

利用液相層析串聯質譜法分析化粧品中之禁用色素

陳信豪 黃守潔 陳玉盆 闕麗卿 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究係利用高效液相層析串聯式質譜法 (LC/MS/MS) 建立一簡便且快速的方法，檢體以50%乙腈水溶液溶解後，經Waters ACQUITY UPLC BEH C18 層析管柱 (2.1 × 10 cm, 1.7 μm)，採用5 mM甲酸銨水溶液及乙腈為移動相作梯度沖提，並以多重反應監測模式 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 偵測，可同時分析化粧品中Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12等7種禁用色素成分。7種成分標準曲線線性範圍為0.001-0.250 mg/mL，標準曲線線性回歸係數 r^2 皆為0.9989以上。添加回收試驗結果，回收率介於80.6-117.2%，相對標準偏差均小於9.7%。應用本研究建立之方法檢測市售化粧品共10件，分析結果並未檢出7種禁用色素。

關鍵詞：高效液相層析串聯式質譜法、禁用色素、化粧品

前 言

化粧品已成為人們日常生活中必需品，色素更是化粧品中不可或缺的著色劑，能使其色彩更奪目，並增加視覺上之效果，而達到美化修飾的作用⁽¹⁾。偶氮染料因染料分子中含有偶氮基而得名，它具合成技術簡單、成本低廉、染色效果佳等優點，被廣泛使用。部分偶氮結構的染料在經過裂解後會形成致癌的芳香胺化合物，因此部分偶氮染料遭到禁用⁽²⁾。我國化粧品衛生管理條例第18條有規定製造化粧品，除使用法定化粧品色素外，其他色素，非經中央衛生主管機關核准，不得使用。前項法定化粧品色素之品目，由中央衛生主管機關定之⁽³⁾。其中Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12等7

種色素列屬於我國化粧品中禁止使用成分⁽⁴⁾，而歐盟及中國大陸亦禁止上述色素使用於化粧品中⁽⁴⁻⁶⁾。

目前化粧品中色素測定主要以高效液相層析法(HPLC)搭配二極體陣列檢出器(PDA)為經常使用之方法，但傳統液相層析法對化合物之定性為利用滯留時間做為判斷，但對於結構相似之色素，卻無法分辨其成分，而化粧品基質複雜，往往會有共析出(co-elute)之問題，造成分析上的誤判。利用液相層析結合質譜法進行分析(LC/MS/MS)，除了可利用滯留時間作為鑑別依據外，藉由分子片段及強度比例等資訊作為定性上之依據，可減少因化粧品中共析出的基質而造成鑑別上之誤判⁽⁷⁾。目前液相層析串聯質譜法之大氣壓游離方式可分為電灑游離法(electrospray ionization, ESI)及大氣壓化學游離法(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)等兩種游離化方式。電灑游離法是將溶

液離子經高溫氣化後直接轉為氣相離子之游離化方式，主要適用於分析熱不穩定、高極性、分子量之大化合物。大氣壓化學游離法通常用來分析中低極性並具有揮發性之化合物⁽⁷⁾。

本研究擬建立一高效液相層析串聯質譜法可準確、簡便及快速測定化粧品中上述7種禁用色素成分，降低檢出結果之誤判，並應用於未來例行性化粧品之檢測，以維護消費者使用安全。

材料與方法

一、樣品來源

102年1至12月間，由各縣市衛生局抽驗檢體，以化粧品檢體類別再細分為洗髮類7件及沐浴乳3件，共計10件。

二、試藥

215 Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 10)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12等7種禁用色素成分對照用標準品皆為USP級標準品。甲酸銨(ammonium formate)購自Sigma Chemical, USA，乙腈採用LC級，購自德國Merck公司。濾膜(0.22 μm ，PTFE)購自Titan。

三、器具

定量瓶、濾膜(0.22 μm ，25 mm，Nylon，美國Titan公司)、液相層析管柱(ACQUITY UPLC BEH C18，2.1 $\times$ 10 cm，1.7 μm ，美國Waters公司)。

四、儀器設備

液相層析系統含自動進樣裝置、線上除氣裝置，四動相混和幫浦與10 μL 樣品圈(sample loop)(UPLC, Waters, USA)搭配串聯式質譜系統(TQD, Waters, USA)，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)氬氣(argon, 豐明氣體，台灣)。超純水系統(Advantage A10, Milli-pore Corp, Merck, USA)。

五、標準品儲備溶液之配製

分別取7種禁用色素對照用標準品50 mg，精確稱定，分別以50% 乙腈溶液溶解並定容至50 mL，作為標準原液(1000 $\mu\text{g/mL}$)，低溫4°C儲藏。

六、檢液之配製

精確稱取經均質之檢體1.0 g 於20 mL容量瓶，先加乙腈溶液 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。

七、高效液相層析串聯質譜條件

(一)液相層析儀

層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C18，2.1 $\times$ 100 mm，1.7 μm 移動相：A液5mM 甲酸銨水溶液；B液為乙腈，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：5 μL

(二)串聯質譜儀(離子源採電灑法離子化，偵測正/負離子)

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.0 kV

表一、梯度沖提(gradient)條件

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 3.0	0.3	90 $\rightarrow$ 50	90 $\rightarrow$ 50
3.0 $\rightarrow$ 4.0	0.3	50 $\rightarrow$ 50	50 $\rightarrow$ 50
4.0 $\rightarrow$ 5.0	0.3	50 $\rightarrow$ 10	50 $\rightarrow$ 90
5.0 $\rightarrow$ 7.0	0.3	10 $\rightarrow$ 10	90 $\rightarrow$ 90
7.0 $\rightarrow$ 7.5	0.3	10 $\rightarrow$ 90	90 $\rightarrow$ 10
7.5 $\rightarrow$ 10.0	0.3	90 $\rightarrow$ 90	10 $\rightarrow$ 10

離子源溫度(Ion source temperature):
150°C

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature):
350°C

偵測模式: 多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)

八、標準曲線(Standard curve)之製作

取7種禁用色素混和標準液其濃度為0.001-0.250 µg/mL, 進行LC/MS/MS分析, 以波峰面積對濃度作圖, 繪製成標準曲線。

九、重複性分析

(一)同日間(intraday):

配製3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3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。

十、添加回收試驗

取空白檢體約1.0 g, 分別加入Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12標準溶液, 稀釋後濃度為0.001-0.1 µg/mL重複分析3次, 求其濃度, 計算其回收率(Recovery)。

十一、基質效應之評估

參考蔡等人於2011年⁽⁸⁾及Chambers, S等人於2007年⁽⁹⁾所發表之方法, 分別比較其基質效應評估方法之差異性以下列方式建立檢量線:
(一)標準品之檢量線(standard calibration curve, SCC): 雌激素混合標準品配製濃度為0.001-0.1 µg/mL之標準溶液, (二)空白基質萃取後添加之檢量線(matrix matched calibration curve, MCC): 取空白沐浴類萃取液添加禁用色素混

合標準品使其最終濃度為0.001-0.1 µg/mL。

十二、定量極限之評估

取經均質後之空白檢體, 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其訊噪比(S/N ratio), 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

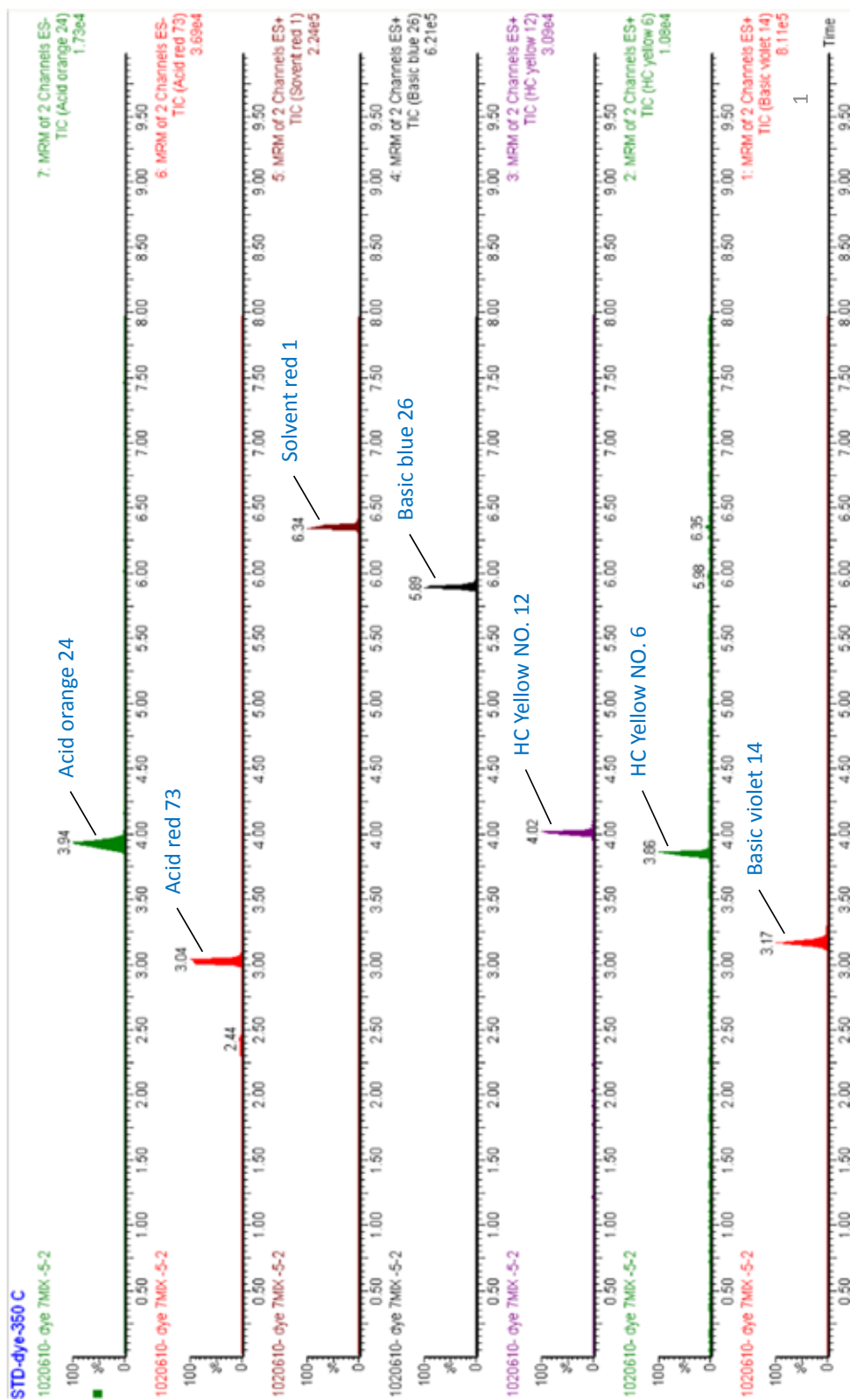
一、LC/MS/MS 最適分析條件

本研究使用ACQUITY UPLC BEH C18(I. D. 2.1 mm × 10 cm, 1.7 µm)管柱, 所用的移動相A為5 mM甲酸銨水溶液; 移動相B為Acetonitrile, 進行梯度沖提(gradient), 條件如表一, 流速為0.3 mL/min, 可於10分鐘內完成分析。圖二為Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12 7種禁用成分, 濃度0.2 ppm, 利用正/負離子電灑法多重反應偵測, 所得之總離子層析圖。7種禁用色素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, 以訊號較強之子離子做為定量離子。由結果得知本研究所開法之液相層析串聯質譜法可成功分離並偵測此7種分析物。

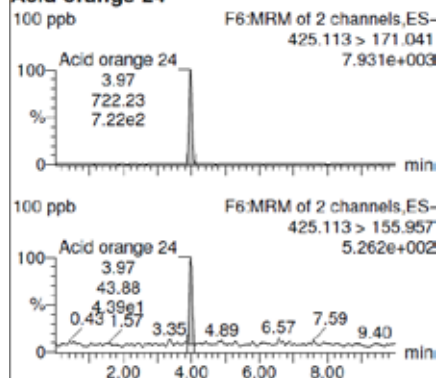
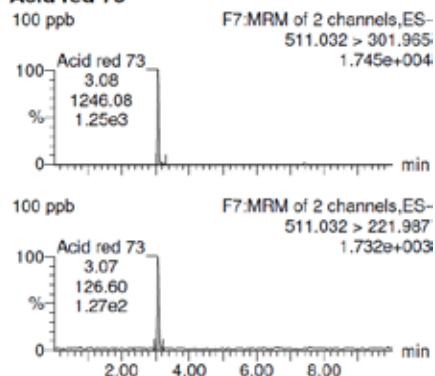
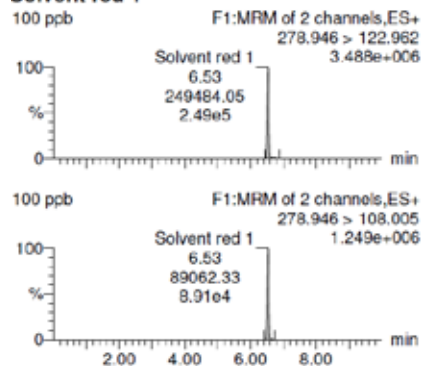
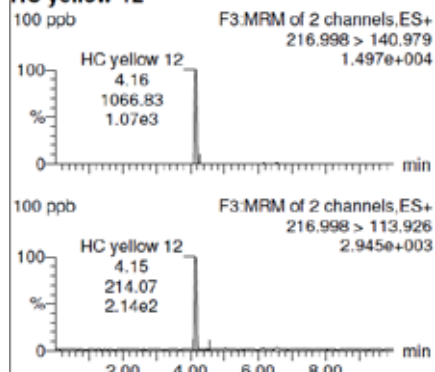
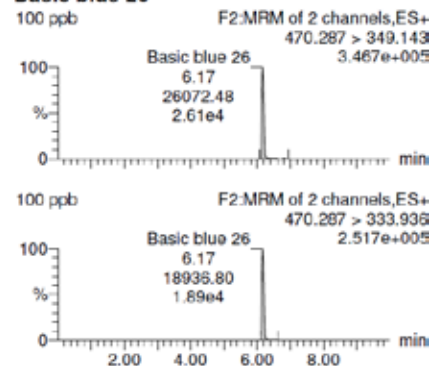
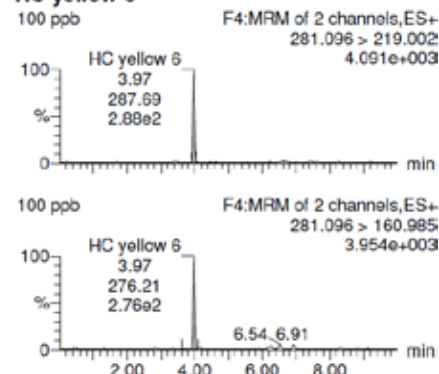
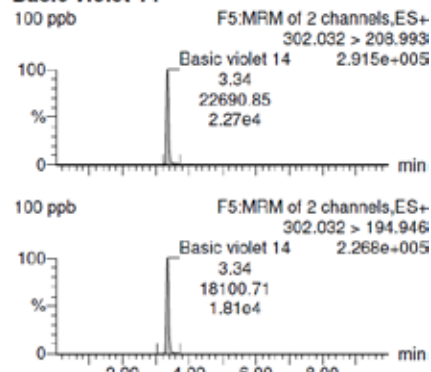
二、質譜最佳條件

7種禁用色素在負離子掃描模式下, 可得到Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)及Solvent red 1 (CI 12150)之去質子化分子(deprotonated molecule, [M-H]⁻), 分別為448、557及278 m/z; 而在正離子掃描模式下, 可得到Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12之質子分子(protonated molecule, [M+H]⁺), 分別為506、338、280及267 m/z。

利用液相層析串聯質譜法分析化粧品中之禁用色素



圖一、7種禁用色素成分之質譜總離子層析圖

Acid orange 24**Acid red 73****Solvent red 1****HC yellow 12****Basic blue 26****HC yellow 6****Basic violet 14**

圖二、7種禁用色素成分之多重反應偵測圖譜

本研究使用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，產生子代離子碎片，再由第三段四極桿(Q3)選擇特定離子進行偵測，最後以儀器自動化調整其參數，所得最佳化參數值如表二所示。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)及最佳碰撞能量。

三、標準曲線(Standard curve)結果

7種禁用色素成分混合標準品濃度在0.001-0.25 mg/mL 間所繪製之標準曲線公式，判定係數(R^2)皆在0.9989以上(表三)。

四、基質效應之評估

以LC/MS/MS進行定量，與分析物共同沖提出之基質干擾物(co-eluting matrix compound)會影響分析物於質譜儀之離子化情形，可能造成抑制或增強訊號，稱為基質效應(matrix

表二、多重反應監測 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 條件

分析物	離子化模式	離子對	進樣鉅電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Acid Orange 24	ESI ⁻	448 > 171 ^a	70	38
		448 > 156		30
Acid Red 73	ESI ⁻	511 > 302 ^a	40	22
		511 > 222		50
Solvent Red 1	ESI ⁻	279 > 123 ^a	26	16
		279 > 108		32
Basic Blue 26	ESI ⁺	470 > 349 ^a	12	40
		470 > 333		40
Basic Violet 14	ESI ⁺	302 > 195 ^a	66	36
		302 > 209		34
HC Yellow No.6	ESI ⁺	281 > 219 ^a	32	22
		281 > 161		30
HC Yellow No.12	ESI ⁺	217 > 141 ^a	26	14
		217 > 114		28

a. 定量離子

表三、7種禁用色素標準曲線公式

Compound	$y = ax + b$	R^2	Liner Range (mg/mL)
Acid Orange 24	$y = 5.7757x - 10.229$	0.9998	0.01 - 0.2
Acid Red 73	$y = 12.502x - 28.565$	0.9997	0.01 - 0.2
Solvent Red 1	$y = 2410.8x + 1096.3$	0.9999	0.001 - 0.02
Basic Blue 26	$y = 233.15x + 26.947$	0.9990	0.001 - 0.02
Basic Violet 14	$y = 224.82x + 3.9646$	0.9989	0.001 - 0.02
HC Yellow No.6	$y = 3.1923x + 9.2656$	0.9991	0.02 - 0.25
HC Yellow No.12	$y = 9.2074x - 52.513$	0.9997	0.01 - 0.2

表四、基質效應之評估

Compound	matrix effect	
	Slope ^a	Area ^a
Acid Orange 24	-8.58	-6.49
Acid Red 73	5.64	-4.67
Solvent Red 1	-16.52	-9.68
Basic Blue 26	-3.13	-5.66
Basic Violet 14	-9.37	-1.00
HC Yellow No.6	-4.47	2.12
HC Yellow No.12	10.83	3.61

a. n=3

effect)。為評估基質效應，分別製作標準曲線(standard curve)及基質匹配檢量線(matrix matched calibration curves)，並比較其斜率⁽⁸⁾。基質效應評估結果介於-16.52-10.83%(表四)。

$$\text{基質效應(\%)} = \frac{A \times B}{B} \times 100$$

A：基質為背景之線性迴歸曲線斜率。

B：溶劑為背景之線性迴歸曲線斜率。

同時另一篇文獻中基質效應評估方法⁽⁹⁾，為含基質之面積及未含基質之面積，計算其面積比值。基質效應評估結果介於-9.68-3.61%。

$$\text{基質效應(\%)} = \frac{A}{B} - 1 \times 100$$

A：基質為背景之面積

B：溶劑為背景之面積

五、添加回收試驗

經均質之空白檢體乳液中分別添加7種禁用色素混和標準液，使其濃度分別介於0.001-0.05 mg/g，所得之添加回收率如表五所示，其回收率(recovery)介於80.6-117.2%之間，變異係數(CV)介於1.0-9.7%之間，顯示所開發之分析方法具有良好之回收率。

六、定量極限之評估

本檢驗方法之定量極限分別為Solvent Red 1、Basic Blue 26及Basic Violet 14皆為0.02 ppm；Acid Orange 24、Acid Red 73及HC

表五、7種禁用色素之添加回收

Compounds	Spiked conc.	Recovery (%)	CV (%)
	(mg/g)	Mean ^a	
Acid Orange 24	0.01	105.9	4.74
	0.02	111.3	2.51
	0.05	104.1	7.97
Acid Red 73	0.01	100.0	4.59
	0.02	106.1	1.12
	0.05	107.3	2.65
Solvent Red 1	0.001	117.2	1.73
	0.05	85.1	1.87
	0.01	80.6	1.02
Basic Blue 26	0.001	98.4	1.28
	0.05	104.9	2.69
	0.01	101.6	1.28
Basic Violet 14	0.001	84.6	2.86
	0.05	97.1	1.89
	0.01	88.3	3.33
HC Yellow No.6	0.02	113.5	7.69
	0.05	104.7	5.69
	0.1	101.6	1.46
HC Yellow No.12	0.01	111.9	2.53
	0.02	107.7	2.99
	0.05	104.8	9.70

a. n=3

表六、7種禁用色素之定量極限評估結果

Compound	LOQ (mg/mL)
Acid Orange 24	0.2
Acid Red 73	0.2
Solvent Red 1	0.02
Basic Blue 26	0.02
Basic Violet 14	0.02
HC Yellow No.6	0.4
HC Yellow No.12	0.2

Yellow No.12皆為0.2 ppm；HC Yellow No.6 為0.4 ppm(表六)。

七、市售化粧品樣品分析

本研究利用LC/MS/MS方法於市售洗髮類7件及沐浴類產品3件共10件，其來源由衛生局進行稽查抽樣之樣品，其分析結果均未檢出本次所分析之7種禁用色素之成分。

結 論

本研究建立以液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)可同時分析化粧品中Acid orange 24 (CI 20170)、Acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、Basic blue 26 (CI 44045)、Basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6及HC yellow No.12 等7種禁用色素成分，並解決現行高效液相層析法，易有基質干擾及相似色素結構誤判之困擾。針對基質效應的評估方法，參考文獻分別以線性斜率及面積比值等方式進行試驗，結果顯示利用線性斜率評估的基質效應介於-16.52-10.83%；利用面積比值分析的基質效應介於-9.68-3.61%，利用線性斜率評估基質效應的數值偏大，惟二者評估結果皆無明顯基質效應。本研究透過串聯質譜儀之優勢，可準確鑑別，且因方法之流程簡短，回收率及再現性均佳，爾後可應用於例行性檢驗工作。

參考文獻

1. 李明陽。2002。化妝品化學。科學出版社，北京。
2. European Commission. 2002. The Safety Review of the Use of Certain Azo-Dyes in Cosmetic Products. SCCNFP/0495/01, final : 1-39.
3. 行政院衛生署。2010。化粧品衛生管理條例暨相關法規彙編。97.12.24日衛署藥字第097033068號公告增列。
4. 行政院衛生署。2009。化粧品中禁止使用成分總表。96.2.27衛署藥字第 0960302196號公告增列。
5. Commission of the European Communities. 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (2002/657/EC). Official Journal of the European Union. L221: 8-36.
6. 中華人民共和國衛生部中國國家標準管理委員會。2011。化妝品衛生安全通用要求。中國計量出版社。GB 7916-1987。
7. 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: 1-8.
8. 蔡佳芬、郭景豪、黃立宇、曾素香、蘇淑珠等。2011。高效液相層析串聯質譜法分析食品中之防腐劑。食品藥物研究年報，2: 97-106。
9. 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.

Determination of Banned Dyes in Cosmetics by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SHIN-HAO CHEN, SHOU-CHIEH HUANG, YU-PEN CHEN,
LIH-CHING CHIUEH AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

In this study, we used liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) to setup a specific and rapid method for banned dyes determination and quantification in cosmetics. The banned dyes are acid orange 24 (CI 20170)、acid red 73 (CI 27290)、Solvent red 1 (CI 12150)、basic blue 26 (CI 44045)、basic violet 14 (CI 42510)、HC yellow No.6、HC yellow No.12. The samples were dissolved in 50% Acetonitrile and were analyzed. We used a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (I.D. 2.1mm × 10 cm, 1.7 μm) column with 5mM ammonium formate solution and acetonitrile as eluent under gradient program. The concentration range of the 7 standards was 0.001-0.250 μg/mL with an r^2 value greater than 0.9989. The average recoveries of spiked samples were 80.6-117.2%, and the relative standard deviations of average recoveries were less than 9.7%. The cosmetic products bought from market were analyzed using this method and no banned dyes were detected.

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