppm的10倍) 的浓度范围内均呈线性响应。所有曲线的R2值均大于0.99，且基质效应小于8%。

化妆品和个人护理产品样品的分析

采用各种化妆品和个人护理产品(包括洗发水、洗手液和口红)制备样品。采用实验部分详述的方法测试所有样品中是否含有N-亚硝胺，结果发现样品中均不含N-亚硝胺。为了测试方法的适用性，将浓度为规定限值(或近似值)的亚硝胺加标至空白基质样品中。在下面图2所示的示例中，洗发水样品在制备完成后加标浓度为0.06 ppm(ng/mL)的N-亚硝基二丙胺。经超声萃取和SPE后，使用TargetLynx方法对样品与基质标准品进行分析以测定N-亚硝基二丙胺浓度。

使用TargetLynx方法对数据进行定量分析以测定加标样品中N-亚硝基二丙胺的含量。图1展示了TargetLynx中生成的加标洗发水样品的结果，以及用于加标样品定量分析的基质标准品的校准曲线。图1还展示了N-亚硝基二丙胺用于确证的MRM通道。经过计算，该方法得到所有加标样品结果的准确度在待测配方(包括洗发水、洗手液和口红)预期结果的98%至102%范围内。

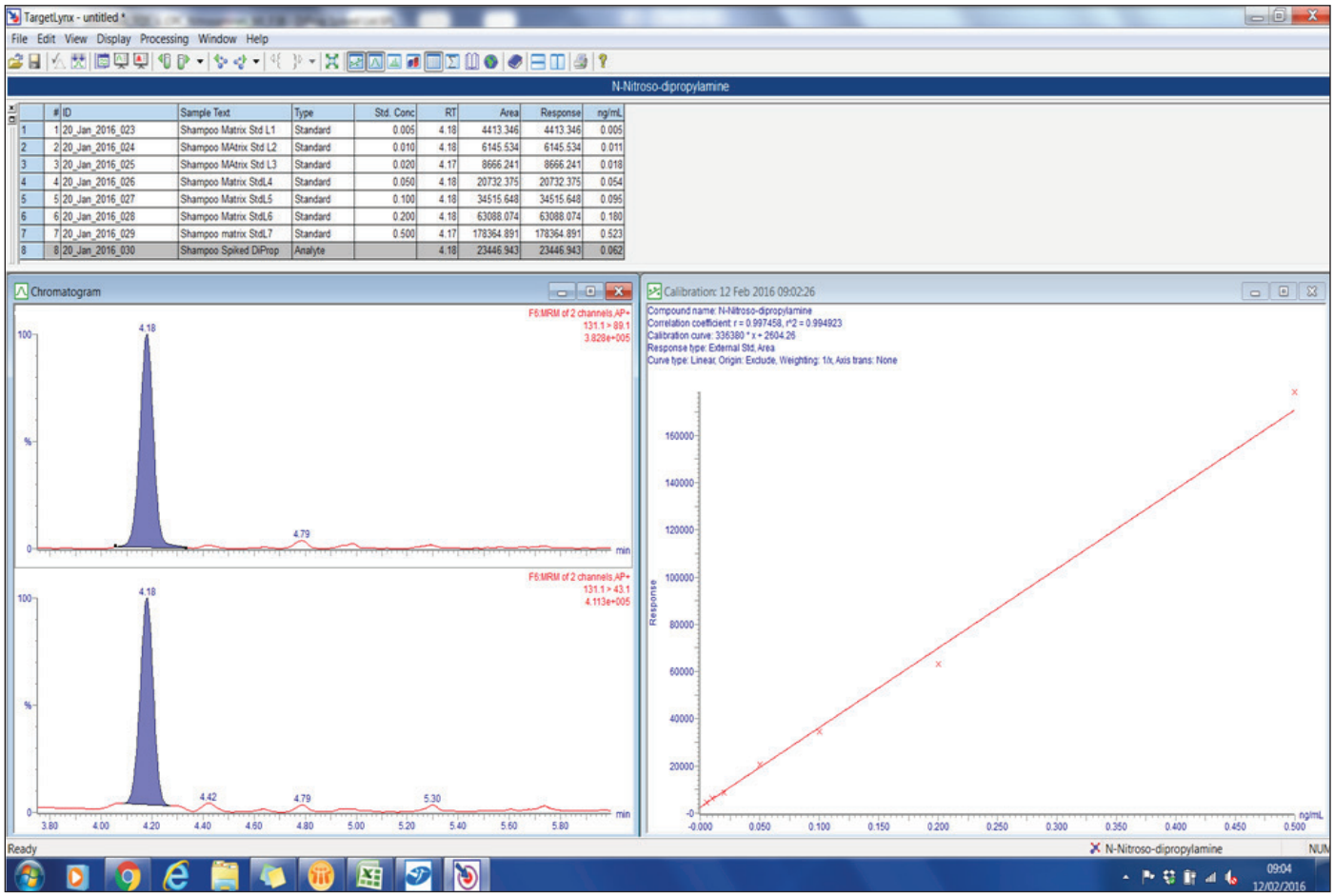
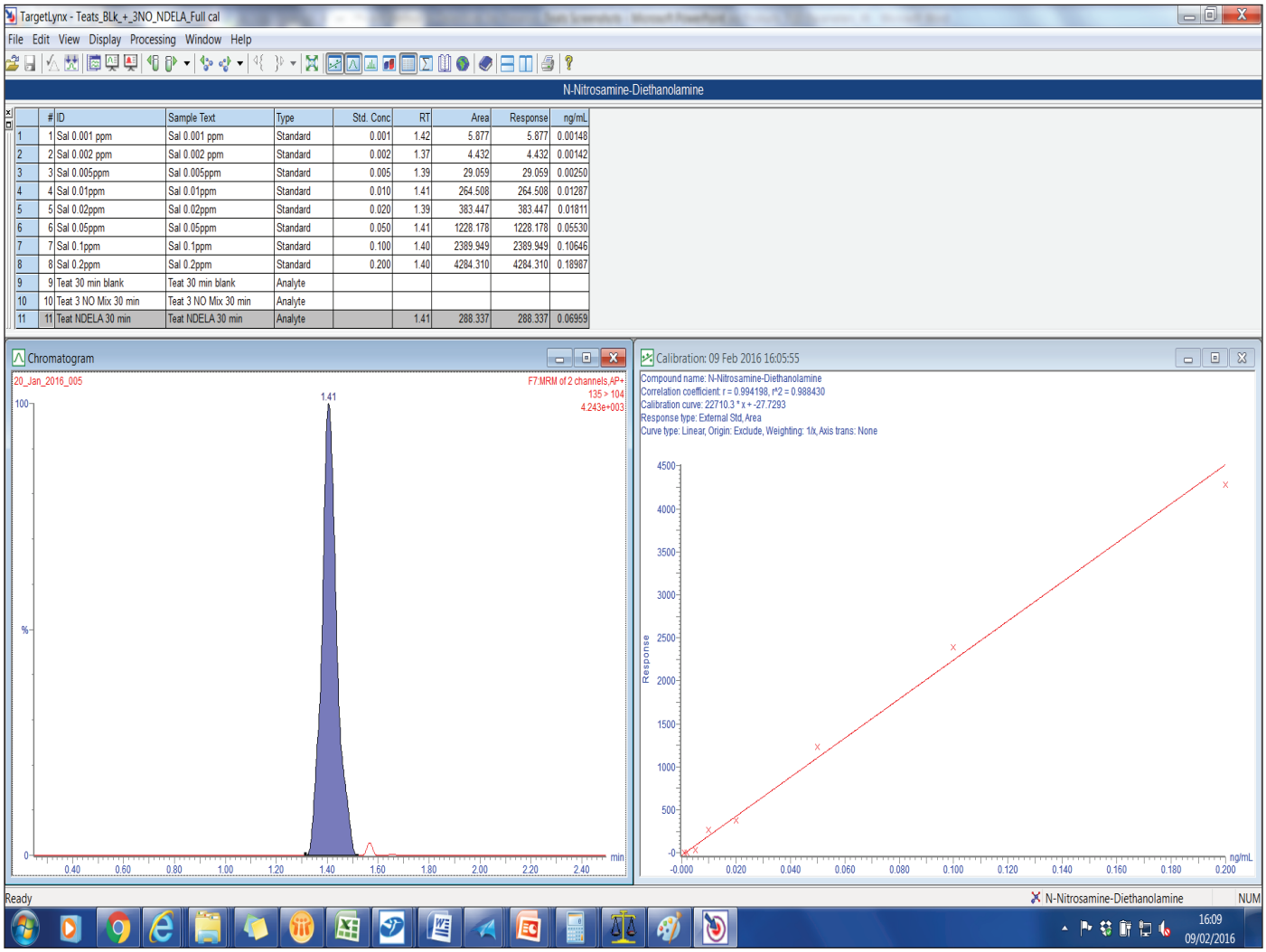


图2. 加标有N-亚硝基二丙胺的洗发水样品的TargetLynx结果汇总。

婴儿奶瓶奶嘴的分析

根据欧盟标准prEN 71 – 12:2012:E中制定的草案对购自一家领先制造商的无硅奶嘴进行检测。将构成奶嘴的10 cm^2弹性体材料浸没于含有亚硝酸盐的合成唾液中。研究证实，硝酸盐能够在酸性条件(例如人胃中)下将仲胺转化为N-亚硝胺[17]。将奶嘴样品浸泡30 min后根据方法对所得的上清液进行分析，无需进一步样品制备。

分析未掺杂的浸泡样品以确定其中是否存在亚硝胺。发现样品中含有痕量N-亚硝基二丁胺，其浓度为规定限值的1/10左右。为进一步测试该方法的有效性，制备更多奶嘴样品并加标浓度为规定限值1.4倍的N-亚硝基二乙醇胺。还向样品中加标三种不同N-亚硝胺的混合物，每种N-亚硝胺的浓度均低于规定限值，但累积浓度高于50 µg/kg的规定限值。图3展示了N-亚硝基二乙醇胺加标样品的TargetLynx结果汇总，包括进样的计算结果、加标样品的色谱图以及用于计算的N-亚硝基二乙醇胺校准曲线。



#	ID	Sample Text	Type	Std. Conc	RT	Area	Response	ng/mL
1	Sal 0.001 ppm	Sal 0.001 ppm	Standard	0.001	1.42	5.877	5.877	0.00148
2	Sal 0.002 ppm	Sal 0.002 ppm	Standard	0.002	1.37	4.432	4.432	0.00142
3	Sal 0.005ppm	Sal 0.005ppm	Standard	0.005	1.39	29.059	29.059	0.00250
4	Sal 0.01ppm	Sal 0.01ppm	Standard	0.010	1.41	264.508	264.508	0.01287
5	Sal 0.02ppm	Sal 0.02ppm	Standard	0.020	1.39	383.447	383.447	0.01811
6	Sal 0.05ppm	Sal 0.05ppm	Standard	0.050	1.41	1228.178	1228.178	0.05530
7	Sal 0.1ppm	Sal 0.1ppm	Standard	0.100	1.40	2389.949	2389.949	0.10646
8	Sal 0.2ppm	Sal 0.2ppm	Standard	0.200	1.40	4284.310	4284.310	0.18987
9	Teat 30 min blank	Teat 30 min blank	Analyte					
10	Teat 3 NO Mix 30 min	Teat 3 NO Mix 30 min	Analyte					
11	Teat NDELA 30 min	Teat NDELA 30 min	Analyte		1.41	288.337	288.337	0.06959

图3. NDELA加标的婴儿奶瓶奶嘴样品的TargetLynx结果汇总。

由NDELA加标样品和低浓度加标样品生成的TargetLynx样品定量分析报告如图4所示。

Name: 20_Jan_2016_003, Date: 20-Jan-2016, Time: 10:14:55, ID: Teat 3 NO Mix 30 min, Description: Teat 3 NO Mix 30 min

#	Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	ng/mL
1	N-Nitrosodimethyl amine	75 > 58					
2	N-Nitroso-diethylamine	103.1 > 75	3.09	576.317		576.317	0.018
3	N-Nitroso-dipropylamine	131.1 > 89.1	4.19	1685.821		1685.821	0.022
4	N-Nitroso-dibutylamine	159.1 > 57.1	4.54	3012.368		3012.368	0.008
5	N-Nitrosamine-Diethanolami...	135 > 104					
6	N-Nitroso-morpholine	117 > 45					
7	N-Nitroso-piperidine	115.1 > 69.1	3.21	938.489		938.489	0.017
8	N-Nitroso-pyrollidine	101.1 > 55					

Name: 20_Jan_2016_005, Date: 20-Jan-2016, Time: 10:34:44, ID: Teat NDELA 30 min, Description: Teat NDELA 30 min

#	Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	ng/mL
1	N-Nitrosodimethyl amine	75 > 58					
2	N-Nitroso-diethylamine	103.1 > 75					
3	N-Nitroso-dipropylamine	131.1 > 89.1					
4	N-Nitroso-dibutylamine	159.1 > 57.1	4.54	2485.766		2485.766	0.006
5	N-Nitrosamine-Diethanolami...	135 > 104	1.41	288.337		288.337	0.070
6	N-Nitroso-morpholine	117 > 45					
7	N-Nitroso-piperidine	115.1 > 69.1					
8	N-Nitroso-pyrollidine	101.1 > 55					

图4. TargetLynx汇总报告详细列出了婴儿奶瓶奶嘴中存在的N-亚硝胺。

过期消费品样品的RADAR分析

如前所述，研究人员已注意到个人护理产品配方中的N-亚硝胺浓度可能会在储存过程中升高[6]。测定随时间推移而产生的所有N-亚硝胺有助于制造商确定其产品的安全保质期。

为此，利用本文方法检测全新口红配方和同一品牌的旧样品中亚硝胺的存在情况。除该方法中概述的对八种亚硝胺的目标搜索外，利用Xevo TQ-S micro仪器的RADAR功能可同时记录多个MRM通道并扫描指定m/z范围内的实验结果。图5展示了新口红样品和过期口红样品TIC色谱图的对比。TIC中保留时间约4.55分钟处的额外色谱峰不对应于任何N-亚硝基二丁胺，因为该化合物MRM通道色谱图的4.55分钟处没有任何峰。

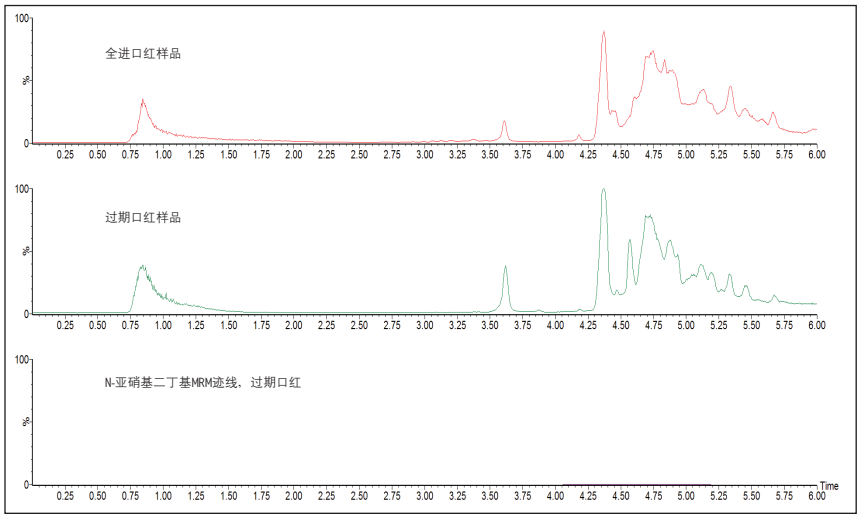


图5. 全新口红配方和过期口红配方样品的TIC色谱图以及N-亚硝基二丁胺的MRM通道色谱图，表明过期样品中不含这种化合物。

在使用RADAR数据采集模式进行分析时可对预期分析物进行准确定量，同时可研究样品中存在的未知物，数据完整性无任何损失。图6同样展示了新口红样品和过期口红样品TIC色谱图。在RADAR模式下运行时，所采集的数据可用于分析相关质谱图以确定峰保留时间观测值处的任何差异。图6中的放大质谱图展示了与新样品质谱图相比，过期样品m/z 199处明显存在一种离子。提取该离子得到图6所示的提取离子色谱图，该离子色谱峰对应的保留时间为4.55分钟。文献检索结果表明，如果过期样品因形成N-亚硝胺而出现色谱峰，则m/z 199可能对应于亚硝基二苯胺的[M+H]+离子。在后续研究中，计划利用高分辨率质谱(HRMS)确认过期口红样品中存在的未知离子归属。

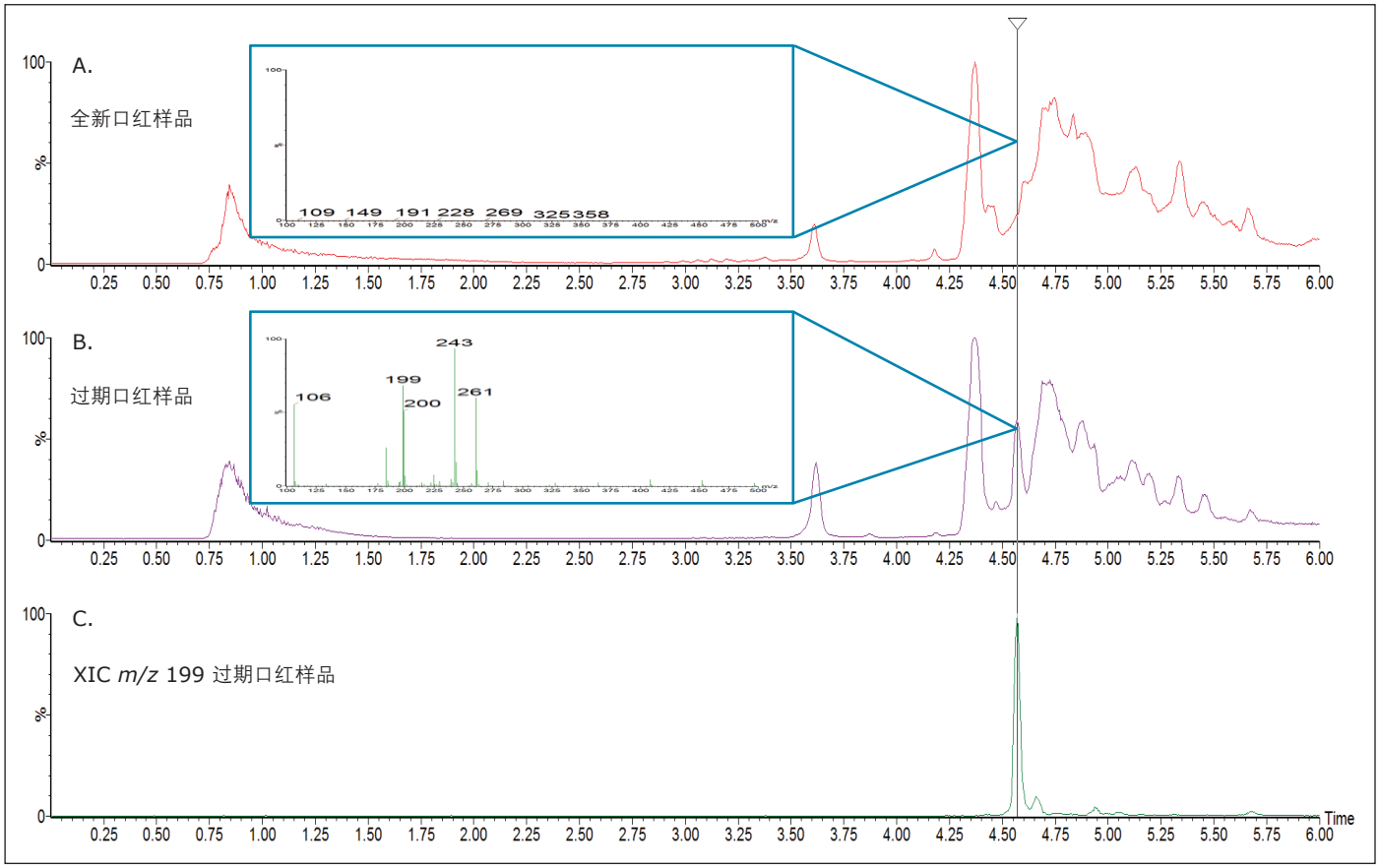


图6. 使用RADAR数据采集研究存在的未知物：A.全新口红样品的TIC以及4.5至4.55 min的平均质谱图；B.过期口红样品的TIC以及4.5至4.55 min的平均质谱图；C.过期口红样品质谱图中m/z 199处离子的XIC。

结论

本文开发出一种快速检测和定量分析消费品配方中八种常见亚硝胺的LC-APCI-MS方法。化妆品配方和弹性塑料玩具中浓度不超过规定限值50 µg/kg的所有分析物均可得到定量。本文对三种化妆品配方和一种弹性体材料中是否含有亚硝胺进行了测试。对洗发水和洗手液配方的测试结果表明其中不含亚硝胺。实验中发现所测试的婴儿奶瓶奶嘴中含有浓度低于规定限值的痕量N-亚硝胺。结合RADAR数据采集的方法能够挖掘全扫描质谱数据中可能存在的其他亚硝胺，结果表明过期化妆品配方中含有其他N-亚硝胺。

参考文献

1. Ashley L M, Halver J E. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cell carcinoma in rainbow trout. *J National Cancer Institute*. 41 (2): 531–552, 1968.
2. Barnes J M, Magee P N. Some Toxic Properties of Dimethylnitrosamine. *British Journal of Industrial Medicine*. 11 (3): 167–174, 1954.
3. Jakszyn P, González C A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology*. 12 (27): 4296, 2006.
4. Douglass M, Kabacoff B, Anderson G, Cheng M. The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *J Soc Cosmet Chem*. 29 (9): 581–606, 1978.
5. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament. *Official Journal of the European Union, L342* (22.12.2009), 59–209, 2009.
6. Matyska M T, Pesek J J, Yang L. Screening method for determining the presence of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by open-tubular capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. 887 (1): 497–503, 2000.
7. Administration, U. S. F. D., Fed Reg 44. 1979, 21365.
8. Administration, U. S. F. D., Fed Reg 58. 1983, 28288–28292.
9. http://aseancosmetics.org/docdocs/directive.pdf
10. Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the safety of toys. *Official Journal Journal Of The European Union*. L170 (30.6.2009): 1–37, 2009.
11. Ma Q, Xi H W, Wang C, Bai H, Xi G C, Su N, Xu L Y, Wang J B. Determination of Ten Volatile Nitrosamines in Cosmetics by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 39 (8): 1201–1207, 2011.
12. Flower C, Carter S, Earls A, Fowler R, Hewlins S, Lalljie S, Lefebvre M, Mavro J, Small D, Volpe N. A method for the determination of N-nitrosodiethanolamine in personal care products – collaboratively evaluated by the CTPA Nitrosamines Working Group. *Intl J Cosmetic Sci.* 28 (1): 21–33, 2009.
13. Schothorst R, Somers H. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by LC–MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 381 (3): 681–685, 2005.
14. Schothorst R C, Stephany R W. Occurrence of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics from the Dutch market. *Intl J Cosmetic Sci*. 23 (2): 109–114, 2001.
15. Stepanov I, Carmella S G, Hecht S S, Duca G. Analysis of Tobacco-Specific Nitrosamines in Moldovan Cigarette Tobacco. *J Agricultural and Food Chemistry*. 50 (10): 2793–2797, 2002.
16. Al-Kaseem M, Al-Assaf Z, Karabeet F O. A Rapid, Validated RP-HPLC Method for the Determination of Seven Volatile N-nitrosamines in Meat. *Pharmacology & Pharmacy*. 5(3): 11, 2014.
17. Krul C A, Zeilmaker M J, Schothorst R C, Havenaar R. Intragastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food and Chemical Toxicology*. 42 (1): 51–63, 2004.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, Oasis, MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。
RADAR, IntelliStart和TargetLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2016年 沃特世公司。中国印刷。2016年4月 720005664ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com