

化粧品中亞硝胺類化合物之檢驗方法

Method of Test for Nitrosamines in Cosmetics

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於化粧品中 *N*-nitrosodiethanolamine (NDELA) 等8項亞硝胺類化合物(品項見附表)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS) 分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：大氣壓力化學游離(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Nucleodur Sphinx RP，3 μm ，內徑3 mm $\times$ 20 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達3000 $\times g$ 以上者。
 - 2.2. 試藥：甲醇、去離子水及甲酸均採用液相層析質譜級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；NDELA等8項對照用標準品；*N*-nitrosodiethanolamine- d_8 (NDELA- d_8)等7項同位素內部標準品(品項見附表)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：5 mL，褐色。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL，PP材質，褐色。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 5%甲醇溶液：
取甲醇與去離子水以5：95 (v/v)之比例混勻。
 - 2.4.2. 含1%甲酸之5%甲醇溶液：
取甲酸與5%甲醇溶液以1：99 (v/v)之比例混勻。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：
取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，供作移動相溶液A。
 - 2.5.2. 移動相溶液B：
取甲酸1 mL，加甲醇使成1000 mL，供作移動相溶液B。
 - 2.6. 內部標準溶液之配製：
取適量NDELA- d_8 等7項同位素內部標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並稀釋至100 $\mu\text{g/mL}$ ，作為內部標準原液，冷凍避光貯

存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至5 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取NDELA等8項對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液與內部標準溶液混合，以含1%甲酸之5%甲醇溶液稀釋至0.5~50 ng/mL (含內部標準品濃度25 ng/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

將檢體混勻後，取約0.25 g，精確稱定，加入含1%甲酸之5%甲醇溶液4 mL及內部標準溶液25 µL，混合均勻，經超音波振盪15分鐘，以含1%甲酸之5%甲醇溶液定容至5 mL，置於離心管中，以3800 ×g離心5分鐘，取上清液經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就各亞硝胺類化合物與內部標準品之波峰面積比，與對應之亞硝胺類化合物濃度，分別製作標準曲線。液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Nucleodur Sphinx RP，3 µm，內徑3 mm × 20 cm。

層析管溫度：40°C。

樣品槽溫度：15°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件，進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 3.0	95 → 95	5 → 5
3.0 → 8.0	95 → 0	5 → 100
8.0 → 10.0	0 → 0	100 → 100
10.0 → 11.0	0 → 95	100 → 5
11.0 → 16.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.6 mL/min。

注入量：10 µL。

離子化模式：APCI正離子。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.0 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：120°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)
 。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage, CV)與碰撞能量(collision energy)如附表。

註：上述測定條件分析不適時，可依使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各亞硝胺類化合物之含量(µg/kg)：

$$\text{檢體中各亞硝胺類化合物之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各亞硝胺類化合物之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(5 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

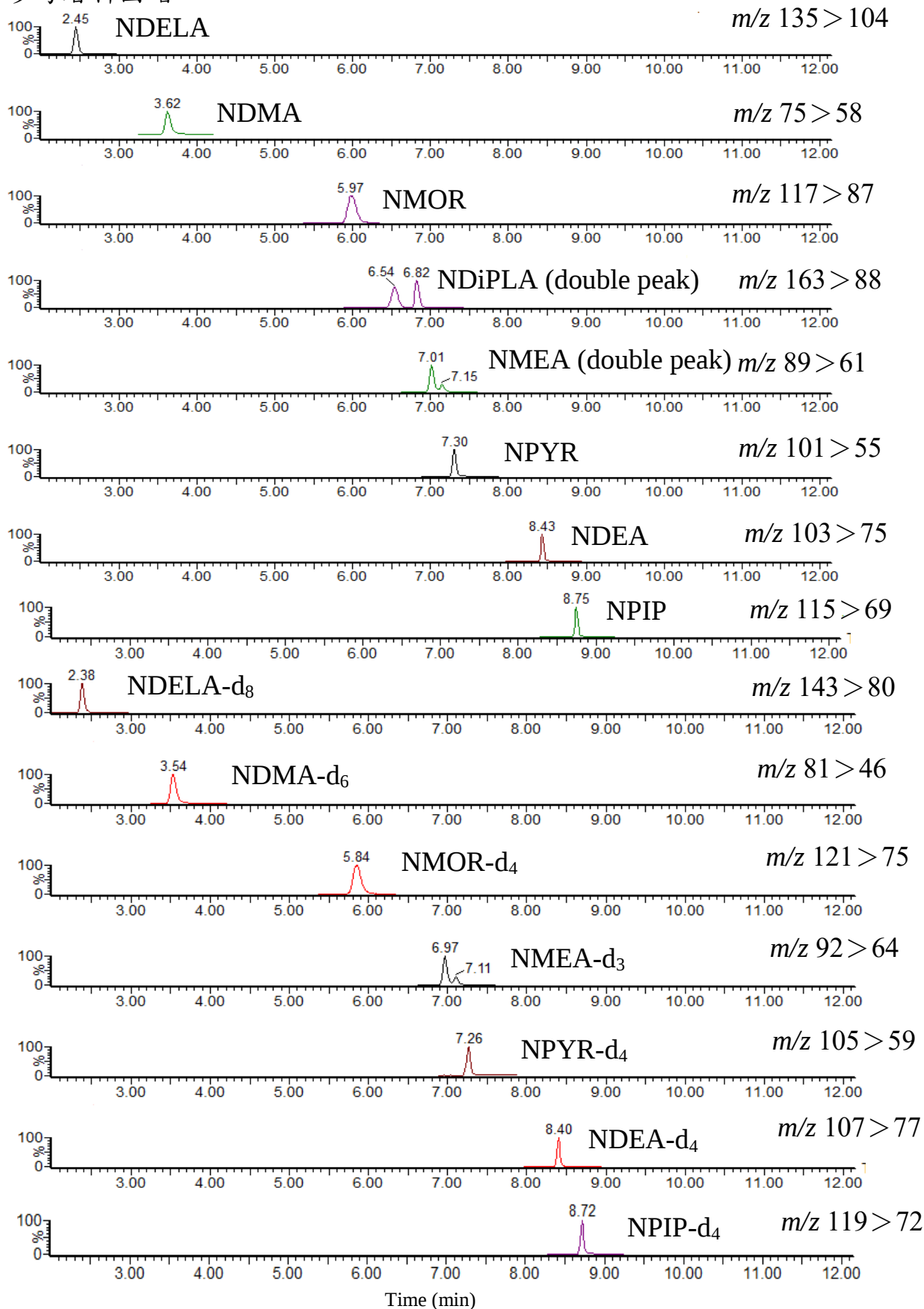
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，NDELA等8項亞硝胺類化合物均為10 µg/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2020. Determination of polar *N*-nitrosamines in cosmetic products.
2. ISO. 2014. Cosmetics-Analytical methods-Nitrosamines: Detection and determination of *N*-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC-MS-MS. ISO 15819.
3. Ripollés, C., Pitarch, E., Sancho, J. V., López, F. J. and Hernández, F. 2011. Determination of eight nitrosamines in water at the ng L⁻¹ levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 702: 62-71.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析NDELA等8項對照用標準品及NDELA-d₈等7項同位素內部標準品之MRM圖譜

附表、NDELA等8項亞硝胺類化合物及同位素內部標準品之多重反應偵測模式參數

項次	分析物	定量離子對			定性離子對			內部標準品
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	
1	<i>N</i> -Nitrosodiethanolamine (NDELA)	135 > 104	14	4	135 > 74	14	8	NDELA-d ₈
2	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (NDEA)	103 > 75	20	10	103 > 47	20	14	NDEA-d ₄
3	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (NDMA)	75 > 58	42	10	75 > 43	42	12	NDMA-d ₆
4	<i>N</i> -Nitrosodiisopropanolamine (NDiPLA)	163 > 88	10	12	163 > 70	10	22	NMOR-d ₄
5	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine (NMEA)	89 > 61	24	10	89 > 43	24	8	NMEA-d ₃
6	<i>N</i> -Nitrosomorpholine (NMOR)	117 > 87	24	10	117 > 86	24	10	NMOR-d ₄
7	<i>N</i> -Nitrosopiperidine (NPIP)	115 > 69	24	12	115 > 41	24	18	NPIP-d ₄
8	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine (NPYR)	101 > 55	24	12	101 > 41	24	18	NPYR-d ₄
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiethanolamine-d ₈ (NDELA-d ₈)	143 > 80	8	10	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine-d ₄ (NDEA-d ₄)	107 > 77	8	8	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine-d ₆ (NDMA-d ₆)	81 > 46	28	10	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine-d ₃ (NMEA-d ₃)	92 > 64	20	10	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosomorpholine-d ₄ (NMOR-d ₄)	121 > 75	14	12	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosopiperidine-d ₄ (NPIP-d ₄)	119 > 72	14	15	—	—	—	—
I.S.	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine-d ₄ (NPYR-d ₄)	105 > 59	14	10	—	—	—	—