

利用液相層析串聯質譜法分析化粧品中染髮劑成分

陳信豪 黃守潔 陳玉盆 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究係利用高效液相串聯質譜儀(LC/MS/MS)建立一簡單、快速的方法能同時分析等24種限用及1種禁用染髮劑成分。檢體以50%甲醇溶液溶解定容後，以0.22 μm 濾膜過濾，經Waters AQUITY UPLC HSS T3層析管柱(2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μm)；採用10 mM甲酸銨水溶液(以氨水調整pH值至9)及甲醇/乙腈(1:1, v/v)為移動相作梯度沖提；流速為0.3 mL/min；利用正負離子電灑游離法(ESI)，搭配多重反應監測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)偵測。25種成分之標準曲線線性範圍為0.05 - 25 $\mu\text{g/mL}$ ，迴歸係數 R^2 皆為0.997以上，同日內及異日間之相對標準偏差均小於10.44%，添加回收試驗結果，回收率介於81.2 - 120.3%，相對標準偏差均小於6.9%。本方法將提供各界檢驗之參考。

關鍵詞：化粧品、染髮劑、高效液相層析串聯質譜儀

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全球市場調查顯示，染髮的人口達80%，已超過燙髮的人口75%，且日益普及於各年齡層⁽¹⁾。染髮劑可分成暫時性、半永久性及永久性等三種。暫時性染髮劑主要透過碳黑及無機顏料使其附著於頭髮表面，達到染髮效果；半永久性染髮劑主要包括偶氮酸性染料及苯甲醇(benzyl alcohol)，染髮劑透過滲透到角質層表層，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，基本上由芳香胺(aromatic diamines)、胺基酚(aminophenols)和多羥基苯(polyhydroxybenzenes)所組成，產品主要有二

劑分別為，第一劑氨水溶液和染髮劑成分，第二劑為過氧化氫成分，這些染髮劑可分成中間體和偶合劑，透過氨水打開毛鱗片滲透進入頭髮的皮質層後，透過過氧化氫發生氧化反應，產生偶合及縮合反應形成較大的染料分子，使得染髮劑可以鎖住頭髮皮質層內。由於染髮劑中間體和偶合劑的種類及含量比例的差別，可產生多種色調的反應產物，讓頭髮染上不同的顏色⁽²⁾。根據Khumalo等人之薈萃分析(meta-analysis)探討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⁾，因此了解染髮劑之成分相當重要。有鑑於染髮劑的潛在風險，我國將染髮劑列屬於含藥化粧品管理，截至105年食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)公告之含藥化粧品基準中列載之染髮劑成分有

115種⁽⁴⁾，為管理需求，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法(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，具多種同分異構物，如氨基苯酚、苯二胺等，UV圖譜判斷困難，又產品基質複雜，常會有共析出(co-elute)之問題，使得檢驗結果出現基質干擾現象。液相層析串聯質譜法進行分析，不僅可利用化合物滯留時間作為鑑別依據外，亦可利用分子片段及相對離子強度比(ion ratio)等資訊作為定性上之依據，可減少染髮劑中基質共析出而造成鑑別上之誤判⁽⁵⁻⁷⁾。因此食藥署收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(LC/MS/MS)之多重染髮劑檢驗方法，並逐年增加染髮劑檢驗項目。第一階段針對市面上販售髮劑產品，統整出較常使用染髮劑種類，於103年完成建立25項禁用或限用染髮劑成分⁽⁸⁾，104年繼續針對含藥化粧品基準中列載染髮劑成分中之25項禁限用染髮劑成分進行方法的開發，以期建立一準確、簡便及快速之檢驗方法，可應用於例行性化粧品中染髮劑之檢驗方法之一，以維護民眾使用安全，並提供各界檢驗之參考。

材料與方法

一、材料

p-Amino-*o*-cresol、2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol、Picramic acid、2-Amino-5-nitrophenol、5-(2-Hydroxyethylamino)-2-methylphenol、Hydroxyethyl-*p*-phenylenediamine sulfate及

4,4-Diaminodiphenolamine sulfate等對照用標準品皆購自Tokyo Chemical Industry Co., TCI, Japan。5-Amino-6-chloro-*o*-cresol、4-Hydroxypropylamino-3-nitrophenol、3-Nitro-*p*-hydroxyethylaminophenol、N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*p*-phenylenediamine Sulfate、2-Amino-4-hydroxyethylaminoanisole及Hydroxyethyl-2-nitro-*p*-toluidine等對照用標準品皆購自AK Scientific, USA。Toluene 3,4-diamine、2,7-Naphthalenediol、2-Amino-4-nitrophenol及2,4-Diaminodiphenylamine等對照用標準品皆購自ChemService, USA。1-Hydroxyethyl-4,5-diamino pyrazole sulfate及N,N-Dimethyl-*p*-phenylenediamine Sulfate等對照用標準品皆購自Sigma-Aldrich, USA。2,6-Dihydroxy-3,4-dimethyl pyridine對照用標準品購自Matrix Scientific, USA。1,4-Diaminoanthraquinone及Hydroxyethyl-3,4-methylenedioxyaniline HCl對照用標準品皆購自Alfa Aesar, Britain。2,6-Dihydroxyethylaminotoluene對照用標準品購自Brookview Scientific, LLC, Japan。Gallic acid對照用標準品購自Tauto Biotech, China。甲酸鉍及氨水購自Sigma-Aldrich, USA，甲醇及乙腈採用LC級，購自德國Merck公司。濾膜(0.22 μ m, PTEF)購自Titan。

二、儀器設備

液相層析串聯質譜儀(Acquity UPLC及TQD MS，美國Waters公司Milford, MA, USA)產品。資料處理系統為Target Lynx控制積分軟體。搭配電灑游離法(electrospray ionization, ESI)。所使用霧化氣體(sheath gas)及去溶劑氣體(desolvation gas)皆為氮氣(nitrogen，豐明氣體，台灣)；碰撞室(collision chamber)內所使用之碰撞氣體(collision gas)為氬氣。層析管柱為Waters ACQUITY UPLC HSS T3層析管柱(I.D. 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μ m)。純水製造機(Milli-Q

Waters. Purification System, Milli-pore Corp, USA)。

三、標準品儲備溶液之配製

分別取25種染髮劑成分對照用標準品約10 mg，精確稱定，分別以50% 甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液(1000 µg/mL)，4°C 儲藏。

四、檢液之配製

取經均質之檢體約1.0 g，精確稱定，先以50%甲醇15 mL溶解，經超音波振盪30分鐘後，再定容至20 mL，取適量以0.22 µm濾膜過濾後，供做檢液。

五、液相層析串聯質譜條件

(一)液相層析儀

層析管柱：Acquity UPLC HSS T3，2.1 × 100 mm，1.8 µm

移動相：A液為10 mM甲酸銨水溶液(以氨水調整pH值至9)；B液甲醇/乙腈(1:1, v/v)，移動相梯度如表一

層析管柱溫度：35°C

流速：0.3 mL/min

注入量：3.0 µL

(二)串聯質譜儀設定(離子源採電灑法離子化，偵測正/負離子)(表一)

毛細管電壓：2.85 kV

離子源溫度：150°C

溶媒揮散溫度：500°C

偵測模式：多重反應偵測

六、標準曲線(Standard curve)之製作

取25種染髮劑混和標準液，使濃度範圍分別為0.05 - 0.5 µg/mL、0.5 - 5 µg/mL及2 - 25 µg/mL，經濾膜過濾後進行分析，以波峰面積對濃度作圖，製作標準曲線。

七、重複性分析

(一)同日間(intraday)

配製5種濃度的標準品溶液，於同一日內連續分析3次，計算相對標準偏差(RSD%)，n = 3。

(二)異日間(interday)

配製5種濃度的標準品溶液，於不同3日分析，每一濃度重複亦分析3次，計算相對標準偏差(RSD%)，n = 9。

八、添加回收試驗

取空白檢體約1.0 g，分別加入25種氧化染髮成分標準溶液，稀釋後濃度為0.05 - 10 µg/mL，經重複分析3次，求其濃度，計算其回收率(Recovery)。

九、定量極限之評估

取均質化後之空白檢體，加入適量標準溶液分別分析，每一添加量進行3重複試驗，就所得波峰之訊號強度計算訊噪比(S/N ratio)，此根據歐

盟2002/657/EC規範⁽⁹⁾，以定性離子訊噪比大於3且定量離子訊噪比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

一、LC/MS/MS最適分析條件

本研究使用ACQUITY UPLC HSS T3 (I.D. 2.1 × 100 mm, 1.8 µm)管柱，其主要特性是針對小分子化合物及分子極性較高者有較好之滯留性。移動相選擇則參考Rongjie等人研究⁽⁶⁾，移動相A採用10 mM甲酸銨水溶液，並比較不同pH值的影響，結果發現以氨水調整至pH 9時，可使25種標準品滯留時間穩定，提

表一、梯度(gradient)沖提條件

Time (min)	A (%)	B (%)
0 → 3	95→95	5→5
3 → 8	95→70	5→30
8 → 10	70→5	30→95
10 → 13	5→5	95→95
13 → 13.5	5→95	95→5
13.5 → 15	95→95	5→5

高分析之再現性，移動相B為有機相，單使用甲醇時，發現峰形較寬造成解析度降低，使用乙腈雖可提高沖提效率，但容易產生溶劑效應，導致峰形不對稱。因此本研究方法選擇甲醇/乙腈(1:1, v/v)，使二溶劑互補，達到較好的層析效果。為了同時分析25種染髮劑成分，移動相A (10 mM甲酸銨水溶液，pH 9)與移動相B(甲醇/乙腈，1:1, v/v)採梯度(gradient)沖提，條件如表一，流速為0.3 mL/min，可於15分鐘內完成分析。利用正/負離子電灑法多重反應偵測，25種染髮劑成分選定之母離子所形成的碎片中，挑選具分子特異性之子離子做為MRM定性離子，以訊號相對較強之子離子做為定量離子，結果如圖一。其中2-Amino-4-nitrophenol、2-Amino-5-nitrophenol及4,4-Diaminodiphenylamine、2,4-Diaminodiphenylamine等2組異構物成分亦可透過此層析條件達到分離，如圖二所示。

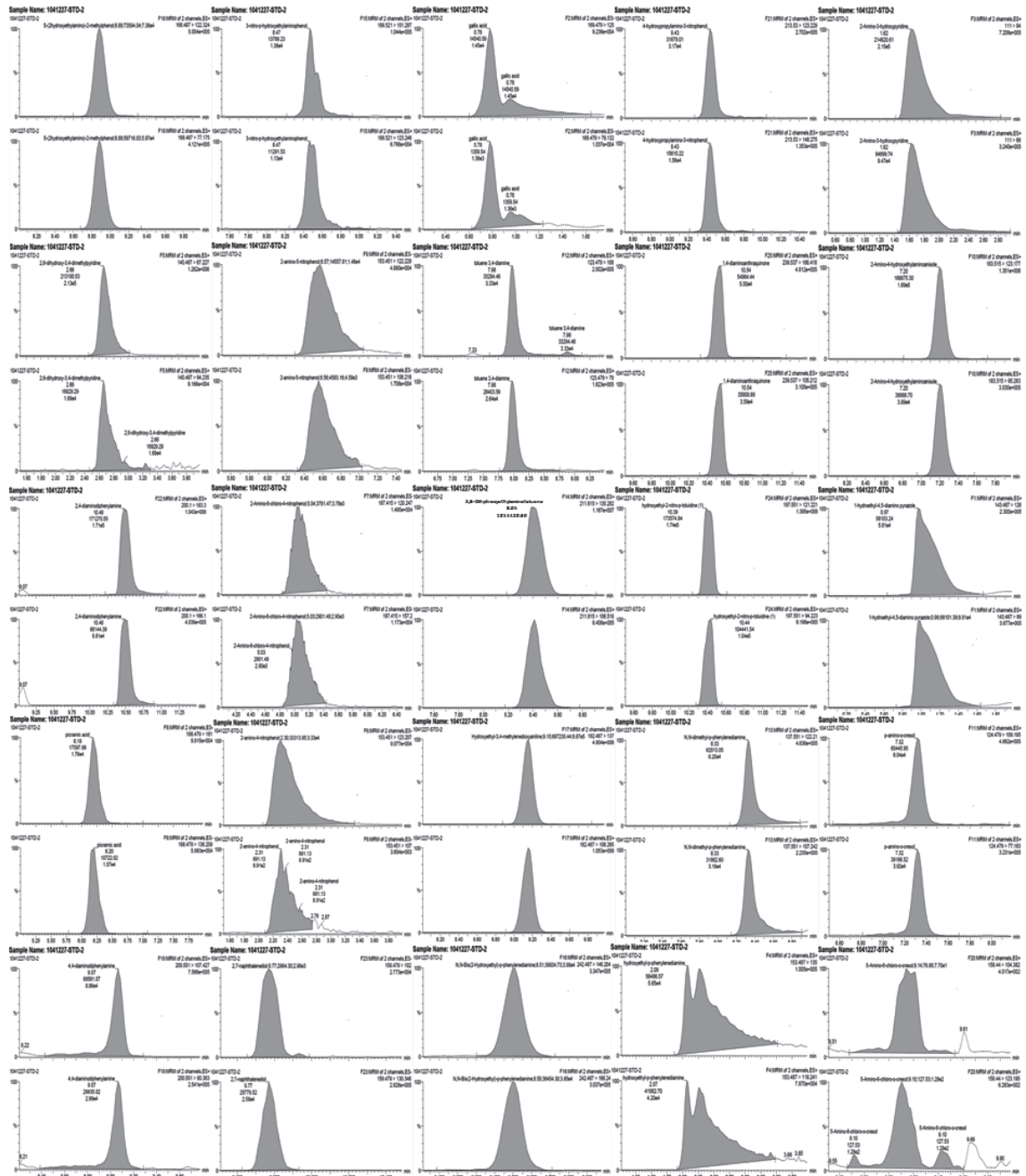
二、質譜最佳條件

25種染髮劑成分於負離子掃描模式下，可得到1-Hydroxyethyl-4,5- diamino pyrazole sulfate、2-Amino-3-hydroxypyridine、Hydroxyethyl-*p*- phenylenediamine sulfate、2-Amino-4-hydroxyethylaminoanisole、2,6-Dihydroxyethylaminotoluene、Hydroxyethyl-3,4- methylenedioxyaniline、N,N-Dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate、

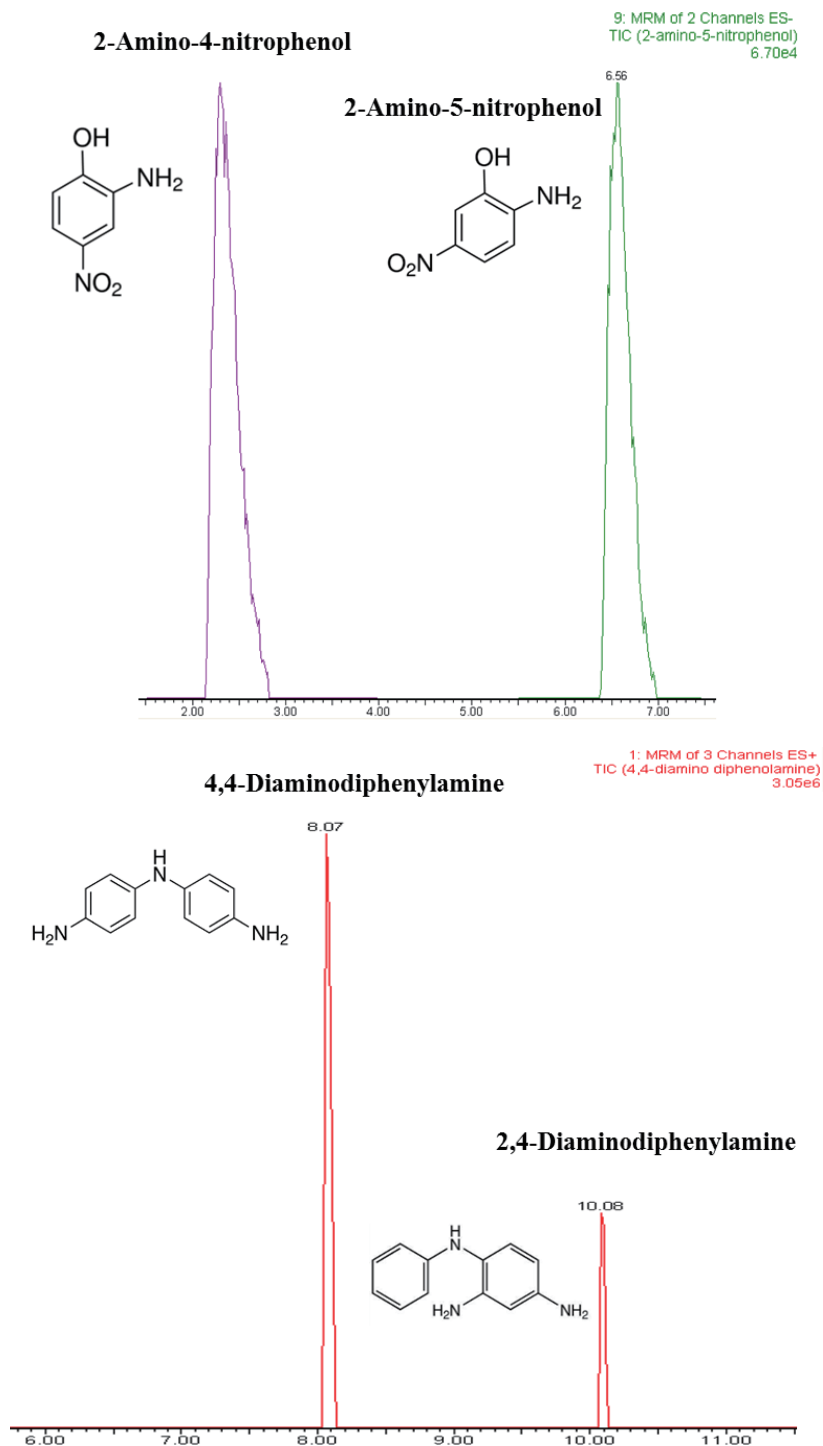
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*p*-phenylenediamine sulfate、5-(2-Hydroxyethylamino)-2-methylphenol、4-Hydroxypropylamino-3-nitrophenol、1,4-Diaminoanthraquinone、Hydroxyethyl-2-nitro-*p*-toluidine、2,6-Dihydroxy-3,4-dimethylpyridine、*p*-Amino-*o*-cresol、Toluene 3,4-diamine、3-Nitro-*p*- hydroxyethylaminophenol、4,4-Diaminodiphenolamine sulfate、5-Amino-6-chloro-*o*-cresol及2,4-Diaminodiphenylamine之質子化分子(deprotonated molecule, $[M-H]^+$)，分別為143、111、153、184、212、182、138、242、168、214、240、197、140、124、123、200、201、158及200 m/z；而在正離子掃描模式下，可得到Gallic acid、2-Amino-4-nitrophenol、2-Amino-6-chloro-4- nitrophenol、Picramic acid、2-Amino-5-nitrophenol及2,7-Naphthalenediol去質子分子(protonated molecule, $[M-H]$)，分別為169、153、187、198、153及159 m/z。本研究方法使用串聯質譜儀以三段式四極桿(MRM)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，產生子代離子碎片，再由第三段四極桿(Q3)選擇特定子離子進行偵測，最後以儀器自動化調整其參數(表二)，並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最強之子代離子為定量離子(quantitative ion)，次強為定性離子(confirming ion)以及最佳碰撞能量，如表三。

表二、串聯式質譜儀電灑游離法參數設定

Parameter	Value
Capillary (kV)	2.85
Source Temperature (°C)	150.00
Desolvation Temperature (°C)	500.00
Desolvation gas flow (L/Hr)	900.00
Collision Gas Flow(mL/min)	0.16



圖一、25種染髮劑成分於LC/MS/MS多重反應偵測圖譜之定量及定性離子對



圖二、(a) 2-Amino-4-nitrophenol及2-Amino-5-nitrophenol；
(b) 4,4-Diaminodiphenylamine及2,4-Diaminodiphenylamine 同分異構物染髮劑成分之總離子層析圖

表三、多重反應監測（Multiple Reaction Monitoring，MRM）條件及定量極限

分析物	離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	定量 極限 (%)
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
1-Hydroxyethyl-4,5-diamino pyrazole sulfate	ESI ⁺	143 > 99* 143 > 126	28	12 10	0.0001
2-Amino-3-hydroxypyridine	ESI ⁺	111 > 94* 111 > 66	40	14 16	0.0001
Hydroxyethyl- <i>p</i> -phenylene diamine sulfate	ESI ⁺	153 > 135* 153 > 118	24	20 22	0.0001
2-Amino-4-hydroxyethyl aminoanisole	ESI ⁺	184 > 123* 184 > 95	28	22 36	0.0001
2,6-Dihydroxyethyl aminotoluene	ESI ⁺	212 > 135* 212 > 107	36	24 38	0.0001
Hydroxyethyl-3,4-methylene dioxyaniline	ESI ⁺	182 > 137* 182 > 106	28	16 18	0.0001
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -phenylene diamine sulfate	ESI ⁺	138 > 122* 138 > 107	30	20 22	0.0001
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)- <i>p</i> - phenylenediamine sulfate	ESI ⁺	242 > 146* 242 > 166	28	22 20	0.0001
5-(2-Hydroxy ethylamino)- 2-methylphenol	ESI ⁺	168 > 122* 168 > 77	32	18 20	0.0001
4-Hydroxypropylamino-3- nitrophenol	ESI ⁺	214 > 123* 214 > 148	26	12 12	0.0001
1,4-Diaminoanthraquinone	ESI ⁺	240 > 166* 240 > 105	50	28 30	0.0001
Hydroxyethyl-2-nitro- <i>p</i> - toluidine	ESI ⁺	197 > 121* 197 > 94	24	14 18	0.0001
2,6-Dihydroxy-3,4-dimethyl pyridine	ESI ⁺	140 > 67* 140 > 94	40	20 14	0.0001
Gallic acid	ESI ⁻	169 > 125* 169 > 79	32	12 20	0.001
2-Amino-4-nitrophenol	ESI ⁻	153 > 123* 153 > 107	36	14 16	0.001
<i>p</i> -Amino- <i>o</i> -cresol	ESI ⁺	124 > 109* 124 > 77	34	16 22	0.001
2-Amin-6-chloro-4-nitro phenol	ESI ⁻	187 > 120* 187 > 157	38	20 14	0.001
Picramic acid	ESI ⁻	198 > 181* 198 > 138	34	12 16	0.001

表三、多重反應監測 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 條件及定量極限(續)

分析物	離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	定量 極限 (%)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
Toluene 3, 4-diamine	ESI ⁺	123 > 106* 123 > 79	34	18 22	0.001
2-Amino-5-nitrophenol	ESI ⁻	153 > 122* 153 > 106	38	14 18	0.001
3-Nitro- <i>p</i> -hydroxyethyl aminophenol	ESI ⁺	200 > 151* 200 > 123	24	10 12	0.001
4,4-Diaminodiphenolamine sulfate	ESI ⁺	201 > 107* 201 > 80	32	18 34	0.001
5-Amino-6-chloro- <i>o</i> -cresol	ESI ⁺	158 > 123* 158 > 104	26	20 16	0.001
2,4-Diaminodiphenylamine	ESI ⁺	200 > 183* 200 > 166	28	12 20	0.001
2,7-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 130* 159 > 102	44	20 22	0.004

*: 定量離子

三、方法確效試驗

25種染髮劑成分混合標準品濃度針對不同感度進行稀釋，分別為0.05 - 0.5 µg/mL、0.5 - 5 µg/mL及2 - 25 µg/mL之線性範圍，所繪製之標準曲線公式，判定係數(R²)皆在0.9961以上。分別配製5種不同濃度之標準品溶液，於同日內及異日間分析，其結果如表四，同日內及異日間試驗之相對標準偏差，分別介於0.12 - 10.42%及0.16 - 10.44%之間，顯示出本研究方法具有良好之再現性。取均質化之植物增色美髮產品，添加25種染髮劑混合標準液，

經稀釋後上機濃度分別介於0.05 - 10 µg/mL，所得之添加回收率，其回收率介於81.2 - 120.3%之間，相對標準偏差(RSD)均小於6.9% (表五)。由結果得知，本分析方法具有良好之回收率。由於各分析物感度不一致，以定性離子訊噪比大於3且定量離子訊噪比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限，25種染髮劑之

定量極限介於0.0001 - 0.004% (表四)。

本研究利用LC/MS/MS建立化粧品中25種染髮劑成分之檢驗方法，可以取代傳統薄層色層分析(TLC)及HPLC等分析方法，有效節省分析時間，同時可以提高檢驗之準確度的可能性。本方法可提供各界檢驗染髮劑之參考。

參考文獻

1. 陳麗舟、陳合進、陳載永。2007。植物色素應用於染髮劑之介紹。林業研究季刊，29 (2): 89-96。
2. European Commission Scientific Committee on Consumer Safety. 2007. Opinion on Toluene-2,5-diamine and Its Sulphate. [http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_108.pdf].
3. Khumalo, N. P., Jessop, S. and Ehrlich, R. 2006. Prevalence of cutaneous adverse effects

表四、25種染髮劑之同日內(intar-day)及異日間(inter-day)重複性分析及方法定量極限(LOQ)結果

Compounds	RSD (%)		LOQ (%)
	Intraday *	Interday *	
1-Hydroxyethyl-4,5-diamino pyrazole sulfate	0.15 - 2.04	0.77 - 10.44	0.0001
2-Amino-3-hydroxypyridine	0.51 - 5.38	0.31 - 9.63	0.0001
Hydroxyethyl- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	0.12 - 0.75	0.36 - 7.76	0.0001
2-Amino-4-hydroxyethylaminoanisole	0.12 - 2.01	0.55 - 6.38	0.0001
2,6-Dihydroxyethylaminotoluene	0.34 - 2.56	0.43 - 9.03	0.0001
Hydroxyethyl-3,4-methylenedioxyaniline	0.72 - 9.09	0.24 - 3.17	0.0001
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	0.19 - 10.42	0.58 - 6.67	0.0001
N,N-Bis (2-hydroxyethyl)- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	1.54 - 4.56	1.08 - 8.61	0.0001
5-(2-Hydroxyethylamino)-2-methylphenol	1.02 - 4.69	0.95 - 9.55	0.0001
4-Hydroxypropylamino-3-nitrophenol	0.21 - 2.20	0.59 - 9.38	0.0001
1,4-Diaminoanthraquinone	0.53 - 2.90	0.34 - 5.65	0.0001
Hydroxyethyl-2-nitro- <i>p</i> -toluidine	0.19 - 4.79	0.20 - 5.89	0.0001
Gallic acid	0.15 - 2.31	0.20 - 3.23	0.0001
2,6-Dihydroxy-3,4-dimethylpyridine	0.23 - 1.66	0.22 - 6.45	0.001
2-Amino-4-nitrophenol	0.36 - 2.67	0.24 - 3.17	0.001
<i>p</i> -Amino- <i>o</i> -cresol	0.30 - 1.93	0.58 - 6.67	0.001
2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol	0.21 - 3.81	0.16 - 3.53	0.001
Picramic acid	0.76 - 6.76	0.94 - 6.26	0.001
Toluene 3, 4-diamine	0.22 - 1.06	0.39 - 5.52	0.001
2-Amino-5-nitrophenol	0.47 - 2.67	0.41 - 8.05	0.001
3-Nitro- <i>p</i> -hydroxyethylaminophenol	1.13 - 1.96	1.10 - 9.19	0.001
4,4-Diaminodiphenylamine sulfate	0.24 - 2.05	0.46 - 7.83	0.001
5-Amino-6-chloro- <i>o</i> -cresol	0.39 - 10.40	0.18 - 10.0	0.001
2,4-Diaminodiphenylamine	0.24 - 3.64	0.67 - 7.81	0.001
2,7-Naphthalenediol	0.77 - 4.41	0.63 - 5.90	0.004

*, n = 3

of hairdressing: a systematic review. Archives of Dermatology 142: 377-383.

- 食品藥物管理署。2015。化粧品衛生管理條例暨相關法規彙編。化粧品含有醫療或毒劇藥品基準（含藥化粧品基準）。
- Huang, M., Russo, R., Fookes, B. G., and Sigman, M. E. 2005. Analysis of Fiber Dyes By Liquid Chromatography Mass

Spectrometry (LC-MS) with Electrospray Ionization: Discriminating Between Dyes with Indistinguishable UV-Visible Absorption Spectra. J. Forensic Sci.50 (3): 1-8.

- Chambers, S., Ziling Lu, D. M., and Mazzeo, J. R. 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. J. Chromatogr. B. 852: 22-34.

表五、25種染髮劑之添加回收結果

Compounds	Spiked conc. ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%) Mean*	RSD (%) Mean*
1-Hydroxyethyl-4,5-diamino pyrazole sulfate	0.05	116.4	0.19
	0.1	103.8	0.3
	0.25	98.8	0.13
2-Amino-3-hydroxypyridine	0.05	109.4	2.65
	0.1	112.8	4.65
	0.25	114.7	0.81
Hydroxyethyl- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	0.05	84.3	2.65
	0.1	108.7	4.65
	0.25	105.9	2.26
2-Amino-4-hydroxyethylaminoanisol	0.05	81.9	1.48
	0.1	101.1	2.50
	0.25	105.5	0.84
2,6-Dihydroxyethylaminotoluene	0.05	81.8	3.39
	0.1	91.8	3.38
	0.25	98.4	2.95
Hydroxyethyl-3,4-methylenedioxyaniline	0.05	117.0	0.96
	0.1	99.2	0.27
	0.25	100.1	0.40
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	0.05	82.9	1.66
	0.1	115.8	0.18
	0.5	85.1	1.25
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)- <i>p</i> -phenylenediamine sulfate	0.05	104.3	1.66
	0.1	108.2	0.18
	0.25	107.1	4.71
5-(2-Hydroxyethylamino)-2-methylphenol	0.05	106.2	1.91
	0.1	83.0	2.79
	0.2	105.4	1.85
4-Hydroxypropylamino-3-nitrophenol	0.05	81.8	4.49
	0.1	90.2	4.43
	0.2	96.9	0.61
1,4-Diaminoanthraquinone	0.05	96.8	1.40
	0.1	102.2	2.38
	0.25	91.7	2.31
Hydroxyethyl-2-nitro- <i>p</i> -toluidine	0.05	97.5	3.13
	0.1	98.6	2.48
	0.25	95.4	4.26

表五、25種染髮劑之添加回收結果(續)

Compounds	Spiked conc. ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%) Mean*	RSD (%) Mean*
2,6-Dihydroxy-3,4-dimethylpyridine	0.05	85.5	2.73
	0.1	101.1	1.06
	0.2	116.4	1.18
	0.5	95.3	0.42
Gallic acid	1.0	99.9	0.37
	2.5	96.2	0.81
	0.5	92.4	5.63
2-Amino-4-nitrophenol	1.0	97.9	0.39
	2.5	119.9	0.55
	0.5	85.0	0.44
<i>p</i> -Amino- <i>o</i> -cresol	1.0	100.0	1.77
	2.0	98.4	0.87
	0.5	95.4	2.39
2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol	1.0	113.2	3.06
	2.5	96.5	0.86
	0.5	111.6	4.18
Picramic acid	1.0	102.0	6.91
	2.0	93.6	0.10
	0.5	116.5	0.2
Toluene 3, 4-diamine	2.0	89.2	1.88
	2.5	90.1	2.08
	0.5	103.1	1.45
2-Amino-5-nitrophenol	1.0	120.3	0.48
	2.5	113.2	0.96
	0.5	97.6	2.03
3-Nitro- <i>p</i> -hydroxyethylaminophenol	1.0	99.7	1.12
	2.0	104.4	1.93
	0.5	83.1	4.05
4,4-Diaminodiphenylamine sulfate	1.0	93.4	0.03
	2.5	105.7	0.17
	0.5	82.3	3.80
5-Amino-6-chloro- <i>o</i> -cresol	1.0	97.1	6.90
	2.0	120.2	1.60
	0.5	81.2	1.10
2,4-Diaminodiphenylamine	1.0	92.7	0.44
	2.5	100.4	0.48
	2.0	100.0	2.76
2,7-Naphthalenediol	5.0	93.8	2.00
	10	99.1	0.23

7. Fu, R., Cao, M. and Wang, Y. 2012. Fast analysis of hair dyes using an Agilent Poroshell 120 Bouns-RP column by UHPLC and LC/MS/MS. Application Note, Agilent Technologies Inc. publication number 5991-1289 EN.
8. 陳信豪、黃守潔、陳玉盆、周秀冠。2015。化粧品中染髮劑成分分析方法之建立。食品藥物研究年報，6: 270-28。
9. Commission of the European (EU). 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the analytical methods and the interpretation of results. 2002/657/EC, OJ L221/8.
[<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&rid=1>].

Determination of Oxidative Hair Dyes in Cosmetic by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SHIN-HAO CHEN, SHOU-CHIEH HUANG, YU-PEN CHEN,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

A rapid and specific method for the determination and quantification of 25 hair dyes in cosmetics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was established. 24 kinds banned and 1 restricted dyestuffs in hair dyes was established. The samples were dissolved in 50% methanol for analysis liquid chromatography was performed using an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) column with 10 mM ammonium formate (adjusted to pH 9 with ammonia) and methanol/acetonitrile (1:1, v/v) solution as eluent under gradient program at flow rate of 0.3 mL/min. Electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for detection. The concentration range of the standards was 0.05 - 25 μg/mL, with excellent linearity at $R^2 > 0.997$ and intra-day and inter-day relative standard deviations of less than 10.44%. The average of recoveries of spiked samples were 81.2 - 120.3%, with relative standard deviations of less than 6.9%.

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