

染髮劑中芳胺成分檢驗方法建立

陳信豪 黃秋羽 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法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)建立一簡單、快速的方法能分析染髮劑中29項芳胺成分。檢體以含0.1%氫水之甲醇溶液萃取，經超音波振盪30分鐘後定容，經濾膜過濾後進行定性及定量分析。分析條件採用ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 2.1 mm x 50 mm)層析管柱，移動相為含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液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分鐘內完成分析。於市售染髮劑空白基質中添加標準溶液(依各成分之分析範圍添加濃度介於0.02-400 μ g/g)，進行連續3日5重複之回收試驗，其平均回收率為88.4-116.3%，變異係數均小於9.7%，基質之離子增強或抑制效應皆小於9.49%。本檢驗方法可應用於上市後染髮劑產品之監測，以確保消費者之健康安全。

關鍵詞：液相層析串聯質譜法、染髮劑、芳胺成分

前 言

頭髮是吸引力、氣質、健康及美麗的展現，隨著社會的進步，越來越多人注重外表及美容，而利用天然成分或人工化合物來達到改變髮色及覆蓋白髮之目的，染髮已成為時尚流行趨勢，全球染髮行業亦快速成長，市場規模已超過70億美元⁽¹⁾。

芳香胺/芳胺(aromatic amines)是生物活性化合物(biologically active compounds)，廣泛使用於氧化性(永久性)染髮劑中，主要作為染髮中間體(intermediates)及偶合劑(couplers)。氧化性染髮劑所含芳香胺在日常使用過程中會經皮膚吸收，可能具有毒性、體外致突變性及實驗動物致癌性⁽²⁾。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) No1223/2009)附錄III⁽³⁾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⁽⁴⁾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，其中便不乏芳胺成分物質。本研究中之29項芳胺成分，分別列屬國際癌症研究機構(International Agency for Research on Cancer, IARC)致癌性分類之第1、2A、2B及3類致癌物質⁽⁵⁾，為對人類明確、可能、很可能或尚無法確定造成致癌之風險物質，而我國亦訂定「化粧品禁止使用成分表」及「特定用途化粧品成分名稱及使用限制表」，依物質之安全風險高低，分別施予禁止使用或限於特定用途下限量使用之管理規範如表一所示⁽⁶⁾。

表一、29項芳胺成分之法規及國際癌症研究機構致癌性分類(IARC)及我國管理規範

編號	品項名稱	IARC致癌性分類	管理規範
1	4,4'-Methylenedianiline	2B	禁用
2	3,3'-Dichlorobenzidine	2B	禁用
3	<i>o</i> -Dianisidine	2B	禁用
4	<i>o</i> -Tolidine	2B	禁用
5	4,4'-Methylenebis(2-methylaniline)	2B	禁用
6	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	1	禁用
7	4,4'-Oxydianiline	2B	禁用
8	4,4'-Thiodianiline	2B	禁用
9	4-Aminobiphenyl	1	禁用
10	Benzidine	1	禁用
11	<i>o</i> -Aminoazotoluene	2B	禁用
12	4-Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	2B	禁用
13	2-Methoxy-5-methylaniline	2B	禁用
14	<i>o</i> -Toluidine	2A	禁用
15	2,4-Diaminotoluene	2B	禁用
16	2,4,5-Trimethylaniline	2B	禁用
17	<i>o</i> -Anisidine	2B	禁用
18	4-Aminoazobenzene	2B	禁用
19	1-Naphthylamine	3	禁用
20	2-Naphthylamine	1	禁用
21	4-Chloro-2-methylaniline	2A	禁用
22	4-Chloroaniline	2B	禁用
23	2-Methyl-5-nitroaniline	3	禁用
24	1,5-Naphthalenediol	3	限用
25	2,7-Naphthalenediol	2B	限用
26	1,7-Naphthalenediol	3	禁用
27	2,3-Naphthalenediol	3	禁用
28	1-Naphthol	3	限用
29	2-Naphthol	3	無

染髮劑之檢驗，傳統以高效液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)搭配光極體陣列檢出器(photodiode array, PDA)為經常使用的方法，其主要利用化合物之滯留

時間及吸收圖譜比較鑑別之，惟染髮產品色系繁多，產品往往添加5-10種染髮劑成分，常會有共析出(co-elute)之問題，造成吸收圖譜干擾。由於本研究所探討之29種芳胺成分中有許多同分異構物結構，如1-Naphthylamine及2-Naphthylamine；1,5-Naphthalenediol、2,7-Naphthalenediol、1,7-Naphthalenediol及2,3-Naphthalenediol；1-Naphthol及2-Naphthol等，這些同分異構物因具有相同質荷比而無法分辨，須利用層析將其分離再進行鑑別，而利用液相層析串聯質譜法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, 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相對離子強度比(ion ratio)等資訊作為定性上之依據，以減少鑑別上之誤判⁽⁷⁻¹¹⁾。

本研究擬利用液相層析串聯質譜法建立可同時分析29項芳胺成分之檢驗方法，以作為上市產品品質監測之方法依據，確保消費者產品使用安全。

材料與方法

一、檢體來源：

本研究檢體來源係於化粧品販售處所購買之染髮劑產品。

二、標準品、試藥及器材

4,4'-Thiodianiline、Benzidine、*o*-Aminoazotoluene、4-Methoxy-*m*-phenylenediamine、2-Methoxy-5-methylaniline、*o*-Toluidine、2,4,5-Trimethylaniline (100 µg/mL in ACN)、*o*-Anisidine、4-Aminoazobenzene、4-Chloro-2-methylaniline、2,7-Naphthalenediol、1,7-Naphthalenediol及2,3-Naphthalenediol等對照用標準品皆購自Sigma-Aldrich公司 (St. Louis, MO, USA)；4,4'-Methylenedianiline、

3,3'-Dichlorobenzidine (100 µg/mL in toluene)、*o*-Dianisidine、*o*-Tolidine (100 µg/mL in toluene)、4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (5.0 mg/mL in MeOH)、4,4'-Oxydianiline (1000 µg/mL in ACN)、4-Aminobiphenyl、2,4-Diaminotoluene、1-Naphthylamine、2-Naphthylamine及1-Naphthol等對照用標準品皆購自AccuStandard公司(New Haven, CT, USA)；2-Methyl-5-nitroaniline、1,5-Naphthalenediol及2-Naphthol等對照用標準品皆購自Chem Service, Inc. (West Chester, PA, USA)；4,4'-Methylenebis(2-methylaniline)對照用標準品購自Toronto Research Chemicals公司(North York, CA)；4-Chloroaniline對照用標準品購自Supelco公司(Bellefonte, PA, USA)。醋酸鉍(Ammonium acetate)採用試藥特級，購自Sigma-Aldrich公司；氨水(Ammonium hydroxide, 25%)；甲醇(Methanol)及乙腈(Acetonitrile)，均採用高效液相層析級，皆購自Merck公司(Darmstadt, Germany)。針筒式濾頭(Syringe filter)採用PTFE材質，直徑為13 mm，孔徑為0.22 µm，購自Waters公司(Milford, MA, USA)。

三、儀器與裝置

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

四、方法

(一)含0.1%氨水之甲醇溶液之調製

取氨水(25%) 2 mL，以甲醇定容至500 mL，供作萃取溶液。

(二)含0.05%甲酸水溶液之調製

取甲酸0.5 mL，以去離子水定容至1000 mL。

(三)移動相溶液A之調製

稱取醋酸鉍0.385 g，以含0.05%甲酸水溶液溶解並定容至1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相。

(四)移動相溶液B：乙腈

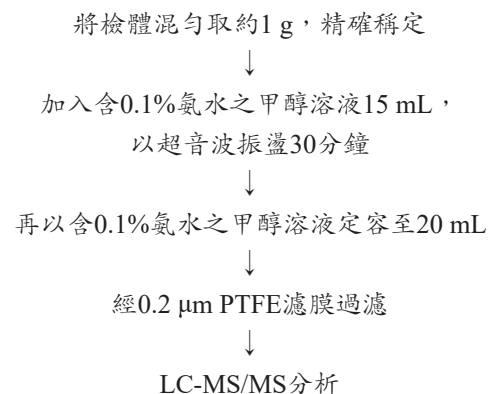
(五)標準溶液之配製

取4,4'-Thiodianiline等對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以含0.1%氨水之甲醇溶液溶解並定容至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，以含0.1%氨水之甲醇溶液稀釋，供作標準溶液。

(六)檢液之調製

將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，加入含0.1%氨水之甲醇溶液15 mL，以超音波振盪30分鐘，再以含0.1%氨水之甲醇溶液定容至20 mL，經濾膜過濾，供作檢液，如圖一所示。

(七)鑑別試驗及含量測定



圖一、染髮劑中29項芳胺成分之分析流程圖

精確量取檢液及標準溶液各2 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芳胺成分之含量($\mu\text{g/g}$)：

$$\text{檢體中芳胺成分之含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各芳胺成分之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積(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($\leq 100\%$)，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

(八)LC-MS/MS測定條件

層析管柱為ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μm ，2.1 mm $\times$ 50 mm)，移動相為含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液與乙腈溶液進行梯度沖提(表二)，流速為0.5 mL/min；注入量為2.0 μL ；管柱溫度為30 $^{\circ}\text{C}$ 。質譜儀參數設定，以電灑離子法(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) 2.50 kV，離子源(ion source)溫度為150 $^{\circ}\text{C}$ ，溶媒揮散溫度(desolvation temperature)為500 $^{\circ}\text{C}$ ，溶媒揮散流速(desolvation flow)為800 L/Hr，碰撞氣體(collision gas)為氬氣。

(九)添加回收試驗

取市售染髮劑為空白基質，於基質中添加適量之標準溶液使其最終濃度為0.02-400 $\mu\text{g/g}$ ，濃度範圍依檢測品項之感度選定添加濃度，依前述(六)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。

(十)統計分析

平均值、標準偏差及變異係數運用Microsoft Excel 2019軟體進行計算。29項芳胺成分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。

(十一)方法定量極限之評估

取均質後之空白基質1 g，加入適量29項芳胺成分標準溶液，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。

(十二)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)：同標準溶液之配製，使其最終濃度為0.001-100 $\mu\text{g/mL}$ 。
2. 基質匹配檢量線(Matrix calibration curve, MCC)：取空白基質添加標準溶液，使其最終濃度為0.001-100 $\mu\text{g/mL}$ 。
3. 基質效應計算公式如下：

$$\text{基質效應}(\%) = (\text{MCC之斜率} - \text{SCC之斜率}) / \text{SCC之斜率} \times 100\%$$

表二、移動相梯度沖提條件

Time (min)	含0.05%甲酸之5mM 醋酸銨溶液(%)	乙腈(%)
0 $\rightarrow$ 4	98 $\rightarrow$ 80	2 $\rightarrow$ 20
4 $\rightarrow$ 8	80 $\rightarrow$ 70	20 $\rightarrow$ 30
8 $\rightarrow$ 10	70 $\rightarrow$ 3	30 $\rightarrow$ 97
10 $\rightarrow$ 12	3 $\rightarrow$ 3	97 $\rightarrow$ 97
12 $\rightarrow$ 12.5	3 $\rightarrow$ 98	97 $\rightarrow$ 2
12.5 $\rightarrow$ 15	98 $\rightarrow$ 98	2 $\rightarrow$ 2

斜率) / SCC之斜率 $\times 100$

結果與討論

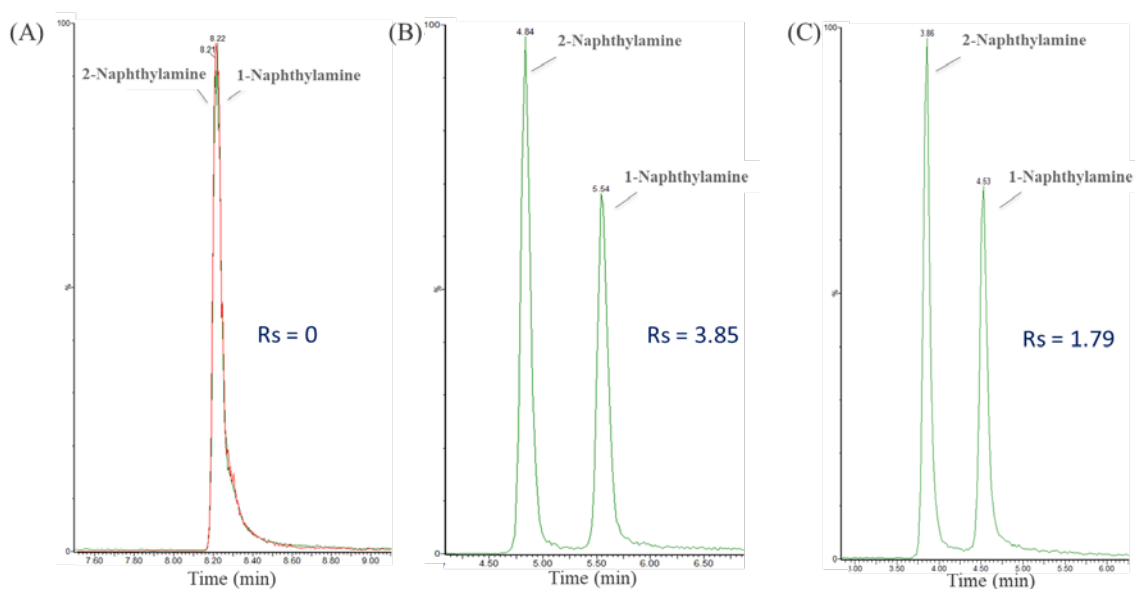
一、分析條件最適化探討

本研究在層析管柱最適化之測試，選用了ZORBAX Eclipse XDB-C18層析管柱進行分析時，分離效果最好，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較好的滯留性與波峰。萃取溶液採用含0.1%氨水之甲醇溶液主要因為Benzidine、4,4'-Oxydianiline及4,4'-Methylenedianiline等3項分析物pKa分別為4.73、6.08及4.88之極性化合物，容易受到移動相pH值的影響，利用含0.1%氨水之甲醇溶液可以調整檢液pH值遠離化合物本身pKa，提高峰型的對稱性。在移動相最適化之測試，分別配製5 mM醋酸銨溶液、含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液及含0.1%甲酸之5 mM醋酸銨溶液，搭配乙腈作為移動相，進行相

同梯度條件之沖提，並以1-Naphthylamine及2-Naphthylamine之同分異構物進行測試，結果以含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液搭配乙腈之移動相組成，其解析度為最好，可達3.85，如圖二所示。透過上述層析條件探討，選定含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液及乙腈作為移動相，進行梯度沖提，可於15分鐘完成29項芳胺成分之分析。

二、液相層析串聯質譜儀參數

本研究利用LC-MS/MS進行分析，利用電灑游離法(electrospray ionization, ESI)之離子化方式，針對質譜之質量解析度及感度進行最佳化參數之調整，以三段式四極桿MRM模式進行分析，先於第一個四極桿(Q1)選擇一特定前驅離子，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，經氬氣碰撞後產生訊號最強的產物離子為定



圖二、1-Naphthylamine及2-Naphthylamine分別以5 mM醋酸銨溶液 (A)、含0.05%甲酸之5 mM醋酸銨溶液 (B)及含0.1%甲酸之5 mM醋酸銨溶液(C)移動相A分析之MRM層析圖

量離子(quantitative ion)，訊號次之為定性離子(qualitative ion)，各化合物之MRM偵測參數如表三所示。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29項芳胺類成分波峰分離，層析圖譜於如圖三。

三、標準曲線之測試

29項芳胺成分混合標準溶液，針對個別成分進行感度測試，設定適當之標準曲線濃度範圍，標準曲線迴歸方程式之判定係數(r^2)皆在0.995以上。

四、基質效應之評估

染髮劑中基質複雜，產品中所含基質可能

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，以標準曲線斜率及基質匹配檢量線斜率評估基質效應，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⁽¹²⁾。經評估結果顯示29項芳胺成分之基質效應皆小於9.49% 如表四所示，故本研究採用標準曲線進行定量。

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29項芳胺成分標準品，其濃度範圍介於0.02-400 $\mu\text{g/g}$ 之間，所得共15重複之平均回

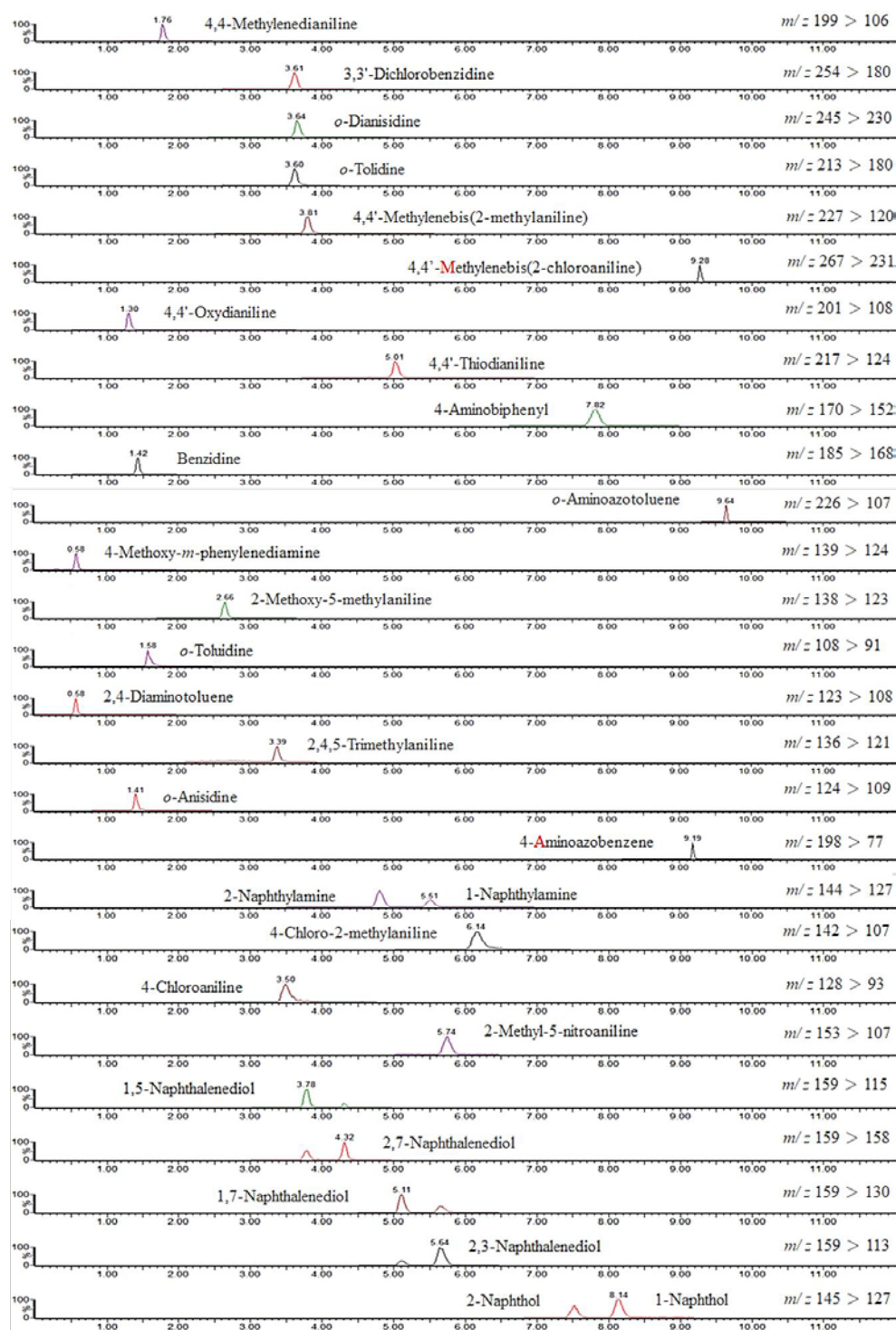
表三、29項芳胺成分之MRM偵測參數

分析物	離子化模式	離子對	進樣鉗電壓(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	36	22
		199 > 77		52
3,3'-Dichlorobenzidine	ESI ⁺	254 > 180 ^a	2	42
		254 > 198		24
<i>o</i> -Dianisidine	ESI ⁺	245 > 230 ^a	18	14
		245 > 187		28
<i>o</i> -Tolidine	ESI ⁺	213 > 180 ^a	30	30
		213 > 152		52
4,4'-Methylenebis(2-methylaniline)	ESI ⁺	227 > 120 ^a	26	24
		227 > 178		22
4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	ESI ⁺	267 > 231 ^a	26	20
		267 > 140		26
4,4'-Oxydianiline	ESI ⁺	201 > 108 ^a	32	22
		201 > 80		30
4,4'-Thiodianiline	ESI ⁺	217 > 124 ^a	20	32
		217 > 139		18
4-Aminobiphenyl	ESI ⁺	170 > 152 ^a	30	26
		170 > 127		32
Benzidine	ESI ⁺	185 > 168 ^a	54	18
		185 > 151		26

表三、29項芳胺成分之MRM偵測參數(續)

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)		
<i>o</i> -Aminoazotoluene	ESI ⁺	226 > 107 ^a	16	12
		226 > 91		16
4-Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	ESI ⁺	139 > 124 ^a	14	8
		139 > 107		12
2-Methoxy-5-methylaniline	ESI ⁺	138 > 123 ^a	32	14
		138 > 106		22
<i>o</i> -Toluidine	ESI ⁺	108 > 91 ^a	16	16
		108 > 65		24
2,4-Diaminotoluene	ESI ⁺	123 > 108 ^a	30	16
		123 > 79		20
2,4,5-Trimethylaniline	ESI ⁺	136 > 121 ^a	30	14
		136 > 91		22
<i>o</i> -Anisidine	ESI ⁺	124 > 109 ^a	30	14
		124 > 65		22
4-Aminoazobenzene	ESI ⁺	198 > 77 ^a	26	20
		198 > 104		14
1-Naphthylamine	ESI ⁺	144 > 127 ^a	24	22
		144 > 77		34
2-Naphthylamine	ESI ⁺	144 > 127 ^a	24	22
		144 > 77		34
4-Chloro-2-methylaniline	ESI ⁺	142 > 107 ^a	30	8
		142 > 125		26
4-Chloroaniline	ESI ⁺	128 > 93 ^a	32	22
		128 > 111		18
2-Methyl-5-nitroaniline	ESI ⁺	153 > 107 ^a	28	14
		153 > 90		18
1,5-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 115 ^a	30	30
		159 > 131		25
2,7-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 158 ^a	30	10
		159 > 130		15
1,7-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 130 ^a	30	18
		159 > 103		22
2,3-Naphthalenediol	ESI ⁻	159 > 113 ^a	18	32
		159 > 130		18
1-Naphthol	ESI ⁺	145 > 127 ^a	50	12
		145 > 91		25
2-Naphthol	ESI ⁺	145 > 127 ^a	50	12
		145 > 115		16

^a 定量離子對



圖三、29項芳胺成分標準品之MRM層析圖

表四、29項芳胺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	0.001-0.02	$y = 3261.6x - 484.65$	$y = 3266.2x - 394.79$	0.14
3,3'-Dichlorobenzidine	0.001-0.02	$y = 525.37x - 79.332$	$y = 479.45x - 19.635$	-8.74
<i>o</i> -Dianisidine	0.001-0.02	$y = 1325.4x - 1017.2$	$y = 1369.4x - 316.95$	3.32
<i>o</i> -Tolidine	0.001-0.02	$y = 798.43x - 26.331$	$y = 793.1x + 131.75$	-0.67
4,4'-Methylenebis(2-methylaniline)	0.001-0.02	$y = 5239.9x + 638.82$	$y = 5543x - 1177$	5.78
4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	0.001-0.02	$y = 2319.5x - 543.2$	$y = 2539.6x - 1230.9$	9.49
4,4'-Oxydianiline	0.001-0.02	$y = 2743.4x - 61.781$	$y = 2829x - 184.9$	3.12
4,4'-Thiodianiline	0.001-0.02	$y = 1972.8x + 171.43$	$y = 2083x + 159.38$	5.59
4-Aminobiphenyl	0.01-0.2	$y = 373271x - 265.84$	$y = 379965x - 475.98$	1.79
Benzidine	0.01-0.2	$y = 404851x + 425.87$	$y = 432832x - 2465.9$	6.91
<i>o</i> -Aminoazotoluene	0.01-0.2	$y = 2524.3x + 5289.6$	$y = 2446.1x + 5946.2$	-3.10
4-Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	0.01-0.2	$y = 243068x + 155.53$	$y = 226624x + 354.58$	-6.77
2-Methoxy-5-methylaniline	0.01-0.2	$y = 312204x - 341.15$	$y = 310901x - 13.298$	-0.42
<i>o</i> -Toluidine	0.01-0.2	$y = 129557x - 42.39$	$y = 130923x - 76.434$	1.05
2,4-Diaminotoluene	0.01-0.2	$y = 514982x + 252.33$	$y = 542340x - 606.26$	5.31
2,4,5-Trimethylaniline	0.01-0.2	$y = 316124x + 269.02$	$y = 317748x + 59.39$	0.51
<i>o</i> -Anisidine	0.01-0.2	$y = 179863x + 681.98$	$y = 180115x + 781.68$	0.14
4-Aminoazobenzene	0.01-0.2	$y = 2156.1x - 460.89$	$y = 2156.4x + 344.2$	0.01
1-Naphthylamine	0.01-0.2	$y = 76697x + 48.338$	$y = 76806x + 22.283$	0.14
2-Naphthylamine	0.01-0.2	$y = 158943x + 208.42$	$y = 158805x + 124.16$	-0.09
4-Chloro-2-methylaniline	0.1-2	$y = 9652.7x - 13.796$	$y = 9924.6x - 77.991$	2.82
4-Chloroaniline	0.1-2	$y = 4276.6x + 12.064$	$y = 4436.3x - 20.904$	3.73
2-Methyl-5-nitroaniline	1-10	$y = 7051.4x + 765.59$	$y = 7016.1x + 1020.7$	-0.50
1,5-Naphthalenediol	1-10	$y = 246.22x + 113.62$	$y = 228.59x + 135.06$	-7.16
2,7-Naphthalenediol	1-10	$y = 207.02x - 15.158$	$y = 206.64x - 59.354$	-0.18
1,7-Naphthalenediol	1-10	$y = 2309.2x + 256.57$	$y = 2249.4x + 450.49$	-2.59
2,3-Naphthalenediol	1-10	$y = 1124.4x + 682.7$	$y = 1068.9x + 1361.5$	-4.94
1-Naphthol	5-100	$y = 38.208x - 3.9115$	$y = 38.692x - 15.146$	1.27
2-Naphthol	5-100	$y = 129.69x + 187.01$	$y = 126.65x + 371.86$	-2.34

收率介於88.4-116.3%，變異係數(coefficient of variation, CV)皆小於9.7%，如表五所示。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

本研究所建立芳胺成分之檢驗方法，各分析物在儀器感度不同，經測試之定量極限分別為0.02、0.2、2、20及100 $\mu\text{g/g}$ ，如表五所示。

表五、29項芳胺成分添加於空白染髮劑之平均回收率、變異係數及定量極限

分析物	Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)	CV (%)	定量極限 (µg/g)
4,4'-Methylenedianiline	0.02	103.9	5.6	0.02
	0.1	101.7	2.1	
3,3'-Dichlorobenzidine	0.02	94.1	9.0	0.02
	0.1	107.7	5.5	
<i>o</i> -Dianisidine	0.02	98.5	6.1	0.02
	0.1	101.9	5.0	
<i>o</i> -Tolidine	0.02	105.1	9.5	0.02
	0.1	102.9	5.8	
4,4'-Methylenebis(2-methylaniline)	0.02	98.0	6.6	0.02
	0.1	92.6	7.4	
4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	0.02	106.1	8.7	0.02
	0.1	99.8	2.3	
4,4'-Oxydianiline	0.02	104.1	4.6	0.02
	0.1	101.7	1.2	
4,4'-Thiodianiline	0.02	99.4	6.9	0.02
	0.1	98.1	3.2	
4-Aminobiphenyl	0.2	95.1	8.0	0.02
	1	100.9	2.9	
Benzidine	0.2	97.0	4.9	0.02
	1	96.1	1.6	
<i>o</i> -Aminoazotoluene	0.2	96.2	9.7	0.2
	1	101.8	3.7	
4-Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	0.2	90.3	3.2	0.2
	1	91.6	6.5	
2-Methoxy-5-methylaniline	0.2	106.2	6.6	0.2
	1	103.0	3.2	
<i>o</i> -Toluidine	0.2	104.3	3.8	0.2
	1	103.2	2.9	
2,4-Diaminotoluene	0.2	92.9	5.8	0.2
	1	92.2	5.8	
2,4,5-Trimethylaniline	0.2	92.2	2.0	0.2
	1	100.3	1.3	
<i>o</i> -Anisidine	0.2	96.3	3.7	0.2
	1	102.3	1.7	
4-Aminoazobenzene	0.2	108.9	3.7	0.2
	1	104.3	2.8	

表五、29項芳胺成分添加於空白染髮劑之平均回收率、變異係數及定量極限(續)

分析物	Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)	CV (%)	定量極限 (µg/g)
1-Naphthylamine	0.2	96.3	3.7	0.2
	1	102.3	1.7	
2-Naphthylamine	0.2	97.0	9.6	0.2
	1	101.4	2.3	
4-Chloro-2-methylaniline	2	101.8	3.7	2
	10	100.7	0.6	
4-Chloroaniline	2	99.0	2.4	2
	10	100.2	1.1	
2-Methyl-5-nitroaniline	20	94.3	7.3	20
	100	99.7	1.6	
1,5-Naphthalenediol	20	92.7	5.0	20
	100	107.1	1.4	
2,7-Naphthalenediol	20	101.6	1.4	20
	100	98.0	1.3	
1,7-Naphthalenediol	20	88.4	2.6	20
	100	100.5	1.2	
2,3-Naphthalenediol	20	110.8	3.2	20
	100	116.3	1.6	
1-Naphthol	100	92.8	4.3	100
	400	96.6	3.5	
2-Naphthol	100	94.9	4.3	100
	400	102.4	3.0	

^a n = 15.

結 論

本研究染髮劑中29項芳胺成分檢驗方法已成功將1-Naphthylamine/2-Naphthylamine、1,5-Naphthalenediol/2,7-Naphthalenediol/1,7-Naphthalenediol/2,3-Naphthalenediol及1-Naphthol/2-Naphthol等3組同分異構物利用層析條件進行分離並符合確效要求之分離度，針對市售染髮劑產品標示成分、無標示成分及禁用成分之染髮劑產品可進行高通量快篩分析，有效降低分析時間及基質干擾所造成誤判。本

研究方法已完成確效，其回收率及重複性良好，可應用於染髮劑中芳胺成分之例行性檢驗。建立之檢驗方法將公開於本署網站，提供地方衛生局及檢驗單位使用，可提升國內產業水準，增加國際競爭力並監測上市化粧品之品質，保護國人健康。

參考文獻

1. Kim, K., Kabir, E. and Jahan, S.A. 2016. The use of personal hair dye and its implications

- for human health. *Environ. Int.* 89-90: 222-227.
2. Akyuz, M. and. Ata, S. 2007. Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47: 68-80.
 3. 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 the restrictions laid down. [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20III_v2.pdf].
 4. 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/toolsdatabases/cosing/pdf/COSING_Annex%20II_v2.pdf].
 5. Trakoli, A. 2012. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans. Volume 99: some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. International Agency for Research on Cancer, Oxford University.
 6. 衛生福利部。2019。化粧品禁止使用成分表。108.05.30衛授食字第1081601760號公告。
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 施念昊、許得美、徐慈鴻、初建。2019。利用氣相層析串聯質譜法及超高效液相層析串聯質譜法同時檢測土壤中352種農藥殘留。臺灣農藥科學，6: 1-36。

Establishment of an Analytical Method for Aromatic Amines in Hair Dyes

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

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

A simple and rapid method was developed for simultaneous determination of 29 aromatic amines in hair dyes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample was uniformly dispersed with methanol containing 0.1% ammonia water and then extracted by ultrasonication for 30 min. After centrifugation and filtration, the filtrate was separated on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 2.1 mm x 50 mm) column by gradient elution of 5 mM ammonium acetate containing 0.05% formic acid and acetonitrile. The analysis can be accomplished within 15 min. by employing electrospray ionization (ESI) with multiple reaction monitoring (MRM) mode for detection. The average recoveries of 29 compounds ranged from 88.4-116.3%, and the coefficients of variation were all lower than 9.7%, when spiking multiple concentration levels of standards ranged from 0.02-400 μ g/g in hair dye samples. The matrix effects for ion enhancement or inhibition were lower than 9.49%. This method can be applied to the monitoring of post-marketing products and safeguard the health and safety of the consumers.

Key words: LC-MS/MS, hair dyes, aromatic amines