

化粧品中禁用染髮劑成分分析方法之建立

陳信豪 張淑涵 黃守潔 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究係利用液相層析串聯質譜儀(Liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)建立一簡單、快速的方法能同時分析染髮產品中1-naphthylamine等22種禁用染髮成分。檢體以甲醇溶解，經超音波振盪萃取並定容，經濾膜過濾後，以LC-MS/MS進行分析。層析管柱使用ACQUITY BEH Shield RP 18，以移動相10 mM甲酸銨與乙腈進行梯度沖提；利用電灑游離法(Electrospray ionization, ESI)，搭配多重反應偵測模式(Multiple reaction monitoring, MRM)，可於15分鐘完成分析。採用市售染髮劑為空白檢體，添加適量標準品溶液，使最終濃度為0.02 - 50 ppm，進行連續3天、5重複之添加回收試驗，其平均回收率為88.5 - 110.8%，變異係數均小於10.6%。基質之離子增強或抑制效應皆小於9.1%。本檢驗方法可應用於上市後產品之監測，以確保消費者之健康安全。

關鍵詞：液相層析串聯質譜儀、禁用染髮劑、化粧品

前 言

隨著流行時尚，染髮已不再是單純白髮染黑髮，透過染髮來改變髮色，創造獨特性及輕柔感的髮型，已漸漸成為流行趨勢，AC Nielsen於2004年全球市場調查顯示，染髮人口的比率達80%，已超過燙髮人口的比率75%，且日益普及於各年齡層⁽¹⁾。化學性染髮劑配方可分成暫時性、半永久性、及永久性等三種劑型。暫時性的髮表著色劑主要透過碳黑及無機顏料使其附著於毛髮的表面不經過氧化，達到髮表增色效果；半永久性染髮劑主要成分包括偶氮(azo)酸性染料及苯甲醇(benzyl alcohol)，染髮劑透過滲透到毛髮表皮層，介於鱗片與皮質層之間，並不會改變原髮色；永久性染髮劑又稱氧化性染髮劑，成分多元

且複雜，包括苯二胺(benzenediamines)、氨基苯酚(aminophenols)，苯二醇(benzenediols)、萘二醇(naphthalenediol)及二氨基吡啶(diaminopyridine)等，藉由不同種類及含量比例的差異可生成多種色調之反應產物，使頭髮染上不同的顏色⁽²⁾。依據Khumalo等人之研究一般民眾及美髮業者因染髮劑引起濕疹、接觸性皮膚炎的關聯性，結果顯示約有0.1-2.3%的民眾對染髮劑中的*p*-phenylenediamine有過敏反應⁽³⁾，而Heidi等人之研究也發現染髮是最常被通報引起過敏的原因⁽⁴⁾。有鑑於染髮劑的潛在風險，各國均訂有染髮成分之使用規範，如歐盟化粧品法規(Regulation (EC) No 1223/2009)附錄III⁽⁵⁾化粧品限制使用成分表，列載可使用染髮成分的限量及注意事項，而在附錄II⁽⁶⁾化粧品禁止使用成分表中也列載安全

性資訊不足的染髮劑成分，而我國則將染髮劑列屬特定用途化粧品管理，於「特定用途化粧品成分名稱及使用限制表」中列載之染髮劑成分共有104種⁽⁷⁾。為配合行政管理需求，保障消費者的健康，開發相對應之檢驗方法作為染髮劑例行性檢驗及後市場監測刻不容緩。

目前化粧品中染髮劑檢驗以高效液相層析(HPLC)搭配二極體陣列檢出器(PDA)為經常使用之方法，其主要利用化合物之滯留時間及UV圖譜比較鑑別之，惟染髮產品色系繁多，產品往往添加5-10種染髮劑成分，且其化學結構相似，具同分異構物等結構，如氨基苯酚、苯二胺等，造成UV圖譜判斷困難，而化粧品中基質複雜，常會有共析出(co-elute)之問題，造成檢驗結果有基質干擾現象。以液相層析串聯質譜法(LC-MS/MS)進行分析，不僅可利用化合物滯留時間作為鑑別依據外，亦可利用分子碎片及離子強度比(ion ratio)等資訊作為定性上之依據，可減少鑑別上之誤判⁽⁸⁻¹¹⁾。食品藥物管理署蒐集國內外有關染髮劑之檢驗資訊，研究開發液相層析串聯質譜儀之多重染髮劑檢驗方法，現已完成建立85項禁、限用染髮劑成分，並公開於食藥署網站供各界參考使用。本研究則配合法規需求，持續針對1-naphthylamine等22種禁用染髮劑成分，建立高靈敏及準確度之液相層析串聯質譜法。

材料與方法

一、化學試藥及器材

化粧品禁用染髮劑標準品4-amino-2-nitrophenol、*p*-chloro-*o*-toluidine、diphenylamine、2,3-naphthalenediol、2,4,5-trimethylaniline及auramine O對照用標準品皆購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)；1,2-diphenylhydrazine、4,4'-methylen-bis (2-chloroaniline)、1-naphthylamine及4,4'-methylenedianiline對照用標準品皆

購自AccuStandard, Inc. (New Haven, CT, USA)；4,5-diamino-1-methylpyrazole、4-hydroxyindole、4,4'-methylenedi-*o*-toluidine、2,4-dinitrotoluene、5-nitroacenaphthene、basic red 9、direct black 38及direct brown 95對照用標準品皆購自Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)；6-methoxy-2,3-pyridinediamine及N-(2-methoxyethyl)-*p*-phenylenediamine對照用標準品皆購自BOC Sciences (Shirley, NY, USA)；4,4'-bi-*o*-toluidine對照用標準品購自Chem Service, Inc. (West Chester, PA, USA)；6-nitro-2,5-pyridinediamine對照用標準品購自Angene Chemical, Inc. (Churchill House, LE, EU)。甲酸銨採用試藥特級，購自Sigma-Aldrich；甲醇及乙腈均採用LC級，皆購自Merck (Darmstadt, Germany)。針筒式濾頭(syringe filter)採用PTFE材質，直徑為13 mm，孔徑為0.22 μ m。

二、儀器與裝置

- (一)液相層析串聯式質譜儀: Waters ACQUITY UPLC、Waters Xevo TQ-S micro Detector及MassLynx Workstation Software Quantitative Analysis 數據分析軟體(Waters, Milford, MA, USA)。
- (二)純水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore Ltd., USA)。
- (三)旋渦混合器(Vortex Mixer Genie 2 Scientific Industries, USA)。

三、方法

(一)標準溶液之配製

取1-naphthylamine等對照用標準品各約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，冷藏貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇溶液稀釋，供作標準溶液，濃度為1000 μ g/mL。

(二)檢液之調製

將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，加入甲醇溶液15 mL，以超音波振盪30分鐘，再以甲醇溶液定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

(三) 10 mM甲酸鉍溶液之調製

稱取甲酸鉍0.63 g，以去離子水溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作10 mM甲酸鉍溶液。

(四) 鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各3 μ L，分別注入液相層析串聯質譜中，依下列條件進行分析，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(表一)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各禁用染髮劑之含量(ppm)：

檢體中各禁用染髮劑之含量(ppm) =

$$\frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各禁用染髮劑之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

(五) LC-MS/MS測定條件

液相層析儀部分，層析管柱為ACQUITY BEH Shield RP 18(1.7 μ m，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm)，移動相溶液A為10 mM甲酸鉍溶液與移動相溶液B為乙腈進行梯度沖提(表二)，流速為0.3 mL/min。質譜儀參數設定，以電灑離子化法(electrospray ionization, ESI)搭配多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring, MRM)進行

偵測，毛細管電壓(capillary voltage) 2.85 kV，離子源(ion source)溫度為150 $^{\circ}$ C，溶媒揮散溫度(desolvation temperature)為500 $^{\circ}$ C，溶媒揮散流速(desolvation flow)為800 L/hr。碰撞氣體(collison gas)為氬氣，質譜儀參數如表三。

(六) 回收率及重複性試驗

回收率試驗選用空白染髮劑作為測試檢體，於空白染髮劑中添加標準品0.02 - 50 ppm，依檢測品項之感度選定添加濃度，再依前述(二)流程進行檢液調製、儀器分析及含量測定，求得5重複連續3天之平均回收率及變異係數(CV%)，以評估本研究建立分析方法之準確性及再現性。

(七) 統計分析

平均值、標準偏差及變異係數運用Microsoft Excel 2010 軟體進行計算。22種禁用染髮劑線性迴歸及判定係數(r^2)由MassLynx Workstation Software Quantitative Analysis 數據分析軟體產生。

(八) 方法定量極限之評估

表二、移動相梯度沖提條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0 $\rightarrow$ 3	95 $\rightarrow$ 80	5 $\rightarrow$ 20
3 $\rightarrow$ 6	80 $\rightarrow$ 50	20 $\rightarrow$ 50
6 $\rightarrow$ 10	50 $\rightarrow$ 0	50 $\rightarrow$ 100
10 $\rightarrow$ 12	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
12 $\rightarrow$ 12.5	0 $\rightarrow$ 95	100 $\rightarrow$ 5
12.5 $\rightarrow$ 15	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5

表一、多重反應偵測相對離子強度容許範圍

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	$\pm$ 20
> 20 - 50	$\pm$ 25
> 10 - 20	$\pm$ 30
$\leq$ 10	$\pm$ 50

表三、質譜儀參數條件

Parameter	Value
Capillary (kV)	2.85
Source temperature ($^{\circ}$ C)	150
Desolvation temperature ($^{\circ}$ C)	500
Desolvation gas flow (L/hr)	800

取均質後之空白基質1 g，加入適量22種染髮劑標準品溶液，依所建立之檢驗方法步驟求得測定離子訊號與雜訊之比值(signal-to-noise ratio, S/N ratio)大於10之最低濃度，作為方法之定量極限。

(九)基質效應(matrix effect)評估

基質效應之探討，分別以下列方式建立檢量線：

1. 標準曲線(standard calibration curve, SCC)：取標準原液以甲醇稀釋，使其最終濃度為0.02 - 50 µg/mL。
2. 基質匹配檢量線(matrix calibration curve, MCC)：取空白基質製成空白檢液，再添加標準溶液，使其最終濃度為0.01-100 µg/mL。
3. 基質效應計算公式如下：
$$\text{基質效應(\%)} = (\text{MCC之斜率} - \text{SCC之斜率}) / \text{SCC之斜率} \times 100\%$$

結果與討論

一、分析條件最適化探討

本研究在層析管柱最適化之探討部分，選用了ACQUITY BEH Shield RP 18 (1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm，內徑2.1 mm × 10 cm)及CORTECS UPLC C18⁺ (1.6 µm，內徑2.1 mm × 10 cm)等3種層析管柱進行測試，結果發現6-methoxy-2,3-pyridinediamine以不同管柱分析，相較其他成分有較大之差異性，並以該成分為測試指標，結果如圖一所示，以ACQUITY BEH Shield RP 18層析管柱進行分析時峰型最好，主要係該層析管柱特性對於鹼性、小分子及高極性之化合物都有良好的滯留性、波峰對稱性及波峰訊號。針對萃取溶劑分別以二甲基亞砜、甲醇及乙腈進行比較，以4,5-diamino-1-methylpyrazol為例(圖二)，使用二甲基亞砜及乙腈會有裂峰的情形產生，主要因為二者

在起始水相為95%時容易造成溶劑效應，使用甲醇則與水相溶解度較好，所呈現峰型較好。在移動相方面，由於調整移動相之pH值可提供不同選擇性，有助化合物於層析管柱中穩定進行分離，為探討最適pH值，移動相A配製10 mM甲酸銨溶液調整成不同pH值範圍，分別為pH 3.5、pH 6.5及pH 9進行分析測試，結果發現6-methoxy-2,3-pyridinediamine相較其他成分，受pH值影響較大，故以該成分來評估移動相之適用性，結果如圖三所示，該成分在pH 6.5條件下之波峰及對稱性良好，且滯留性佳。透過上述條件探討，移動相選定10 mM甲酸銨溶液(pH 6.5)及乙腈，進行梯度沖提，可於15分鐘完成22項禁用染髮劑成分分析。

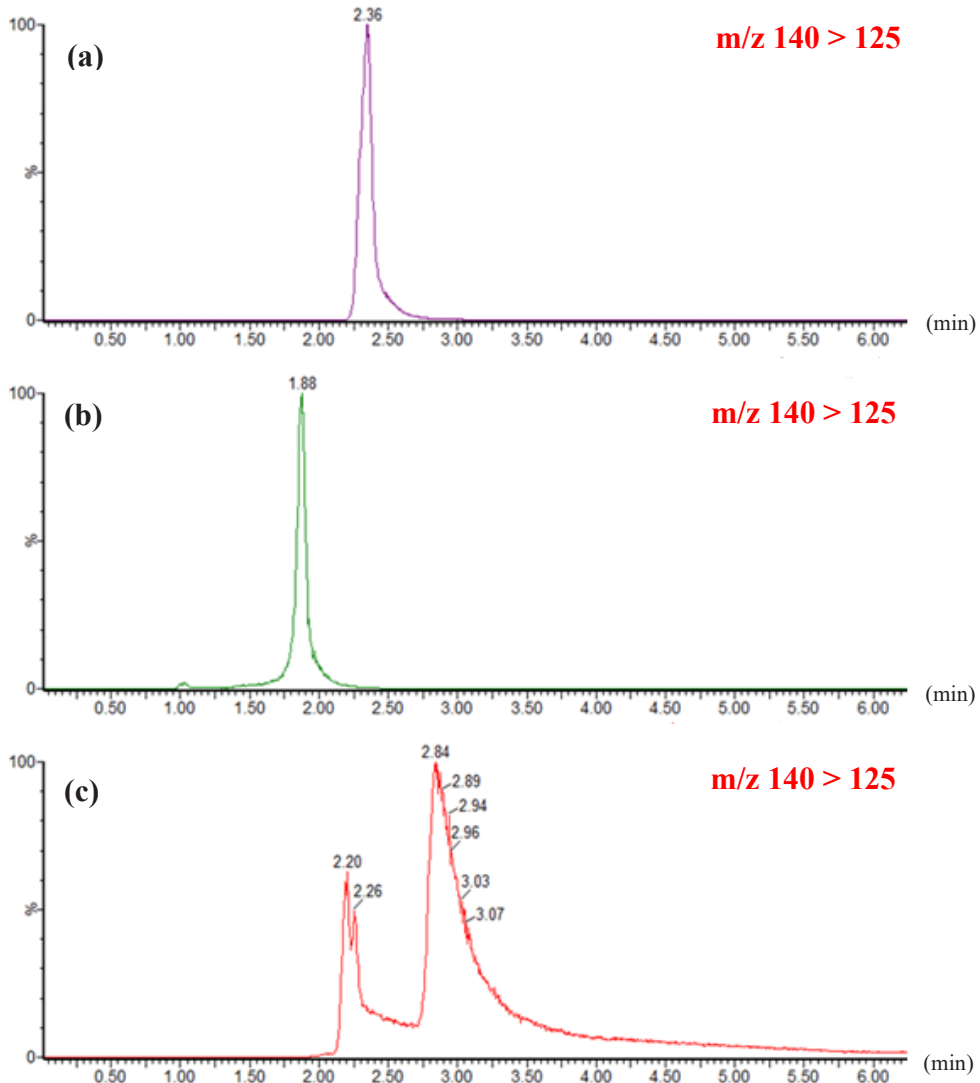
二、液相層析串聯質譜儀參數

本研究運用LC-MS/MS進行分析，利用電灑離子化，針對質譜儀之質量解析度及感度進行最佳化參數調整，使用串聯質譜儀以三段式四極桿MRM模式進行分析，先於第一個四極桿(Q1)選擇一特定離子，於第二段四極桿(Q2)通入氬氣進行碰撞後，產生產物離子碎片，再由第三段四極桿(Q3)選擇特定之產物離子進行偵測。於個別化合物之選擇反應偵測得到一個最佳化之條件，並尋找經氬氣碰撞後產生訊號最強的產物離子為定量離子(quantitative ion)，訊號次之為定性離子(qualitative ion)，各化合物之MRM偵測參數於表四。本方法以最佳化層析條件及質譜參數進行分析，利用MRM模式偵測，可將22種禁用染髮劑波峰分離，層析圖譜如圖四。

三、標準曲線之測試

22種禁用染髮劑成分混合標準溶液，針對個別成分進行不同感度測試，設定適當之標準曲線濃度範圍，判定係數(r^2)皆在0.995以上。

四、基質效應之評估



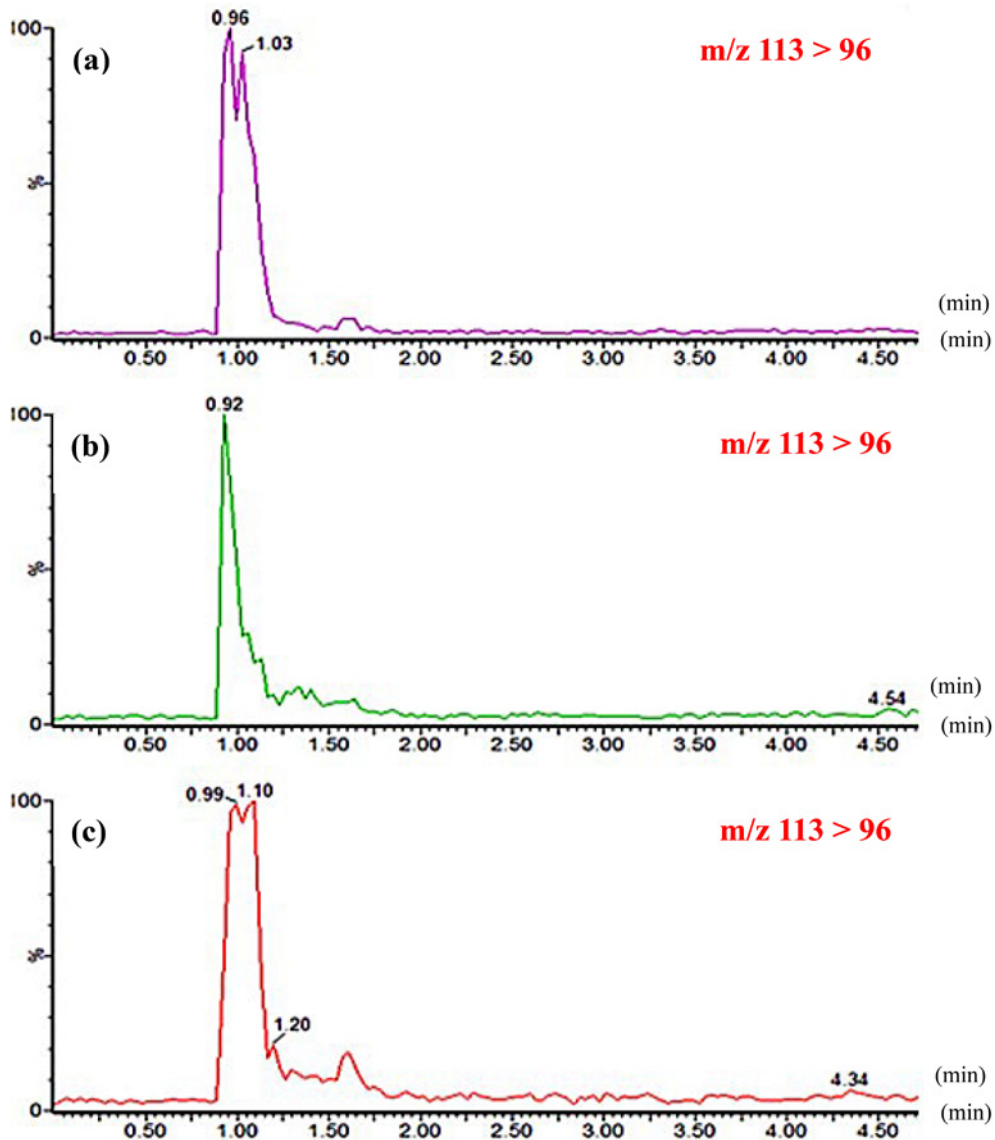
圖一、6-Methoxy-2,3-pyridinediamine標準品分別以層析管柱ACQUITY BEH Shield RP 18 (a)、ACQUITY HSS T3 (b)及CORTECS® C18⁺ (c)分析之LC-MS/MS MRM圖譜

由於化粧品基質複雜，產品所含基質可能會干擾分析訊號，產生基質效應，為確認方法有無受基質的影響，以標準曲線之斜率與基質匹配檢量線之斜率評估基質效應，如基質效應微弱(增強或抑制0 - 20%)，可忽視基質之干擾，但具中等(增強或抑制20 - 50%)或強烈(增強或抑制 > 50%)之基質效應，則必須利用基

質匹配檢量線來克服基質的影響。經評估結果顯示22種禁用染髮劑基質之離子增強或抑制作用皆小於9.1%，如表五所示。

五、回收率及重複性試驗

將混勻之空白基質進行添加回收試驗，分別添加22種禁用染髮劑標準品，使其濃度範

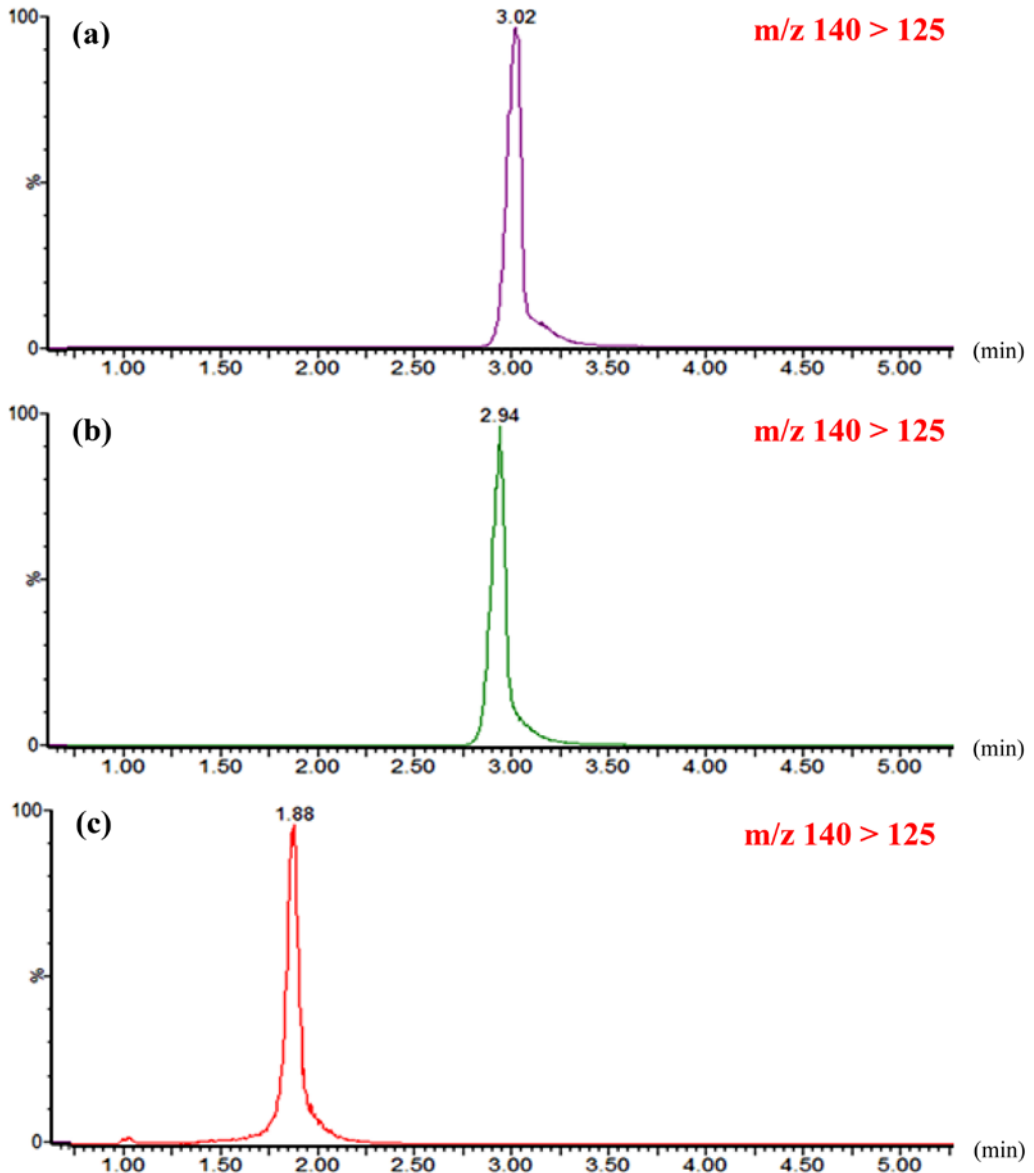


圖二、4,5-Diamino-1-methylpyrazole標準品分別以萃取溶劑DMSO (a) 甲醇(b)及乙腈(c)分析之 LC-MS/MS MRM圖譜

圍介於0.02 - 50 ppm之間，進行連續3天且5重複分析，結果如表六所示，各禁用染髮劑成分之平均回收率介於88.5 - 110.8%，變異係數 (coefficient of variation, CV)皆小於10.6%，由結果顯示，本研究方法具有良好之回收率及重複性。

六、定量極限之評估

本研究所建立之檢驗方法，各禁用染髮劑成分在儀器感度各有不同，經測試結果各禁用染髮劑成分之定量極限分別為0.02、0.2、2及20 ppm，詳如表六所示。



圖三、6-Methoxy-2,3-pyridinediamine標準品分別以移動相A於pH 9 (a)pH 6.5 (b)及pH 3.5(c)分析之LC-MS/MS MRM圖譜

結 論

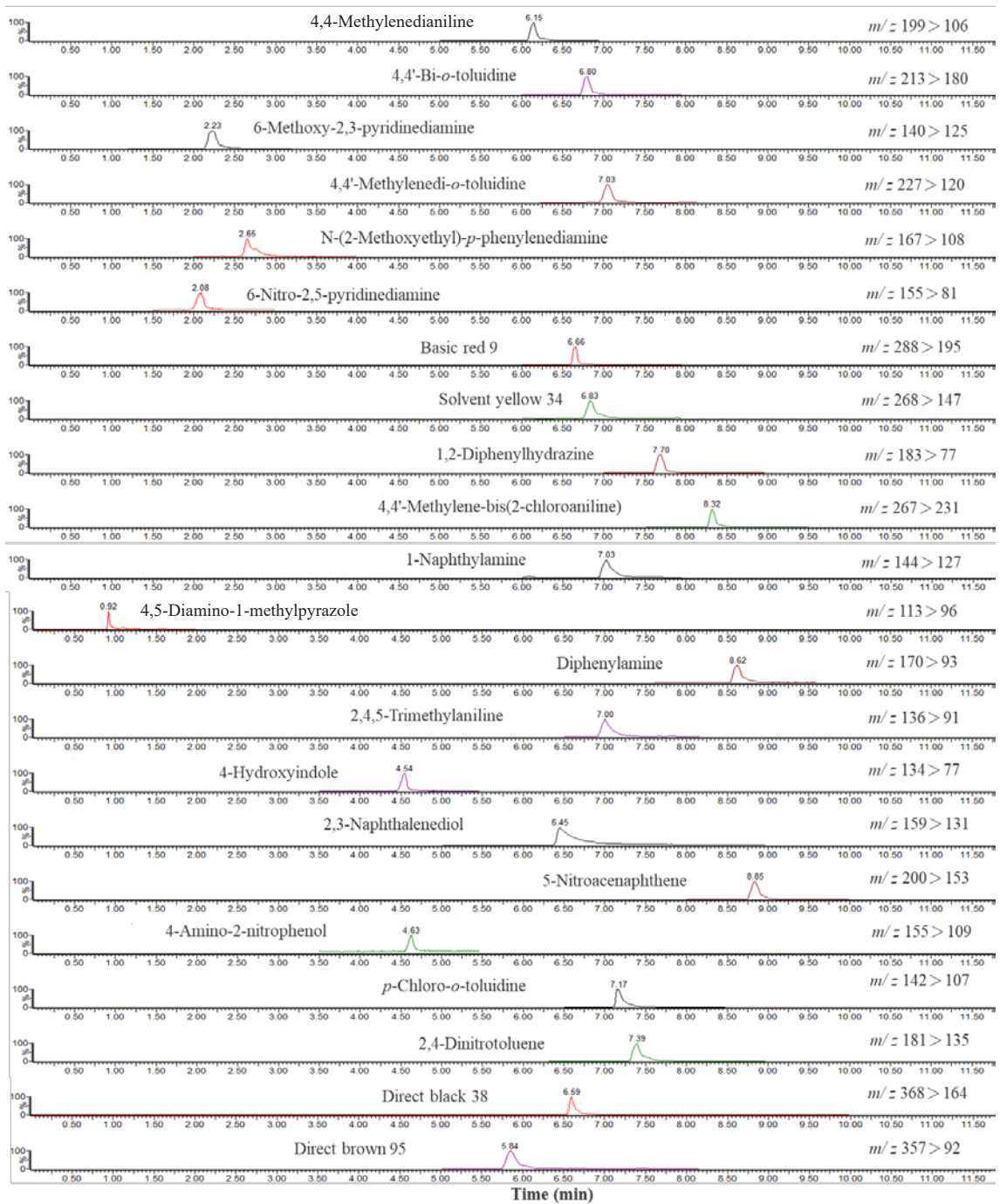
利用 LC-MS/MS 建立化粧品中 1-naphthylamine 等 22 種禁用染髮成分檢驗方法，可有效降低複雜基質造成檢驗誤判之可能

性。本研究方法已完成確效，其回收率及重複性良好，可應用於化粧品中禁用染髮劑成分之例行性檢驗。本研究建立之檢驗方法將公開於食藥署網站，提供地方衛生局及檢驗單位使用，可提升國內產業水準，增加國際競爭力並

表四、22種禁用染髮劑成分之MRM偵測參數

分析物	離子化 模式	離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
4,4'-Methylenedianiline	ESI ⁺	199 > 106 ^a 199 > 77	36	22 52
4,4'-Bi- <i>o</i> -toluidine	ESI ⁺	213 > 180 ^a 213 > 152	30	30 52
6-Methoxy-2,3-pyridinediamine	ESI ⁺	140 > 125 ^a 140 > 108	8	14 20
4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine	ESI ⁺	227 > 120 ^a 227 > 77	32	32 60
N-(2-Methoxyethyl)- <i>p</i> -phenylenediamine	ESI ⁺	167 > 108 ^a 167 > 80	24	16 40
6-Nitro-2,5-pyridinediamine	ESI ⁺	155 > 81 ^a 155 > 108	16	18 12
Basic red 9	ESI ⁺	288 > 195 ^a 288 > 151	26	28 54
Auramine	ESI ⁺	268 > 147 ^a 268 > 122	20	22 26
1,2-Diphenylhydrazine	ESI ⁺	183 > 77 ^a 183 > 51	12	16 38
4,4'-Methylene-bis (2-chloroaniline)	ESI ⁺	267 > 231 ^a 267 > 195	26	20 32
1-Naphthylamine	ESI ⁺	144 > 127 ^a 144 > 77	24	22 34
4,5-Diamino-1-methylpyrazole	ESI ⁺	113 > 96 ^a 113 > 55	25	14 18
Diphenylamine	ESI ⁺	170 > 93 ^a 170 > 65	28	30 32
2,4,5-Trimethylaniline	ESI ⁺	136 > 91 ^a 136 > 121	20	22 14
4-Hydroxyindole	ESI ⁺	134 > 77 ^a 134 > 107	14	6 40
2,3-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 131 ^a 159 > 141	2	16 20
5-Nitroacenaphthene	ESI ⁺	200 > 153 ^a 200 > 127	16	22 42
4-Amino-2-nitrophenol	ESI ⁺	155 > 109 ^a 155 > 92	48	14 26
<i>p</i> -Chloro- <i>o</i> -toluidine	ESI ⁺	142 > 107 ^a 142 > 125	36	16 20
2,4-Dinitrotoluene	ESI ⁻	181 > 135 ^a 181 > 116	12	6 18
Direct black 38	ESI ⁻	368 > 164 ^a 368 > 322	38	14 10
Direct brown 95	ESI ⁻	357 > 92 ^a 357 > 186	38	34 22

^a 定量離子對



圖四、以LC-MS/MS分析22種禁用染髮劑標準品之MRM圖譜

表五、22種禁用染髮劑成分線性範圍及基質效應評估

分析物	線性範圍 ($\mu\text{g/mL}$)	標準曲線	基質匹配檢量線	基質效應(%)
4,4-Methylenedianiline	0.001-0.2	$y = 13169x - 3483.3$	$y = 11937x + 1515.4$	-9.4
4,4'-Bi-o-toluidine	0.001-0.2	$y = 3887.4x - 1814.5$	$y = 4029.6x - 1169.3$	3.7
6-Methoxy-2,3-pyridinediamine	0.001-0.2	$y = 4035.7x + 101.73$	$y = 3693.6x + 183.75$	-8.5
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	0.001-0.2	$y = 6514.5x - 1600.6$	$y = 7001.6x - 2286.2$	7.5
N-(2-Methoxyethyl)- <i>p</i> -henylenediamine	0.001-0.2	$y = 4359.7x - 1300.7$	$y = 4242.4x - 800.1$	-2.7
6-nitropyridine-2,5-diamine	0.001-0.2	$y = 4036.3x - 894.18$	$y = 4047.6x - 1958.1$	0.3
Basic red 9	0.001-0.2	$y = 14771x + 1027.8$	$y = 15000x + 1238.9$	1.6
Auramine O	0.001-0.2	$y = 3578.8x + 1373.3$	$y = 3678.3x + 1177.9$	2.8
1,2-Diphenylhydrazine	0.01-0.2	$y = 2278x + 572.21$	$y = 2319x - 1851.55$	1.8
4,4'-Methylene-bis(2-chloroaniline)	0.01-0.2	$y = 298627x + 362.36$	$y = 307495x + 39.446$	3.0
1-Naphthylamine	0.01-0.2	$y = 255014x - 728.02$	$y = 270129x - 74.224$	5.9
Diphenylamine	0.01-0.2	$y = 168164x + 69.474$	$y = 167585x - 45.568$	-0.3
4,5-Diamino-1-methyl pyrazole	0.01-0.2	$y = 20920x - 8651.8$	$y = 22306x + 17134$	6.7
2,4,5-Trimethylaniline	0.01-0.2	$y = 145602x + 70.623$	$y = 157630x + 102.78$	8.3
4-Hydroxyindole	0.1-2	$y = 27536x - 1400.6$	$y = 28293x - 1480.9$	2.7
2,3-Naphthalenediol	0.1-2	$y = 24801x - 536.75$	$y = 24636x - 21.486$	-0.7
5-Nitroacenaphthene	0.1-2	$y = 49831x + 1415.9$	$y = 50820x - 445.79$	2.0
4-Amino-2-nitrophenol	1-10	$y = 1737.4x + 353.38$	$y = 1790.7x + 258.47$	3.1
<i>p</i> -Chloro-o-toluidine	1-10	$y = 10171x + 2185.5$	$y = 10899x + 1350.7$	7.2
2,4-Dinitrotoluene	1-10	$y = 726.94x + 75.033$	$y = 717.32x + 14.228$	-1.3
Direct black 38	1-10	$y = 109.66x + 104.45$	$y = 107.8x + 111.38$	-1.7
Direct brown 95	1-10	$y = 298.55x + 114.76$	$y = 281.4x + 144.83$	-5.7

監測上市化粧品之品質，保護國人健康。

參考文獻

1. Gran enciclopedia planeta. 2015. Colorants, fabric dyes and 345 foods. [http://www.planetasaber.com/theworld/gats/seccions/cards/default.asp?pk=796&art=59].
2. Essential Chemical Industry. 2013. Colorants. [http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/colorants.html].
3. Khumalo, N.P., Jessop, S. and Ehrlich, R. 2006. Prevalence of cutaneous adverse effects of hairdressing: a systematic review. Arch. Dermatol. 142(3): 377-383.
4. Søstved, H., Rustemeyer, T., Goncalo, M., Bruze, M. and *et al.* 2013. Contact allergy to common ingredients in hair dyes. Contact Derm. 69: 32-39.
5. European Commission. 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the council on cosmetic products. Annex III List of substances which cosmetic products must not contain except subject to

化粧品中禁用染髮劑成分分析方法之建立

表六、22種禁用染髮劑成分添加於空白染髮劑之平均回收率及變異係數

Compound	Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)	CV (%)	定量極限 (μg/g)
4,4-Methylenedianiline	0.02	108.1	5.3	0.02
	0.1	102.5	7.8	
<i>o</i> -Tolidine	0.02	110.8	3.9	0.02
	0.1	104.3	9.3	
6-Methoxy-2,3-pyridinediamine	0.02	98.0	5.8	0.02
	0.1	95.7	5.3	
4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine	0.02	103.4	10.6	0.02
	0.1	100.5	2.2	
N-(2-Methoxyethyl)- <i>p</i> -phenylenediamine	0.02	103.5	6.6	0.02
	0.1	107.2	8.9	
6-nitropyridine-2,5-diamine	0.02	99.2	8.6	0.02
	0.1	98.4	5.7	
Basic red 9	0.02	97.2	7.9	0.02
	0.1	99.0	2.5	
Solvent yellow 34	0.02	100.2	4.5	0.02
	0.1	99.5	2.1	
1,2-Diphenylhydrazine	0.2	98.1	5.4	0.2
	1	100.7	0.5	
4,4'-Methylene-bis(2-chloroaniline)	0.2	101.1	10.0	0.2
	1	101.2	7.8	
1-Naphthylamine	0.2	102.4	8.3	0.2
	1	110.7	4.2	
Diphenylamine	0.2	105.5	7.8	0.2
	1	103.9	4.1	
4,5-Diamino-1-methylpyrazole	0.2	105.0	4.5	0.2
	1	90.6	7.3	
2,4,5-Trimethylaniline	0.2	104.5	4.7	0.2
	1	107.4	8.2	
4-Hydroxyindole	2	104.5	6.5	2
	20	96.8	0.8	
2,3-Naphthalenediol	2	104.9	5.2	2
	20	100.1	0.9	
5-Nitroacenaphthene	2	102.0	7.1	2
	20	92.6	2.6	
4-Amino-2-nitrophenol	20	99.6	4.8	20
	50	98.6	1.4	

表六、22種禁用染髮劑成分添加於空白染髮劑之平均回收率及變異係數(續)

Compound	Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)	CV (%)	定量極限 (μg/g)
<i>p</i> -Chloro-o-toluidine	20	103.3	5.3	20
	50	102.1	3.9	
2,4-Dinitrotoluene	20	96.5	8.0	20
	50	97.8	2.7	
Direct black 38	20	95.0	6.5	20
	50	97.4	3.3	
Direct brown 95	20	88.5	4.4	20
	50	97.0	2.4	

^a Mean, n=15.

the restrictions laid down. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20III_v2.pdf].

6. European Commission. 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the council on cosmetic products. Annex II List of substances prohibited in cosmetic products. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20II_v2.pdf].
7. 衛生福利部。2019。特定用途化粧品成分名稱及使用限制表。108.05.30衛授食字第1081601759號公告。
8. Zou, T., He, P., Yassen, A. and Li, Z. 2013. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. Food Chem. 138: 1742-1748.
9. Culzoni, M.J., Schenone, A.V., Llamas, N.E., Garrido, M. and *et al.* 2009. Fast chromatographic method for the determination of dyes in beverages by using high performance liquid chromatography-diode array detection data and second order algorithms. J. Chromatogr. A 1216(42): 7063-7070.
10. Rastogi, S.C., Barwick, V.J. and Barwick, S.V. 1997. Identification of organic colourants in cosmetics by HPLC-diode array detection. Chromatographia 45(1): 215-228.
11. Guerra, E., Celeiro, M., Lamas, J.P., Llompart, M. and *et al.* 2015. Determination of dyes in cosmetic products by micro-matrix solid phase dispersion and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1415: 27-37.

Establishment of Analytical Method for Banned Hair Dyes in Cosmetics

SHIN-HAO CHEN, SHU-HAN CHANG, SHOU-CHIEH HUANG,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

A simple and fast method was developed for simultaneous determination of 22 banned hair dyes in cosmetics by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample was dissolved by methanol and then extracted by ultrasonication for 30 min. After centrifugation and filtration, the filtrate was separated by the ACQUITY BEH Shield RP 18 column at gradient elution of 10 mM ammonium formate and acetonitrile. The analysis could be accomplished within 15 min by employing electrospray ionization (ESI) with the multiple reaction monitoring (MRM) mode for detection. By using commercially available hair dyes as blank sample, and adding appropriate amount of standard solution to get the final concentration between 0.2-50 ppm. After performing 5 repetitions for 3 consecutive days, the average recovery rate was between 88.5% and 110.8%. The coefficients of variation (CV, %) were all less than 10.6%. The ion enhancement or inhibition of the matrix effects were less than 9.1%. This method can be applied to the monitoring of post-marketing products to protect the health and safety of consumers.

Key words: LC-MS/MS, banned hair dyes, cosmetics