

doi: 10.19969/j.fxcsxb.23051602

超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中15种N-亚硝胺化合物

汪毅¹, 梁文耀¹, 何国山¹, 陈张好², 周智明²,
吴谦¹, 席绍峰¹, 谭建华^{1*}

(1. 广州质量监督检测研究院, 国家化妆品质量检验检测中心(广州), 广东 广州 511447;
2. 广东省药品检验所, 广东 广州 510663)

摘要: 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)建立了化妆品中15种痕量N-亚硝胺化合物的分析方法。水剂样品以水或乙腈分组超声提取, 膏霜乳液样品采用亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀大分子或者饱和氯化钠-乙腈盐析分组处理后, 以Agilent Poroshell 120 SB-Aq(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm)色谱柱分离, 经大气压化学电离源(APCI)电离, 多反应监测模式检测, 以同位素内标法定量。结果表明, 15种N-亚硝胺化合物在相应质量浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.995$), 检出限和定量下限分别为5~15 ng/g和15~45 ng/g。水、乳、膏霜3种化妆品基质在25、50、100 ng/g加标水平下的平均回收率为88.0%~111%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$)为1.4%~9.8%。该方法用于市售化妆品检测, 发现13批次样品检出N-亚硝基二乙醇胺(NDELA), 其中1批次超限量值。方法的专属性强, 灵敏度高, 精密度好, 解决了N-亚硝胺化合物稳定性差、易被干扰等问题, 适用于化妆品中15种N-亚硝胺化合物的痕量测定。

关键词: N-亚硝胺化合物; 化妆品; 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS); 大气压化学电离源
中图分类号: O657.63; O623.732 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2023)11-1469-10

Determination of Fifteen N-nitrosamine Compounds in Cosmetics by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Yi¹, LIANG Wen-yao¹, HE Guo-shan¹, CHEN Zhang-hao², ZHOU Zhi-ming²,
WU Qian¹, XI Shao-feng¹, TAN Jian-hua^{1*}

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Quality Supervision and Testing Center for Cosmetics(Guangzhou), Guangzhou 511447, China; 2. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) method was established for detecting 15 trace N-nitrosamine compounds in cosmetics. The final established method involved ultrasonic extraction of cosmetics using water or acetonitrile for different compounds. The samples were treated with potassium ferrocyanide-zinc acetate solution for precipitating macromolecules or saturated sodium chloride-acetonitrile for salting out. An Agilent Poroshell 120 SB-Aq(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) chromatography column was used for separation, followed by atmospheric pressure chemical ionization(APCI) source and multiple reaction monitoring mode detection in the isotope internal standard method for quantification. The result showed good linearity ($r^2 > 0.995$) for the 15 N-nitrosamine compounds in their respective concentration ranges, with detection and quantitation limits of 5-15 ng/g and 15-45 ng/g, respectively. The average recoveries for the three cosmetic matrices (aqueous, emulsion, cream) at spiked levels of 25, 50, 100 ng/g were between 88.0% and 111%, with relative standard deviations (RSD, $n=6$) of 1.4%-9.8%. The method was applied to the detection of commercial cosmetics and N-nitrosodiethanolamine(NDELA) was detected in 13 batches, with one batch exceeding the limit. The strong specificity, high sensitivity, and good precision made the method could solve the problems of poor stability and easy interference of

收稿日期: 2023-05-16; 修回日期: 2023-06-10

基金项目: 广东省药品监督管理局化妆品风险评估重点实验室专项(2021ZDZ03); 广东省市场监督管理局科技项目(2022CZ06)

* 通讯作者: 谭建华, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 色谱-质谱检测技术研究, E-mail: tanjianhua0734@aliyun.com

N-nitrosamine compounds, and was suitable for the trace determination of 15 N-nitrosamine compounds in cosmetics.

Key words: N-nitrosamine compounds; cosmetics; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source

N-亚硝胺化合物是一类具有N-亚硝基结构的化合物, 因取代基的不同, 形成了种类繁多的同系物, 目前已发现超过300种^[1]。N-亚硝胺化合物大多具有致癌性^[2], 在饮用水、食品、烟草、化妆品中均有N-亚硝胺化合物检出情况^[3-6], 对人体健康构成威胁。我国《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[7]与欧盟化妆品法规(EC)No 1223/2009^[8]均将N-亚硝胺化合物列入禁用目录, 并规定化妆品产品中N-亚硝胺化合物不得超过50 ng/g。化妆品中N-亚硝胺化合物的主要来源为原料直接带入或原料经亚硝化反应产生。

文献报道化妆品中可能检出的N-亚硝胺化合物有N-亚硝基二乙醇胺(NDELA)、N-亚硝基二甲基胺(NDMA)等^[6, 9-14], 检测方法主要有气相色谱-热能分析法(GC-TEA)^[15]、液相色谱-热能分析法(LC-TEA)^[16]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[3, 5, 10, 12-14]、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)^[6, 9, 11, 17]、液相色谱-高分辨质谱法(LC-HRMS)^[4, 18]、气相色谱-高分辨质谱法(GC-HRMS)^[19]。N-亚硝胺化合物通常痕量存在于化妆品中, 对方法的灵敏度要求极高。国家标准GB/T 29669-2013采用GC-MS/MS测定10种N-亚硝胺化合物^[20], 但方法的检出限不能满足50 ng/g的限量要求。另外, 由于N-亚硝胺为一大类化合物, 物化性质差异很大, 现有文献采用LC-MS/MS技术^[3, 5, 10, 12-14]进行测定时主要针对部分性质差异较小的N-亚硝胺化合物, 方法所涉及的化合物覆盖范围不足。因此, 亟需建立准确、灵敏、覆盖范围广的N-亚硝胺化合物检测方法。

本研究根据15种N-亚硝胺化合物的物化性质和不同化妆品的基质特点, 通过系统优化前处理方法和仪器分析条件, 最终采用分组提取, 结合亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀大分子和饱和氯化钠-乙腈盐析等净化方法, 解决了部分N-亚硝胺化合物稳定性差、易被干扰且多组分测定时存在的溶剂效应等问题, 建立了覆盖化妆品中15种N-亚硝胺化合物的UPLC-MS/MS检测方法。方法的准确度、精密度和灵敏度可满足化妆品中N-亚硝胺化合物的痕量检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SCIEX Triple Quad™ 5500+超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪配有大气压化学电离源(APCI)(美国SCIX公司); BSA224S-CW电子天平(德国赛多利斯公司); MS3 basic涡旋振荡器(德国IKA公司); KQ-250DV型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q纯水系统(美国Millipore公司)。

15种N-亚硝胺化合物对照品和5种N-亚硝胺化合物同位素内标信息详见表1, 质量浓度均为100 μg/mL于甲醇, 均购于上海安谱实验科技股份有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国Merck公司); 甲酸(色谱纯, 美国Sigma-Aldrich公司); 亚铁氰化钾、乙酸锌、乙酸铵、氯化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 实验用纯水(18.2 MΩ·cm)由Milli-Q纯水系统制备。化妆品的实际样品为市售产品。

表1 N-亚硝胺化合物对照品和同位素内标信息

Table 1 Reference materials and isotope internal standard compounds information of N-nitrosamine compounds

No.	Compound	CAS	Formula	Molecular weight	log Kow*
1	N-nitrosodiethanolamine(NDELA, N-亚硝基二乙醇胺)	1116-54-7	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₃	134.13	-1.28
2	N-nitrosodimethylamine(NDMA, N-亚硝基二甲基胺)	62-75-9	C ₂ H ₆ N ₂ O	74.05	-0.57
3	N-nitrosomorpholine(NMOR, N-亚硝基吗啉)	59-89-2	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂	116.06	-0.44
4	N-nitrosomethylethylamine(NMEA, N-亚硝基甲基乙基胺)	10595-95-6	C ₃ H ₈ N ₂ O	88.11	0.04
5	N-nitrosopyrrolidine(NPYR, N-亚硝基吡咯烷)	930-55-2	C ₄ H ₈ N ₂ O	100.06	-0.19
6	N-nitrosodiethylamine(NDEA, N-亚硝基二乙基胺)	55-18-5	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	102.08	0.48
7	N-nitrosopiperidine(NPIP, N-亚硝基哌啶)	100-75-4	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	114.08	0.36
8	N-nitrosomethylphenylamine(NMPhA, N-亚硝基-N-甲基苯胺)	614-00-6	C ₇ H ₈ N ₂ O	136.15	1.49
9	N-nitrosodi-N-propylamine(NDPA, N-亚硝基二正丙基胺)	621-64-7	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	130.11	1.36
10	N-nitrosoethylphenylamine(NEPhA, N-亚硝基-N-乙基苯胺)	612-64-6	C ₈ H ₁₀ N ₂ O	150.18	1.98
11	N-nitrosodi-N-butylamine(NDBA, N-亚硝基二正丁基胺)	924-16-3	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	158.14	2.63

(续表 1)

No.	Compound	CAS	Formula	Molecular weight	log Kow*
12	N-nitrosodiphenylamine(NDPhA, N-亚硝基二苯基胺)	86-30-6	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	198.08	3.13
13	N-nitrosodibenzylamine(NDBzA, N-亚硝基二苄基胺)	5336-53-8	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O	226.11	2.78
14	N-nitrosodicyclohexylamine(NDCH, N-亚硝基二环己基胺)	947-92-2	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O	210.17	3.90
15	N-nitroso-N, N-di-(7-methyloctyl) amine(NDiNA, N-亚硝基二异壬基胺)	643014-99-7	C ₁₈ H ₃₈ N ₂ O	298.51	7.07
16	N-nitrosodiethanolamine-D ₈ (NDELA-D ₈ , N-亚硝基二乙醇胺 D ₈)	1173019-53-8	C ₄ D ₈ H ₂ N ₂ O ₃	142.18	—
17	N-nitrosodimethylamine-D ₆ (NDMA-D ₆ , N-亚硝基二甲胺 D ₆)	17829-05-9	C ₂ D ₆ N ₂ O	80.12	—
18	N-nitrosopyrrolidine-D ₄ (NPYR-D ₄ , N-亚硝基吡咯烷 D ₄)	57371-40-1	C ₄ D ₄ H ₄ N ₂ O	104.14	—
19	N-nitrosodiethylamine-D ₄ (NDEA-D ₄ , N-亚硝基二乙基胺 D ₄)	1346603-41-5	C ₄ D ₄ H ₆ N ₂ O	106.16	—
20	N-nitrosodibutylamine-D ₁₈ (NDBA-D ₁₈ , N-亚硝基二正丁基胺 D ₁₈)	1219798-82-9	C ₈ D ₁₈ N ₂ O	176.35	—

*: obtained from EPI Suite™ - Estimation Program Interface v4.11

1.2 标准溶液的配制

分别准确移取 NDELA、NDMA、NMOR、NMEA、NPYR、NDEA、NPIP、NDPA 对照品溶液各 100 μL, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用水定容, 即得质量浓度为 1 000 ng/mL 的混合标准溶液(水); 分别准确移取 NDELA-D₈、NDMA-D₆、NPYR-D₄、NDEA-D₄ 内标溶液 100 μL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用水定容, 配制成质量浓度为 1 000 ng/mL 的混合内标溶液; 用水配制成质量浓度为 1、2、5、10、20、50 ng/mL, 内标浓度为 10 ng/mL 的标准工作溶液(水)。按相同的操作用乙腈配制 NMPPhA、NEPhA、NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA, 内标为 NDBA-D₁₈ 的标准工作溶液(乙腈)。

1.3 样品前处理

1.3.1 水剂样品 称取试样约 0.5 g(精确至 0.000 1 g)于 10 mL 具塞比色管中, 加入 50 μL 混合内标溶液(水), 混匀, 用水定容至 5 mL, 超声提取 10 min, 经微孔滤膜过滤后, 滤液作为待测溶液测定 NDELA、NDMA、NMOR、NMEA、NPYR、NDEA、NPIP、NDPA。

称取试样约 0.5 g(精确至 0.000 1 g)于 10 mL 具塞比色管中, 加入 50 μL 内标溶液(乙腈), 混匀, 用乙腈定容至 5 mL, 超声提取 10 min, 经微孔滤膜过滤后, 滤液作为待测溶液测定 NMPPhA、NEPhA、NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA。

1.3.2 膏霜乳液样品 称取试样约 0.5 g(精确至 0.000 1 g)于 10 mL 具塞塑料离心管中, 加入 50 μL 混合内标溶液(水), 混匀, 用水定容至 5 mL, 超声 10 min, 加入 100 μL 2.5% 亚铁氰化钾溶液和 100 μL 5% 乙酸锌溶液, 混匀, 静置 5 min 后, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液经微孔滤膜过滤后, 滤液作为待测溶液测定 NDELA、NDMA、NMOR、NMEA、NPYR、NDEA、NPIP、NDPA。

称取试样约 0.5 g(精确至 0.000 1 g)于 10 mL 塑料离心管中, 加入 50 μL 内标溶液(乙腈), 混匀, 加入 2 mL 饱和氯化钠水溶液, 混匀后, 加入 5 mL 乙腈, 超声提取 10 min, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液经微孔滤膜过滤后, 滤液作为待测溶液测定 NMPPhA、NEPhA、NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA。

1.4 仪器条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm, 美国安捷伦公司); 流动相: A 为 0.2 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸), B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 2% B; 2.0~10.0 min, 2%~98% B; 10.0~12.0 min, 98% B; 12.0~12.1 min, 98%~2% B; 12.1~15.0 min, 2% B; 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL。电离方式: APCI⁺; 气帘气: 0.172 MPa; 针电流: 3 mA; 源温度: 450 °C; 喷雾气: 0.207 MPa; 碰撞气: 0.062 1 MPa; 扫描模式: 多反应监测模式, 15 种亚硝胺化合物和 5 种同位素内标的质谱参数见表 2。

2 结果与讨论

2.1 质谱参数优化

电喷雾离子源(ESI)一般适用于分子量稍大、极性较强的化合物, 大气压化学电离源(APCI)适用于分子量较小、极性稍弱的化合物。本研究的 15 种 N-亚硝胺化合物的分子量和极性差异较大, 导致其

在ESI和APCI两种离子源的响应有较大差异。由于NDMA、NMEA、NDEA分子量较小且具有一定挥发性,这些化合物在APCI⁺模式下有较高的响应,但在ESI⁺模式下响应非常低。对于NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA等化合物,由于支链的碳链不断加长,分子量变大,在APCI⁺模式下响应强度低于ESI⁺,但仍然能够满足灵敏度要求。进一步分析基质加标样品时发现,膏霜乳液类化妆品在ESI⁺下相比APCI⁺更易出现基质干扰和抑制,特别是对于出峰时间较慢的NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA等化合物,其原因可能是因为化妆品中各类高含量表面活性剂等基质所致。因此,本研究选择APCI⁺模式,并通过进一步优化源温度、喷雾气、针电流参数使15种N-亚硝胺化合物获得最高的仪器灵敏度。

表2 N-亚硝胺化合物和同位素内标的质谱参数
Table 2 MS parameters of N-nitrosamine compounds and isotope internal standards

No.	Compound	Retention time/min	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy /eV	DP/V	Internal standard
1	NDELA	1.15	135.1	74.2 [*] , 104.1	17, 7	20, 20	NDELA-D ₈
2	NDMA	1.74	75.1	43.1 [*] , 58.1	21, 18	25, 25	NDMA-D ₆
3	NMOR	2.32	117.1	87.1 [*] , 86.1	16, 20	20, 20	NDMA-D ₆
4	NMEA	2.94	89.1	61.1 [*] , 43.1	17, 20	20, 20	NDMA-D ₆
5	NPYR	3.57	101.1	55.1 [*] , 59.0	23, 20	25, 25	NPYR-D ₄
6	NDEA	4.53	103.1	75.0 [*] , 47.0	16, 24	40, 40	NDEA-D ₄
7	NPIP	5.02	115.1	69.2 [*] , 41.2	22, 30	20, 20	NDEA-D ₄
8	NMPhA	6.50	137.1	66.1 [*] , 107.1	20, 15	20, 20	NDBA-D ₁₈
9	NDPA	6.70	131.1	89.1 [*] , 43.1	15, 23	20, 20	NDEA-D ₄
10	NEPhA	7.19	151.1	77.0 [*] , 66.0	17, 20	25, 25	NDBA-D ₁₈
11	NDBA	8.07	159.2	57.1 [*] , 103.1	19, 16	25, 25	NDBA-D ₁₈
12	NDPhA	8.11	169.1	66.0 [*] , 77.1	37, 44	40, 40	NDBA-D ₁₈
13	NDBzA	8.39	227.1	91.1 [*] , 65.2	23, 35	40, 40	NDBA-D ₁₈
14	NDCH	8.92	211.2	83.0 [*] , 55.0	25, 35	40, 40	NDBA-D ₁₈
15	NDiNA	10.37	299.3	173.2 [*] , 85.1	25, 30	40, 40	NDBA-D ₁₈
16	NDELA-D ₈	1.13	143.1	80.1	17	20	Internal standard
17	NDMA-D ₆	1.71	81.1	64.1	15	25	Internal standard
18	NPYR-D ₄	3.54	105.1	59.1	22	25	Internal standard
19	NDEA-D ₄	4.50	107.1	77.0	15	40	Internal standard
20	NDBA-D ₁₈	8.00	177.3	66.1	15	25	Internal standard

*: quantitative ion

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱的选择 考察了Thermo Hypersil GOLD C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 美国赛默飞公司)、Agilent Poroshell Bonus-RP(50 mm×4.6 mm, 2.7 μm, 美国安捷伦公司)、Agilent Poroshell SB-C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm, 美国安捷伦公司)、Phenomenex Kinetex C₁₈色谱柱(100 mm×3 mm, 2.6 μm, 美国Phenomenex公司)、Agilent Poroshell SB-Aq色谱柱(100 mm×3 mm, 2.7 μm, 美国安捷伦公司)5种色谱柱对N-亚硝胺化合物的分离情况。结果显示,化合物在5种色谱柱上均能实现分离,柱径和填料粒径越小,峰形越尖锐,但柱压越高,其中Aq柱对亲水性化合物保留较好,能使化合物与基质干扰分离。考虑到APCI需要较高流速,且分离NDELA和NDMA需要高比例水相,同时为了减少化妆品基质成分的干扰,最终选用Agilent Poroshell SB-Aq色谱柱进行分离。

2.2.2 流动相的选择 考察了水+甲醇(A)、0.1%甲酸水+甲醇(B)、0.1%甲酸水+0.1%甲酸甲醇(C)、1 mmol/L乙酸铵水溶液(含0.1%甲酸)+甲醇(D)、1 mmol/L乙酸铵水溶液(含0.1%甲酸)+乙腈(E)5组不同流动相对化合物峰形和响应的影响。结果显示,使用流动相A、B、C时,15种N-亚硝胺化合物均能正常出峰,但NDMA、NMEA和NPYR检测离子对的基线响应较高,信噪比偏低,灵敏度下降。甲酸的加入能使化合物响应增大,但对基线响应偏高的现象无改善,且多个化合物的基线响应波动增大。使用流动相D时,乙酸铵的加入明显降低基线响应和改善峰形,但同时也会抑制部分化合物的电离,降低响应,但总体来说提高了信噪比,特别是提高了NDMA、NMEA和NPYR的信噪比。流动相E用乙腈代替甲醇作为有机相,峰形变得更尖锐,但所有化合物的响应明显降低。分析其原因可能是在APCI⁺模式下,甲酸的加入能提供H⁺质子,有助于化合物电离的同时也提高了背景化合物的

响应。乙酸钠的加入,使得流动相离子强度增加,电子转移速率增加,目标化合物和背景化合物同时抑制电离,乙酸钠在一定浓度下,可提高目标化合物的信噪比。

在流动相 D 的基础上进一步对比了不同乙酸钠浓度(0.1、0.2、0.5、1、2 mmol/L)对化合物峰形及响应的影响。结果显示,随着乙酸钠浓度的增大,基线响应降低,0.5 mmol/L 时基线响应达到最低,继续增大乙酸钠浓度,对基线影响不明显。化合物响应则随乙酸钠浓度的增大而降低,NMOR 较为明显。为了兼顾基线响应和化合物响应,达到最优信噪比,最终选取 0.2 mmol/L 乙酸钠水溶液(含 0.1% 甲酸)+甲醇作为流动相。优化条件下 15 种 N-亚硝胺化合物和 5 种同位素内标的提取离子流色谱图见图 1。

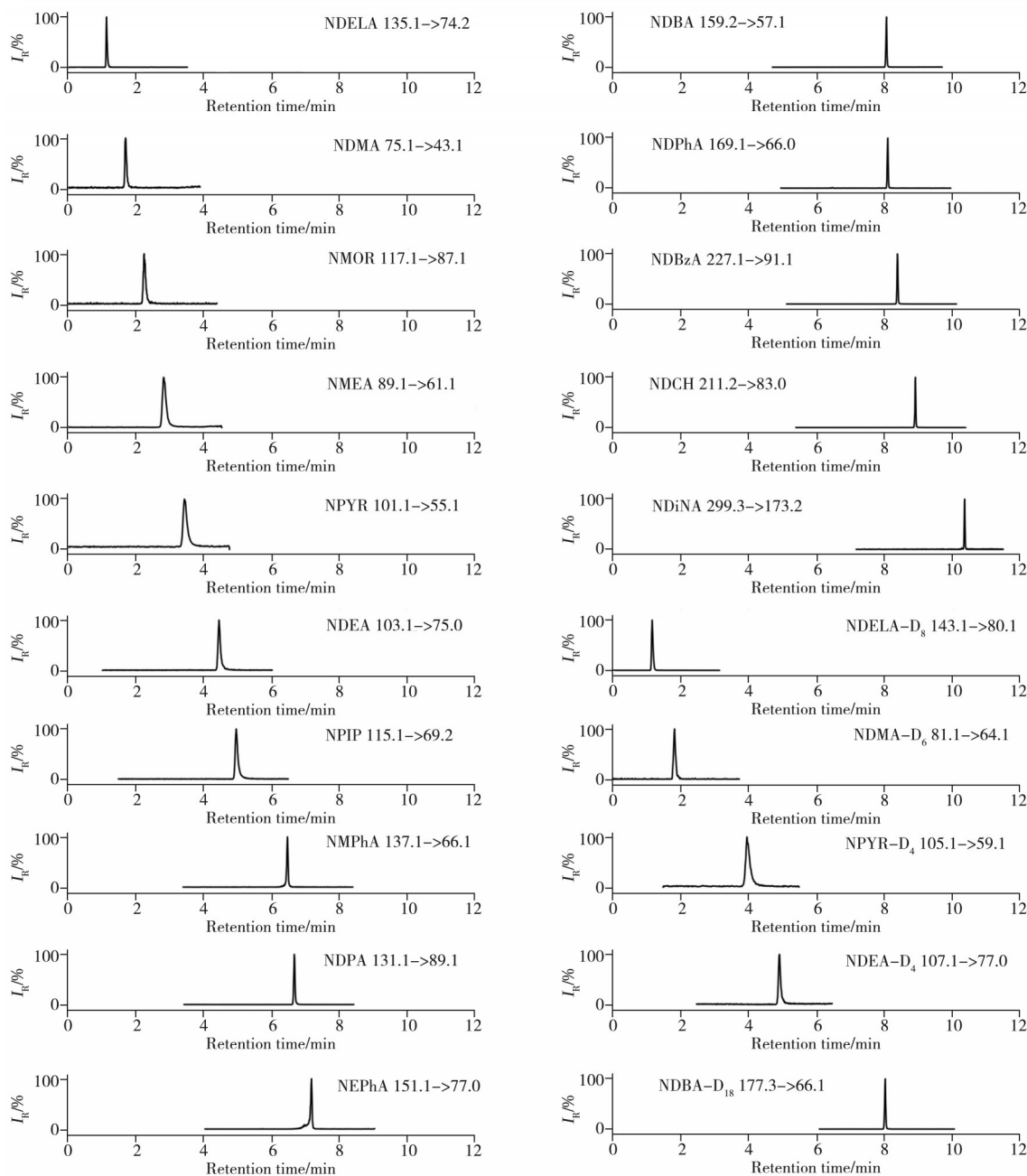


图 1 15 种 N-亚硝胺化合物和 5 种同位素内标提取离子色谱图

Fig. 1 Extraction ion chromatograms of 15 N-nitrosamine compounds and 5 isotope internal standards

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取方式的优化 15 种 N-亚硝胺化合物的性质差异较大, $\log K_{ow}$ 从 -1.28 到 7.07, 可溶于甲醇、乙腈等有机溶剂且部分可溶于水。实验首先考察了不同上机溶液(纯水、10%~90% 甲醇水、10%~

90%乙腈水、甲醇和乙腈)对溶剂效应的影响。结果显示, NDELA、NDMA、NMOR、NMEA、NPYR、NDEA、NPIP、NDPA 这 8 种脂溶性较低的 N-亚硝胺化合物对上机溶液较为敏感, 溶剂效应较强, 有机相比例增大时, 峰形严重展宽。同时, 随着有机相比例增大, 脂溶性较强的 NDiNA 响应逐步提高, 原因可能是由于有机相比例提高, 增大了溶解度, 使其响应提高(见图 2)。因此, 由于溶剂效应和溶解度的双重影响, 本研究中的 15 种 N-亚硝胺化合物很难选取同一种上机溶液。

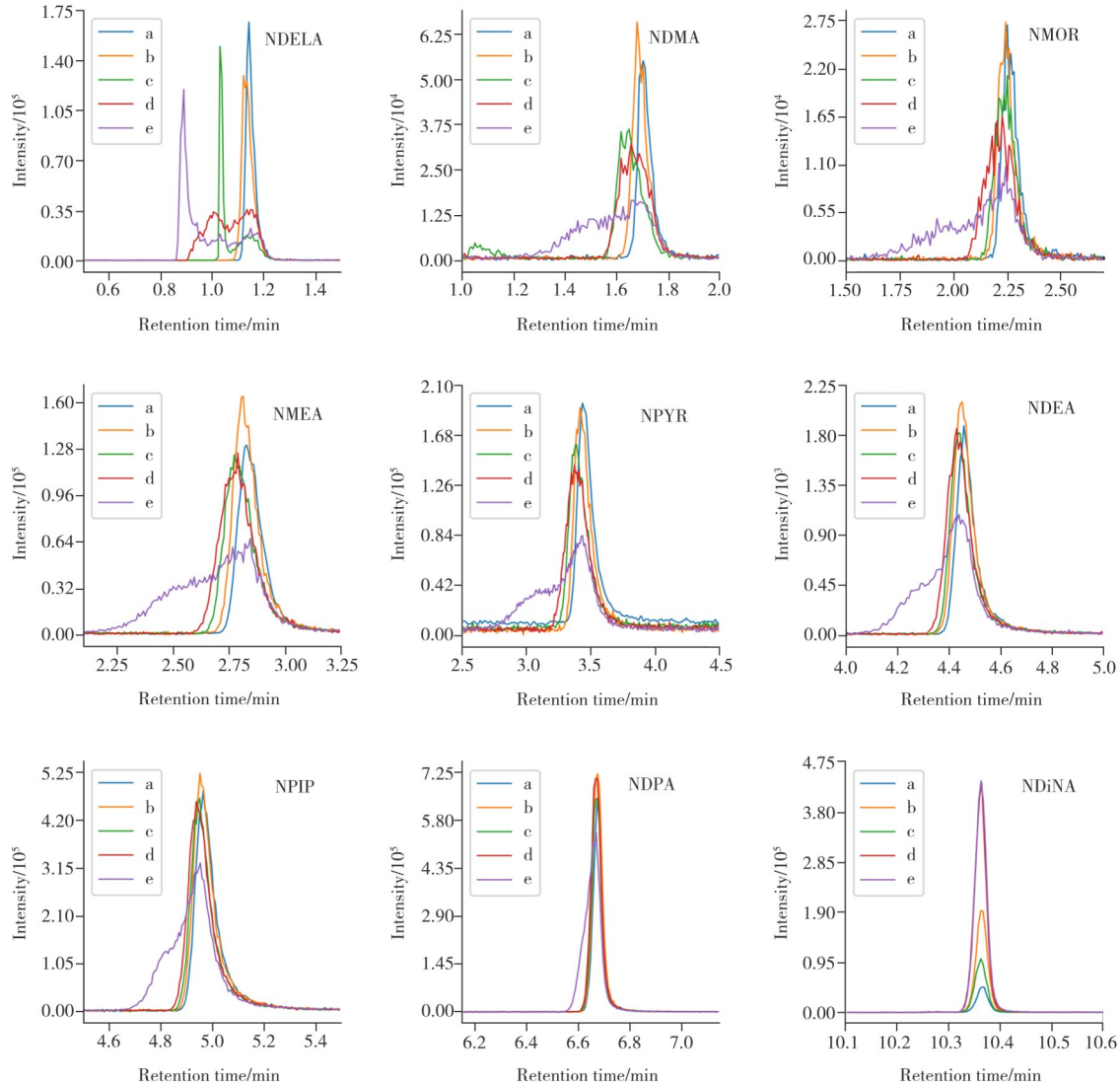


图 2 不同上机溶液中 N-亚硝胺化合物的提取离子色谱图

Fig. 2 Extraction ion chromatograms of N-nitrosamine compounds in different solutions

a: aqueous solution, b: 10% methanol solution, c: 10% acetonitrile solution, d: 50% methanol solution, e: methanol solution

为避免溶剂效应, 实验进一步以乙腈为提取溶剂, 考察增加氮吹、复溶的方式对 N-亚硝胺化合物加标回收率的影响。结果显示, 15 种化合物的加标回收率均小于 80%, 分子量较小的 NDMA、NMEA、NDEA 等的回收率甚至低于 50%。进一步研究发现, 即使严格控制温度、避光和氮气流量条件, 氮吹过程中 N-亚硝胺化合物仍有较大损失, 说明该类化合物的稳定性较差。因此整个实验过程应避免使用氮吹处理。如果采用纯水对提取液稀释的方式降低溶剂效应, 上机溶液中乙腈的比例需稀释至低于 20%, 但该操作将方法检出限提高了 5 倍, 无法满足 50 ng/g 的法规限量要求。因此, 本研究将 15 种 N-亚硝胺化合物根据极性大小分为两组, 第一组为 NDELA、NDMA、NMOR、NMEA、NPYR、NDEA、NPIP、NDPA, 第二组为 NMPPhA、NEPhA、NDBA、NDPhA、NDBzA、NDCH、NDiNA, 分别用水和乙腈进行提取。

进一步实验发现, 对于第一组化合物采用水作为提取溶剂, 膏霜、乳液样品含较多脂质和增稠剂,

提取后难于过滤,水剂基质则能很好实现提取和过滤。而在膏霜、乳液基质提取液中加入亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀大分子,离心后,可顺利完成过滤操作。该条件下,NDELA 等 8 种 N-亚硝胺化合物的加标回收率均大于 85%,且上机测定时色谱峰形尖锐。对于第二组化合物直接采用乙腈进行提取,但部分膏霜样品因含有高含量的表面活性剂等,造成较为严重的基质干扰。采用饱和氯化钠-乙腈盐析萃取法能大大降低基质效应,NMPPhA 等 7 种 N-亚硝胺化合物的加标回收率均在 85% 以上。

2.3.2 提取时间的优化 选取超声提取方式进行样品的前处理,并考察了不同超声时间(5、10、15、20 min)对化合物的提取效果(见图 3)。结果显示,超声时间达到 10 min 时,15 种 N-亚硝胺化合物的加标回收率均可达到 85% 以上,进一步延长超声时间对提取效果影响不大,但在超声时间达到 20 min 时部分 N-亚硝胺的回收率呈下降趋势,可能是发生了降解转化所致。因此本研究选取 10 min 作为最佳超声提取时间。

2.3.3 固相萃取净化效果的考察 采用固相萃取的净化方式考察了 Waters Oasis HLB (60 mg, 3 mL)、Waters Oasis WCX (60 mg, 3 mL)、Waters Oasis MCX (60 mg, 3 mL)(美国沃特世公司)和 CNW C₁₈ (60 mg, 3 mL, 上海安谱公司)4 种萃取小柱对 N-亚硝胺化合物的加标回收率。结果显示,使用 HLB 和 C₁₈ 小柱时,过柱和氮吹等操作导致部分化合物损失严重,且强极性的 NDELA 和 NDMA 在固相萃取小柱上保留较弱,导致直接流出,回收率低于 10%;而 NDiNA 在小柱上保留过强,难于洗脱,使得回收率偏低。使用 WCX 和 MCX 时,上样和洗脱需用氨水和甲酸调节 pH 值,由于 N-亚硝胺化合物对酸碱较敏感,操作过程中导致化合物降解,回收率无法达到理想效果。因此,本研究最终未采用固相萃取的净化方式,而是通过“2.3.1”对提取方式进行系统优化以提升方法的准确性和精密度。

2.4 线性关系、方法检出限与定量下限

按“1.4”仪器条件,将质量浓度为 1、2、5、10、20、50 ng/mL,内标浓度为 10 ng/mL 的标准工作溶液由低到高进行测定。以标准溶液浓度与同位素内标浓度之比为横坐标,对应的峰面积与同位素内标峰面积之比为纵坐标,绘制标准曲线。得到线性回归方程和相关系数,所有化合物在相应质量浓度范围内均呈现良好线性,相关系数(r^2)均大于 0.995。分别以 3 倍信噪比($S/N=3$)和 10 倍信噪比($S/N=10$)计算方法检出限(LOD)和定量下限(LOQ)。表 3 列出了 15 种 N-亚硝胺化合物的线性方程、相关系数、方法检出限和定量下限。

表 3 15 种 N-亚硝胺化合物的线性回归方程、相关系数(r^2)、方法检出限及定量下限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients(r^2), detection limits and quantitation limits of 15 N-nitrosamine compounds

No.	Compound	Linear range/ (ng·mL ⁻¹)	Linear equation	r^2	LOD/(ng·g ⁻¹)	LOQ/(ng·g ⁻¹)
1	NDELA	1~50	$Y=0.01658X+0.007110$	0.9996	5	15
2	NDMA	2~50	$Y=0.6052X+0.2439$	0.9988	10	30
3	NMOR	2~50	$Y=10.16X-0.08744$	0.9985	15	45
4	NMEA	2~50	$Y=86.31X-0.6452$	0.9993	10	30
5	NPYR	2~50	$Y=0.1281X+0.08240$	0.9982	15	45
6	NDEA	1~50	$Y=0.08322X+0.04195$	0.9996	5	15
7	NPIP	1~50	$Y=2.953X-0.01323$	0.9998	5	15
8	NMPPhA	1~50	$Y=0.2350X-0.001253$	0.9992	5	15
9	NDPA	1~50	$Y=2.101X+0.0007280$	0.9998	5	15
10	NEPhA	1~50	$Y=0.4484X+0.03458$	0.9983	5	15

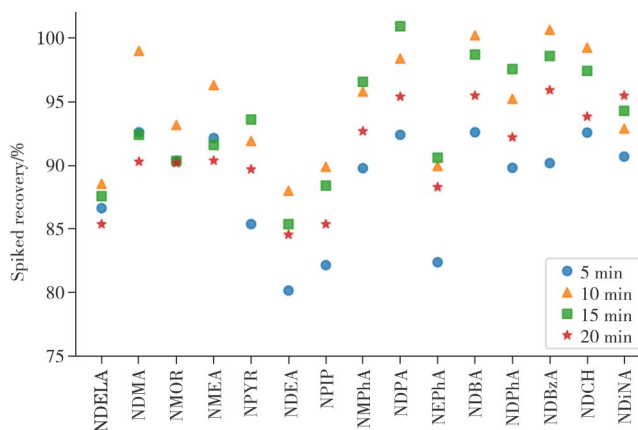


图 3 超声时间对 15 种 N-亚硝胺化合物回收率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasound time on the spiked recoveries of 15 N-nitrosamine compounds

(续表 3)

No.	Compound	Linear range/ (ng·mL ⁻¹)	Linear equation	r ²	LOD/(ng·g ⁻¹)	LOQ/(ng·g ⁻¹)
11	NDBA	1~50	Y=0.157 8X+0.072 54	0.999 6	5	15
12	NDPhA	1~50	Y=0.223 4X+0.004 289	0.999 4	5	15
13	NDBzA	1~50	Y=4.525X-0.004 781	0.999 3	5	15
14	NDCH	1~50	Y=1.993X+0.001 492	0.999 0	5	15
15	NDiNA	2~50	Y=0.215 0X-0.016 73	0.995 7	10	30

2.5 回收率与相对标准偏差

平行称取 3 种空白基质(水剂、乳液、膏霜)样品各 6 份, 每份约 0.5 g, 共 3 组, 分别加入适量混合标准溶液和内标溶液, 使得加标水平分别为 25、50、100 ng/g(1/2 倍限量值、限量值、2 倍限量值), 按“1.3”处理后进行测定, 15 种 N-亚硝胺化合物的加标回收率与相对标准偏差(RSD)结果见表 4。从表中可以看出, 3 种基质在不同加标浓度下化合物的平均回收率为 88.0%~111%, RSD 为 1.4%~9.8%。结果显示, 该方法准确可靠, 精密度高。

表 4 15 种 N-亚硝胺化合物的加标回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 4 Spiked recoveries and RSDs of 15 N-nitrosamine compounds(n=6)

No.	Compound	Spiked/(ng·g ⁻¹)	Aqueous		Emulsion		Cream	
			Average recovery/%	RSD/%	Average recovery/%	RSD/%	Average recovery/%	RSD/%
1	NDELA	25	100	6.6	88.7	2.3	96.5	6.0
		50	99.5	5.3	89.4	3.7	93.2	5.4
		100	95.7	6.7	88.5	2.7	90.5	3.6
2	NDMA	25	98.1	9.2	98.9	9.1	98.8	8.4
		50	96.0	5.2	105	5.0	107	4.6
		100	94.0	4.8	101	6.5	110	3.4
3	NMOR	25	95.6	8.5	93.2	7.2	93.5	8.2
		50	94.7	2.5	94.7	6.8	92.5	6.9
		100	96.6	3.8	106	4.5	110	2.8
4	NMEA	25	98.2	9.3	96.3	7.2	98.6	6.9
		50	103	4.0	103	3.0	101	7.0
		100	106	4.2	108	3.3	108	2.6
5	NPYR	25	95.9	9.8	93.2	9.0	94.0	7.2
		50	96.6	6.3	91.9	5.4	89.9	5.2
		100	97.1	5.8	97.3	7.7	97.5	5.0
6	NDEA	25	90.8	3.6	89.0	2.8	91.6	2.8
		50	91.7	3.7	88.0	2.1	91.2	2.3
		100	91.6	5.0	98.2	7.8	94.9	6.5
7	NPIP	25	88.1	2.4	89.9	4.2	89.0	3.2
		50	105	1.8	92.0	2.6	93.3	4.7
		100	111	3.3	99.6	4.1	99.7	1.4
8	NMPPhA	25	108	3.7	95.8	4.7	88.2	3.5
		50	101	4.6	96.6	5.3	90.1	2.1
		100	107	4.6	104	4.9	96.3	4.4
9	NDPA	25	92.6	4.7	98.4	5.2	90.3	6.0
		50	104	2.9	99.3	3.3	90.1	2.7
		100	110	2.4	103	4.6	90.4	5.6
10	NEPhA	25	96.9	4.9	89.9	2.1	88.6	2.6
		50	102	3.9	90.5	3.0	92.2	4.2
		100	106	7.4	95.2	6.2	92.6	5.3
11	NDBA	25	103	4.0	103	3.0	98.8	3.6
		50	109	2.3	100	3.2	100	6.0
		100	111	2.0	105	4.6	100	3.8
12	NDPhA	25	96.6	3.0	95.2	4.5	96.4	5.4
		50	98.6	4.7	95.6	4.3	95.3	5.9
		100	102	4.9	98.0	4.6	94.9	4.7
13	NDBzA	25	101	3.0	102	2.5	96.1	4.4
		50	105	3.4	101	6.1	97.6	3.9
		100	111	2.1	110	2.1	99.8	4.2

(续表 4)

No.	Compound	Spiked/(ng·g ⁻¹)	Aqueous		Emulsion		Cream	
			Average recovery/%	RSD/%	Average recovery/%	RSD/%	Average recovery/%	RSD/%
14	NDCH	25	103	3.0	99.2	5.0	92.8	4.8
		50	106	4.7	99.9	2.3	96.7	5.2
		100	110	2.6	107	4.0	99.6	5.1
15	NDiNA	25	99.4	6.0	92.9	5.7	95.7	7.1
		50	107	3.8	97.3	4.3	97.2	4.0
		100	110	3.8	102	4.8	95.8	4.6

2.6 实际样品测定

收集水剂、乳液、膏霜等类型市售化妆品样品 71 批次, 采用本方法对 15 种 N-亚硝胺化合物进行测定。检测结果见表 5。13 批次样品检出 NDELA, 其中 12 批次均小于限量值 50 ng/g, 1 批次洁面泡泡样品中检出 705 ng/g 的 NDELA, 超出限量值。化妆品样品中常检出 NDELA, 这与化妆品较多使用三乙醇胺 (TEA) 相关原料有关。分析 NDELA 超限量值样品的配方表, 发现其使用月桂醇硫酸酯 TEA 盐作为原料, 此原料可能带入 NDELA, 导致其超过限量值, 建议加强原料的质量控制。

表 5 市售样品中 N-亚硝胺化合物的检测结果

Table 5 Test results of N-nitrosamine compounds in commercially available samples

No.	Sample	Matrix	Compound	Content/(ng·g ⁻¹)
1	XX Moisturizing Cleanser	Cream	NDELA	22
2	XX Zhenyang Cleanser	Cream	NDELA	28
3	XX Zhenyang Facial Cleanser	Cream	NDELA	18
4	XX Nourishing and Revitalizing Facial Cleanser	Cream	NDELA	24
5	XX Nourishing Brightening Cleanser	Cream	NDELA	19
6	XX Condensed Facial Cleanser	Cream	NDELA	16
7	XX Fragrance Bath Lotion	Emulsion	NDELA	28
8	XX Nourishing Bath Gel	Emulsion	NDELA	34
9	XX Perfume Shower Gel	Emulsion	NDELA	20
10	XX Perfume Shower Gel	Emulsion	NDELA	20
11	XX Perfume Shower Gel	Emulsion	NDELA	16
12	XX Perfume Shower Gel	Emulsion	NDELA	26
13	XX Cleansing Bubble	Aqueous	NDELA	705

3 结 论

本研究通过优化质谱参数和超高效液相色谱条件, 调整前处理方法以及采用同位素内标等方式, 建立了 UPLC-MS/MS 测定化妆品中 15 种 N-亚硝胺化合物的分析方法。方法针对性较强、测定结果准确可靠, 检出限满足相关限量要求, 适用于化妆品中 15 种 N-亚硝胺化合物的痕量测定。该方法有效弥补了现有标准方法的不足, 通过对市售化妆品的检测, 发现 NDELA 常检出且存在超限量值情况。本方法的建立将为化妆品中 N-亚硝胺化合物的监测和风险评估提供更多的技术手段, 为化妆品监管和产品质量控制提供重要的技术支持。

参考文献:

- [1] Chen Z H, Zhou Z M, Xiao S X, Fang J H. *China Food Drug Admin. Mag.* (陈张好, 周智明, 肖树雄, 方继辉. 中国食品药品监管), **2022**, (1): 50-56.
- [2] Ge Y Q, Ye X X, Le J, Yang Y J, Wang Y. *Chin. J. Pharm. Anal.* (葛雨琦, 叶晓霞, 乐健, 杨永健, 王彦. 药物分析杂志), **2020**, 40(1): 83-89.
- [3] Zhang X M, Feng Y C, Jiang Y, Qiao Q, Gao Z L, Lu X H. *Chin. J. Anal. Lab.* (张小敏, 冯燕超, 蒋莹, 乔茜, 高志霖, 陆晓华. 分析实验室), **2021**, 40(12): 1461-1466.
- [4] He Q, Zhang Y L, Guo J Q, Zhang L, Li Z H, Li Y. *Chin. J. Anal. Lab.* (何强, 张亚莉, 郭家琪, 张璐, 李子豪, 李莹. 分析实验室), **2021**, 40(12): 1451-1454.
- [5] Wang T N, Wang Y Z, Liu H, Chen M, Fei T, Wu D. *Phys. Test. Chem. Anal. B: Chem. Anal.* (王天南, 汪阳忠, 刘鸿, 陈敏, 费婷, 吴达. 理化检验(化学分册)), **2021**, 57(11): 981-988.
- [6] Schettino L, Benedé J L, Chisvert A. *RSC Adv.*, **2023**, 13: 2963-2971.

- [7] China Food and Drug Administration. Safety and Technical Standards for Cosmetics (2015 Ed.) (国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范(2015年版)).
- [8] The European Parliament and of the Council. Regulation(EC)No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. [2022-12-17]. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/2022-12-17>.
- [9] Zhang J, Zeng M S, Lai J M, Li S Y, Yan X H, Ding Y. *J. Instrum. Anal.* (张静, 曾敏珊, 赖俊敏, 李思源, 严小红, 丁怡. 分析测试学报), **2022**, 41(6): 916-920.
- [10] Pablo M, Iris V G, Alberto C, Amparo S. *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1604(460465): 1-11.
- [11] Dong H, Guo X D, Xian Y P, Luo H Y, Wangle B, Wu Y L. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1422: 82-88.
- [12] Joo K M, Shin M S, Jung J H, Kim B M, Lee J W, Jeong H J, Lim K M. *Talanta*, **2015**, 137: 109-119.
- [13] Liu F J, Xian Y P, Chen J W, Dong H, Liu H D, Guo X D, Chen M Y, Li H. *Anal. Methods*, **2016**, 8: 4245-4253.
- [14] Tada A, Rodrigues S C, Rath S. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 202(114132): 1-8.
- [15] Lin R, Xu D M, Huang Q Y, Dong Q M, Lai Y, Yang Z H, Yang Z, Zhuang L L, Guo S L, Wu Y F, Lin W J, Lin H X, Ding H J, Shen L H, Tu X P. *J. Instrum. Anal.* (林睿, 徐敦明, 黄旖珏, 董清木, 赖莺, 杨子禾, 杨泽, 庄丽丽, 郭思立, 吴易峰, 林伟靖, 林海霞, 丁华军, 沈露虹, 涂星朋. 分析测试学报), **2022**, 41(10): 1542-1547.
- [16] Xin H J, Xie F W, Deng D J. *Chin. J. Anal. Chem.* (辛慧君, 谢复炜, 邓大君. 分析化学), **2000**, 28(4): 436-438.
- [17] Na R C, Yong P K, Won H J, Geum S H, Yun G A. *Talanta*, **2016**, 148: 69-74.
- [18] Amelin V G, Bol'shakov D S. *J. Anal. Chem.*, **2019**, 74(1): 39-46.
- [19] Li M P, Li R, Wang Z J, Zhang Q, Bai H, Zhang S W, Lü Q. *Chin. J. Anal. Chem.* (李美萍, 李蓉, 王志娟, 张庆, 白桦, 张生万, 吕庆. 分析化学), **2019**, 47(2): 288-296.
- [20] GB/T 29669-2013. Determination of 10 Volatile Nitrosamines Including N-nitrosodimethylamine in Cosmetics-Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. National Standards of the People's Republic of China(化妆品中N-亚硝基二甲基胺等10种挥发性亚硝胺的测定 气相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国国家标准).

(责任编辑: 龙秀芬)