

## 化粧品中染髮劑成分檢驗方法之建立

張瓊文 陳信豪 黃秋羽 鄧書芳 黃守潔 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

本研究以液相層析串聯質譜法(Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)建立化粧品中5項染髮劑成分之定量檢驗方法，利用電灑游離法(Electrospray Ionization, ESI)搭配多重反應偵測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)，並以Cortecs UPLC C18<sup>+</sup> (1.6  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm)作為層析管柱，檢測化粧品中2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol、HC violet No.2、Hydroxybenzomorpholine、4-Nitrophenyl aminoethylurea及6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride等5項成分。研究中以含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液萃取檢體，再經LC-MS/MS分析，以pH 3.5之10 mM甲酸銨水溶液及甲醇：乙腈(1：1, v/v)溶液作為移動相，進行梯度沖提，層析時間為15分鐘，即可獲得良好分析結果。另以市售染髮產品作為基質進行方法確效，結果顯示基質添加標準品均無干擾，具良好專一性。HC violet No.2、Hydroxybenzomorpholine及4-Nitrophenyl aminoethylurea之定量極限為2  $\mu$ g/g，2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol及6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride之定量極限則為4  $\mu$ g/g，前述5項成分之檢量線相關係數(Correlation coefficient, r)均可達0.9968以上，平均回收率介於82.2-102.7%，變異係數均小於13.5%，顯示方法具有良好之準確度及精密性。以14件市售染髮產品進行評估，結果顯示本方法可適用相關產品檢驗。未來將公開本研究之檢驗方法，供各界參考使用。

**關鍵詞：**化粧品、染髮劑、液相層析串聯質譜法

### 前言

隨著時尚流行趨勢與老齡人口漸增等影響，民眾使用染髮產品作為修飾容貌、追求多變及美觀的情形更為頻繁，且年齡層分布漸廣。染髮劑的種類包括氧化性及非氧化性，另依染髮劑作用機制及持久性大致可分為3類，分別為暫時性(temporary，約可清洗8-12次)、半永久性(semipermanent，約可清洗24次)及永久性(permanent，直到長出新髮)<sup>(1)</sup>。其中暫時

性及半永久性染髮劑主要為非氧化性染髮劑，而永久性染髮劑則為氧化性染髮劑。我國染髮產品管理方式原須辦理上市前查驗登記，經核准並發給許可證後，始得製造或輸入。惟自113年7月1日起化粧品管理方式變革，廢除上市前查驗登記制度，而原列載於「特定用途化粧品成分名稱及使用限制表」<sup>(2)</sup>中染髮劑成分，已移入「化粧品成分使用限制表」<sup>(3)</sup>中，並以產品類型為「染髮產品」進行規範，且依氧化性及非氧化性類型分別訂定限量。本研究

表一、5項染髮劑成分之基本資訊及其限量標準

項次	INCI名	CAS No.	產品類型/ 使用範圍	限量標準 <sup>(3)</sup>	分子量 (g/mol)
1	2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol	131657-78-8	(a)氧化性染髮產品 (b)非氧化性染髮產品	(a) 1.5% (b) 3%	216.62
2	HC violet No.2	104226-19-9	非氧化性染髮產品	2%	299.32
3	Hydroxybenzomorpholine	26021-57-8	氧化性染髮產品	1%	151.16
4	4-Nitrophenyl aminoethylurea	27080-42-8	(a)氧化性染髮產品 (b)非氧化性染髮產品	(a) 0.25% (b) 0.5%	224.22
5	6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride	90817-34-8/ 83732-72-3 <sup>a</sup>	(a)氧化性染髮產品 (b)非氧化性染髮產品	(a) 0.68% (以free base計) 1% (以dihydrochloride計) (b) 0.68% (以free base計) 1% (以dihydrochloride計)	226.10

<sup>a</sup>本研究使用之標準品

以衛生福利部食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)尚未建立檢驗方法之品項，並考量標準品是否可取得及儀器分析之適用性等因素，選擇其中5項成分作為研究標的，包括2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol、HC violet No.2、Hydroxybenzomorpholine、4-Nitrophenyl aminoethylurea及6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride等5項成分(表一)。

各國對於染髮產品之管理方式略有不同，日本將染髮劑分為兩類管理，分別為「染毛劑」以醫藥部外品管理，並訂有「染毛劑製造販賣承認基準について」<sup>(4)</sup>；另一類則為「染毛料」，以化粧品列管，並訂有「日本化粧品基準」<sup>(5)</sup>管理。加拿大對化粧品管理方式依據Food and Drugs Act (FDA) 及 Cosmetic Regulations (CR)，並訂有「Cosmetic Ingredient Hotlist: Prohibited and Restricted Ingredients」<sup>(6)</sup>。整體上各國均宣導依符合法規產品之使用說明操作是安全的，但為避免個體差異等導致的過敏現象，均建議於使用前進行斑貼測試(patch test)。而我國與歐盟<sup>(7)</sup>的管理方式相同，均依產品類型訂有限量規定，並載列於「化粧品成分使用限制表」中，依作用方式區分氧化性及非氧化性染髮產品並分別訂定限量標準，而本

次研究5項染髮成分之限量，我國與歐盟均相同。

在分析方法及儀器部分，早期染髮劑的分析方法多以高效液相層析法搭配光二極體陣列檢測器(High-Performance Liquid Chromatography coupled to a Diode Array Detector, HPLC-DAD)的分析方法為主<sup>(8)</sup>，但在檢測不同染髮產品基質時，可能因染髮產品劑型或添加多種染髮劑成分等因素，造成吸收圖譜干擾或層析峰難以分離，為解決此問題，近年來多以選擇性與靈敏度較佳的液相層析串聯質譜法(Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析<sup>(9)</sup>，降低干擾並減少誤判情形。本研究採用LC-MS/MS搭配電灑游離法建立化粧品中5項染髮劑成分之檢驗方法，並以市售染髮產品評估方法之適用性。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

本研究檢體係自大賣場、藥粧店、美容美髮材料行及網路價購之染髮產品。

### 二、化學試藥及器材

(一)標準品：2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol、HC violet No.2及4-Nitrophenyl aminoethylurea等對照用標準品(LGC, Germany)；Hydroxybenzomorpholine及6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride等對照用標準品(TRC, Canada)。

(二)試劑及溶劑：甲酸銨(Ammonium acetate)採用質譜級(Sigma-Aldrich, USA)；氨水(Ammonium hydroxide, 25%)及甲酸(Formic acid, 100%)均採用質譜級(Honeywell, Germany)；甲醇(Methanol)及乙腈(Acetonitrile)均採用LC級(J.T. Baker, USA)。

(三)器材：10 mL及20 mL容量瓶；3 mL不附針注射器(Terumo, Taiwan)；PTFE針筒式濾頭(直徑為25 mm，孔徑為0.22  $\mu$ m)(Waters, USA)；層析管(ACQUITY BEH Shield RP 18，1.7  $\mu$ m，內徑2.1  $\times$  100 mm、CORTECS UPLC C18<sup>+</sup>，1.6  $\mu$ m，內徑2.1  $\times$  100 mm及ACQUITY UPLC HSS T3，1.8  $\mu$ m，內徑2.1  $\times$  100 mm)，購自Waters公司(Waters, USA)。

### 三、儀器與裝置

(一)液相層析串聯質譜儀(Waters ACQUITY UPLC及Waters Xevo TQ-S micro Detector, Waters, USA)。

(二)質譜資料之分析軟體(MassLynx 4.2 SCN 989, Waters, USA)。

(三)純水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore, USA)。

(四)旋渦混合器(Vortex Mixer Genie 2, Scientific Industries, USA)。

(五)超音波振盪器(Ultrasonic cleaner GTD30, 國成科學，臺灣)。

### 四、方法

(一)試劑之調製

#### 1. 50%甲醇溶液

取甲醇與去離子水以1：1(v/v)比例混勻。

#### 2. 含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液

取抗壞血酸1 g，以50%甲醇溶液溶解使成1,000 mL，供作萃取溶劑。

(二)移動相溶液之配製

#### 1. 移動相溶液A

稱取甲酸銨0.63 g，以去離子水溶液溶解使成1,000 mL，以甲酸或氨水調整至所需pH值，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

#### 2. 移動相溶液B

取甲醇與乙腈以1：1 (v/v)比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

(三)標準溶液之配製

取2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol等5種對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以含0.1%抗壞血酸之50%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%抗壞血酸之50%甲醇溶液稀釋至10  $\mu$ g/mL，供作標準溶液。

(四)檢液之配製

將檢體混勻，取約0.5 g，精確稱定，加入含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液約8 mL，以超音波振盪30分鐘，再以含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液定容至10 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

(五)LC-MS/MS最適化測定條件

#### 1. 液相層析儀分析條件

層析管柱為Cortecs UPLC C18<sup>+</sup>(1.6  $\mu$ m，內徑2.1 mm  $\times$  100 mm)，移動相為10 mM甲酸銨溶液(pH 3.5)與甲醇：乙腈(1：1, v/v)溶液依表二進行梯度沖提，流速為0.3 mL/min，注入量為3.0

表二、LC-MS/MS之移動相梯度沖提條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	98 → 98	2 → 2
1.0 → 3.0	98 → 95	2 → 5
3.0 → 4.0	95 → 90	5 → 10
4.0 → 8.5	90 → 20	10 → 80
8.5 → 10.0	20 → 5	80 → 95
10.0 → 12.5	5 → 5	95 → 95
12.5 → 13.0	5 → 98	95 → 2
13.0 → 15.0	98 → 98	2 → 2

μL，管柱溫度為30℃。

## 2. 串聯質譜儀分析參數

以電灑游離法搭配多重反應偵測模式進行偵測，毛細管電壓(Capillary Voltage)為2.85 kV，離子源溫度(Ion Source Temperature)為150℃，溶媒揮散溫度(Desolvation Temperature)為500℃，進樣錐氣體流速(Cone Gas Flow Rate)為30 L/hr，溶媒揮散流速(Desolvation Gas Flow Rate)為650 L/hr，碰撞氣體(Collision Gas)為氬氣，各分析物之離子化模式、偵測離子對、進樣錐電壓及

碰撞能量等多重反應偵測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式偵測參數詳見表三。

## (六)鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各3 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依前述(五)條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間、波峰面積及多重反應偵測相對離子強度<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各染髮劑之含量(%)：

$$\text{檢體中各染髮劑之含量(\%)} = \frac{C \times V}{M} \times 10^{-4}$$

C：由標準曲線求得檢液中各染髮劑之濃度(μg/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(≤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

表三、5項染髮劑成分之MRM偵測參數

成分	離子化模式	RT (min)	離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
			前驅離子 > 產物離子 (m/z)		
2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol	ESI <sup>-</sup>	8.84	215 > 186 <sup>a</sup> 215 > 156	2	16 22
HC violet No.2	ESI <sup>+</sup>	6.58	300 > 224 <sup>a</sup> 300 > 234	12	26 16
Hydroxybenzomorpholine	ESI <sup>+</sup>	5.63	152 > 97 <sup>a</sup> 152 > 82	18	22 24
4-Nitrophenyl aminoethylurea	ESI <sup>+</sup>	6.74	225 > 165 <sup>a</sup> 225 > 119	10	14 24
6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine	ESI <sup>+</sup>	4.00	154 > 139 <sup>a</sup> 154 > 55	10	14 28

<sup>a</sup> 定量離子對

## (七)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

取10 µg/mL之標準溶液，以含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液進行稀釋及配製成不同濃度之溶液，各成分最終濃度範圍如表四。將其注入液相層析串聯質譜儀中，依前述(四)進行分析。就5項成分之波峰面積與對應之濃度，製作標準曲線。

## 2. 基質匹配檢量線

取市售染髮產品作為本方法之空白基質，並添加含5項染髮劑成分之標準溶液，使各成分最終濃度如表四所示，再注入液相層析串聯質譜儀中，依前述(五)進行分析，就5項成分之波峰面積與對應之濃度，製作基質匹配檢量線。

## 3. 基質效應計算

基質效應評估方式以標準曲線之斜率與基質匹配檢量線之斜率計算，公式如下：

$$\text{基質效應(\%)} = \left[ \left( \frac{\text{基質匹配檢量線之斜率}}{\text{標準曲線之斜率}} \right) - 1 \right] \times 100\%$$

## 五、確效試驗

本研究參考歐洲官方化粧品品質監控實

驗室組織(European Official Cosmetics Control Laboratories, OCCLs)及食藥署檢驗方法之確效規範<sup>(10,11)</sup>，執行確效試驗如下：

## (一)空白樣品分析

以市售染髮產品作為本方法之空白樣品，依檢液調製步驟製備空白檢液進行分析比對，確認空白樣品無待測物。

## (二)方法專一性評估

分別取前述空白樣品及添加5項成分標準溶液之空白樣品，依四、(四)進行檢液調製，再注入液相層析串聯質譜儀進行檢測，以評估本方法於染髮產品基質中是否能夠正確檢測出待測物成分。

## (三)定量極限評估

取前述之空白樣品作為本方法之基質適用性評估，添加一系列不同濃度之標準溶液，並進行5重複添加試驗，依四、(四)進行檢液製備，再注入液相層析串聯質譜儀進行檢測。就所測得波峰之訊號強度計算其訊噪比(Signal-to-noise ratio, S/N)，並記錄5重複添加試驗所得各分析成分波峰之滯留時間、相對離子強度及訊噪比。依所建立之檢驗方法步驟求得感度最佳之定量離子對S/N ≥ 10及感度次之定性離子對S/N ≥ 3，且MRM層析圖譜峰形清晰、滯留時間相符且相對離子強度均在容許範圍內之最低添加濃度作為方法之定量極限

表四、5項染髮劑成分之基質效應評估

成分	線性 範圍 (µg/mL)	標準曲線		基質匹配檢量線		基質 效應 (%)
		迴歸方程式	相關 係數	迴歸方程式	相關 係數	
2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol	0.2-2.5	y = 315550x + 32973	0.9989	y = 293608x + 43386	0.9978	-6.95
HC violet No.2	0.1-2.5	y = 165848x + 5185.2	0.9999	y = 191849x + 261.06	0.9999	15.68
Hydroxybenzomorpholine	0.1-2.5	y = 24562x + 59.697	0.9995	y = 21518x + 651.58	0.9999	-12.39
4-Nitrophenyl aminoethylurea	0.1-3.0	y = 203569x + 38904	0.9968	y = 140009x + 3700	0.9996	-31.22
6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine	0.2-2.5	y = 48813x + 743.5	0.9999	y = 43792x + 1276.5	0.9999	-10.29



(Limit of Quantitation, LOQ)。

#### (四)添加回收及重複性試驗

取空白樣品添加標準溶液，依濃度範圍依檢測品項之感度選定添加濃度，5項染髮劑成分之添加濃度如表五所示。再依前述四、(四)至(六)步驟進行檢液調製、儀器分析及含量測定，計算5重複試驗3日(n=15)之平均回收率及變異係數(Coefficient of variation, CV)，以評估本方法之準確性及重複性。

## 六、方法適用性評估

自行價購市售染髮產品作為檢體，並依四、(四)至(六)操作，測定檢體中5項染髮劑成分，以評估檢驗方法之適用性。

## 結果與討論

### 一、分析條件最適化探討

#### (一)層析管柱之測試

以食藥署公開建議檢驗方法「化粧品中染髮劑之檢驗方法(RA03D002.004)」等3篇方法<sup>(12-14)</sup>中所使用之3種層析管柱進行測試，分別為ACQUITY BEH Shield RP

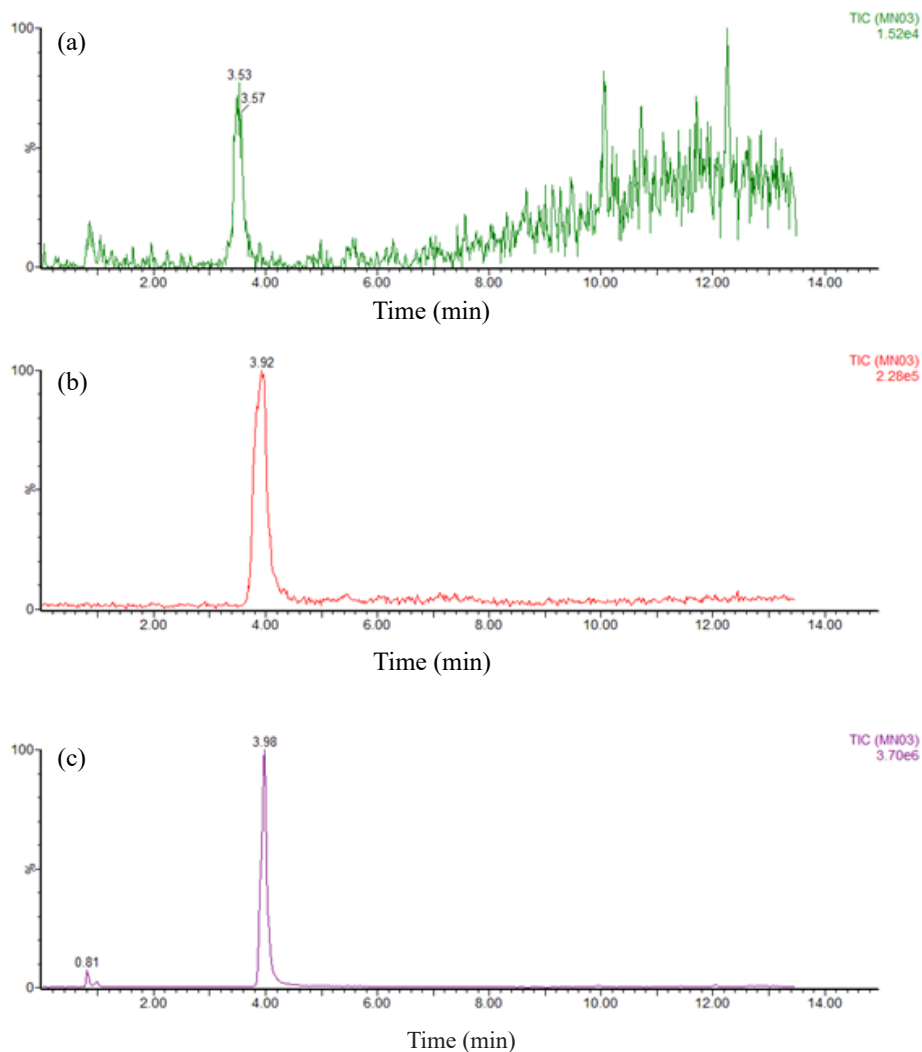
18 (1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  100 mm)，其具有適用pH範圍較寬及耐高溫等特性、CORTECS UPLC C18<sup>+</sup> (1.6  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  100 mm)，為填充實心顆粒之管柱，較多孔顆粒有更短的擴散路徑，而提供更高的管柱效能，使分析物的分離度更高、ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  100 mm)，可適用高水相之移動相分析，並應用於滯留及分離極性分析物等特性，測試結果以使用CORTECS UPLC C18<sup>+</sup>層析管柱進行分析時，化合物滯留分布情形、解析度及感度最佳。

#### (二)萃取溶劑之選擇

萃取溶劑分別以甲醇、50%甲醇溶液及含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液進行測試，以6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride為例(圖一)，3種萃取溶劑所呈現之峰形及感度結果，在以甲醇萃取時較差，而以含有水相之50%甲醇溶液進行萃取時，訊號強度提升約10倍，另以添加0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液萃取時，6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride之峰形及感度最佳，故選擇含0.1%抗壞血酸之50%甲醇

表五、5項染髮劑成分之平均回收率、變異係數及定量極限

成分	添加濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	定量極限 ( $\mu\text{g/g}$ )
2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol	4	100.9	13.41	4
	20	94.3	12.34	
HC violet No.2	2	89.5	12.71	2
	4	97.5	4.46	
Hydroxybenzomorpholine	2	95.8	13.50	2
	4	85.4	0.53	
4-Nitrophenyl aminoethylurea	2	91.9	7.11	2
	4	99.9	4.18	
6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride	4	82.2	6.07	4
	20	102.7	0.53	



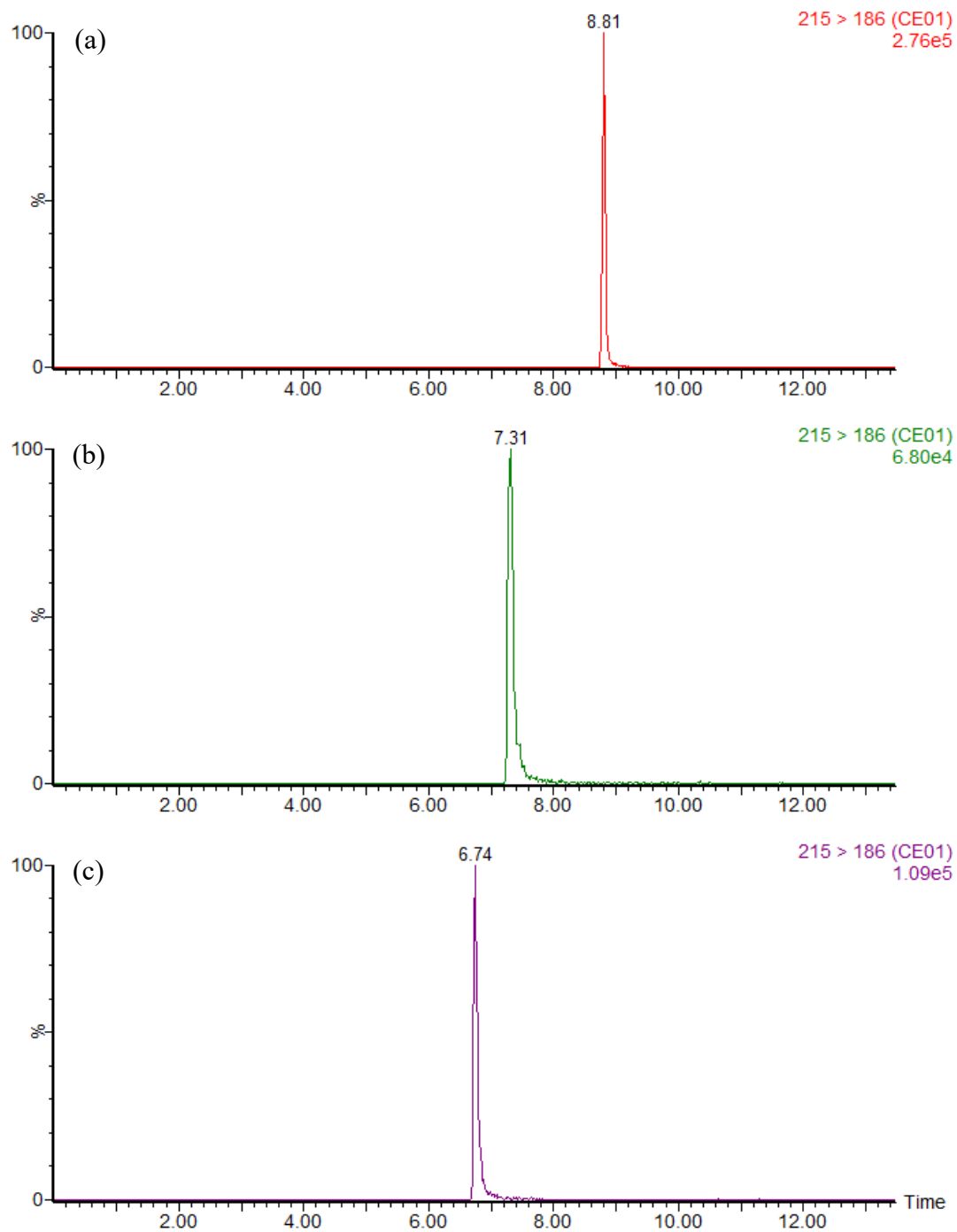
圖一、6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride標準品分別以(a)甲醇、(b)50%甲醇溶液及(c)含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液等不同溶劑萃取之MRM層析圖

溶液作為萃取溶劑。

### (三)移動相pH值條件之測試

據文獻<sup>(15)</sup>指出移動相之pH值極易影響染髮劑成分之分析，當分析物在不同pH值下解離程度不同，因此最適化移動相pH值條件，有助分析物於層析管柱中穩定進行分離。本研究配製10 mM甲酸銨溶

液作為移動相溶液A，並分別以甲酸及氨水調整其pH值為pH 3.5、6.2及8.0，進行分析比較，另搭配甲醇：乙腈(1：1, v/v)溶液作為移動相溶液B。以2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol為例(圖二)，在酸性狀態下，分析物峰形及感度最佳；而在中性及鹼性狀態時，出峰時間較早，且有



圖二、2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol分別以不同pH值之10 mM甲酸銨溶液作為移動相溶液A進行梯度沖提之MRM層析圖(a) pH 3.5、(b) pH 6.2及(c) pH 8.0

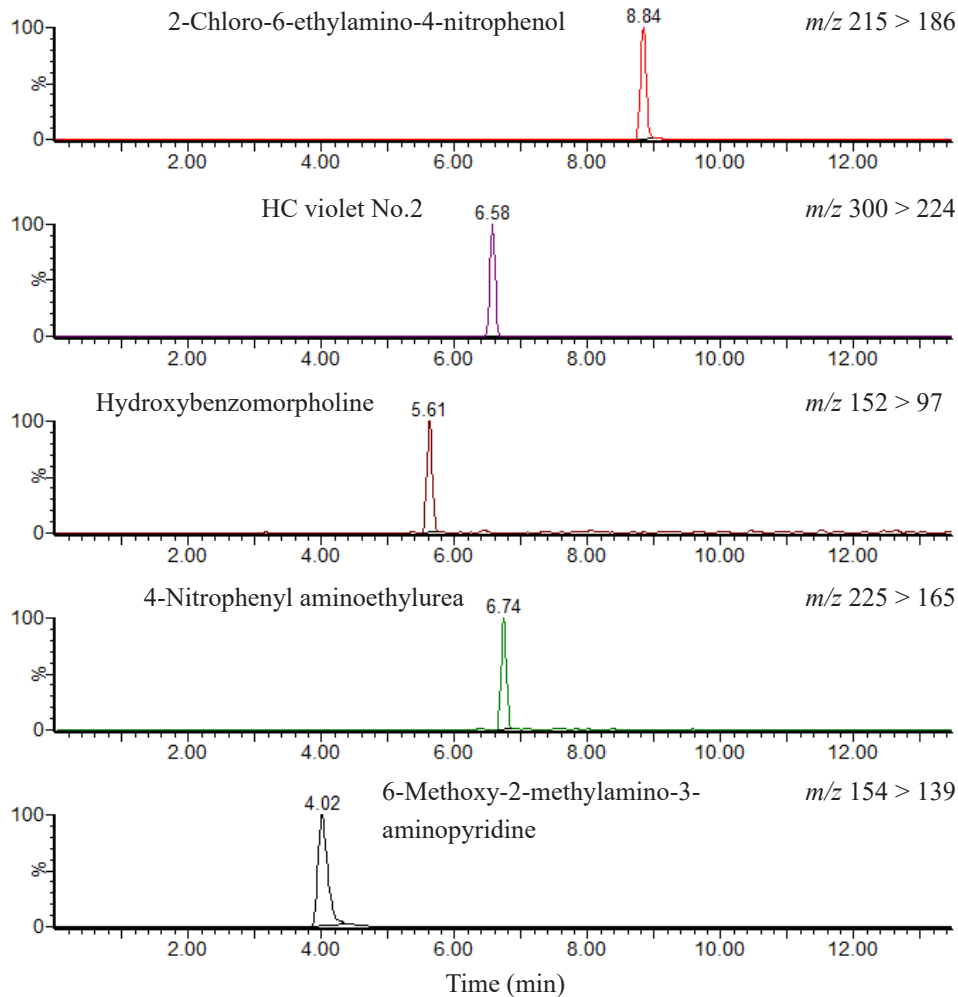


感度較差及拖尾的情形。因此選擇pH 3.5之10 mM甲酸銨溶液作為移動相溶液A。

綜合上述探討，本研究以「化粧品中染髮劑之檢驗方法(三)(RA03D006.005)」<sup>(13)</sup>之層析條件為基礎，使用含0.1%抗壞血酸之50%甲醇溶液為萃取溶劑，採用CORTECS UPLC C18<sup>+</sup>層析管柱搭配pH 3.5之10 mM甲酸銨溶液與甲醇：乙腈(1：1, v/v)溶液之移動相進行梯度沖提，可於15分鐘完成5項染髮劑成分之分析。

## 二、液相層析串聯質譜儀參數

本研究利用LC-MS/MS進行分析，以電灑游離法之離子化方式，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，先於第一段四極桿(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。以個別化合物之選擇反應偵測得到一最佳化之條件，經氬氣碰撞後產生訊號最強的產物離子為定量離子，訊號次之為定性離子，各化合物之MRM偵測參數如表三所示。



圖三、5項染髮劑成分標準品之MRM層析圖

以前述層析條件及質譜參數進行分析，並利用MRM模式偵測，可將5項染髮劑成分波峰分離(圖三)。

### 三、線性及基質效應評估

5項染髮劑成分混合標準溶液，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，其線性範圍如表四所示，標準曲線之相關係數皆在0.9968以上。在線性範圍評估部分，因部分成分於高濃度時有飽和現象，而低濃度時所得之定量離子波峰面積，代入檢量線之回收率過低，因此最終各成分之線性範圍介於12.5-30倍間。

因染髮產品基質複雜，為確認方法有無受基質的影響，而產生基質效應，本研究使用標準曲線之斜率與基質匹配檢量線之斜率計算基質效應之程度，如評估結果在 $\pm 20\%$ 內視為基質效應不明顯。各成分之基質效應落於-31.22-15.68% (表四)，其中4-Nitrophenyl aminoethylurea有明顯之基質效應，故使用基質匹配檢量線進行後續確效試驗。

### 四、確效試驗

#### (一)專一性評估

為評估本方法於染髮產品基質中，是否具有評估待測物的能力，取「材料與方法」之五、(一)所測試之空白樣品、空白樣品添加5項染髮劑成分標準品，再依前述檢液調製方法配製及分析，結果顯示於添加標準品之空白染髮產品無干擾待測物之現象，且滯留時間與標準品接近，顯示本方法具有良好的專一性。

#### (二)定量極限評估

本研究以染髮產品做為測試基質，建立5項染髮劑成分之定量檢驗方法，以感度最佳之定量離子訊噪比 $\geq 10$ 及次佳之定性離子對訊噪比 $\geq 3$ ，且MRM層析圖譜峰形清晰、相對離子強度均在容許範圍內之最

低濃度作為方法之定量極限。結果顯示HC violet No.2、Hydroxybenzomorpholine及4-Nitrophenyl aminoethylurea之定量極限為2  $\mu\text{g/g}$ ，而2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol及6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine之定量極限為4  $\mu\text{g/g}$ 。

#### (三)添加回收及重複性試驗

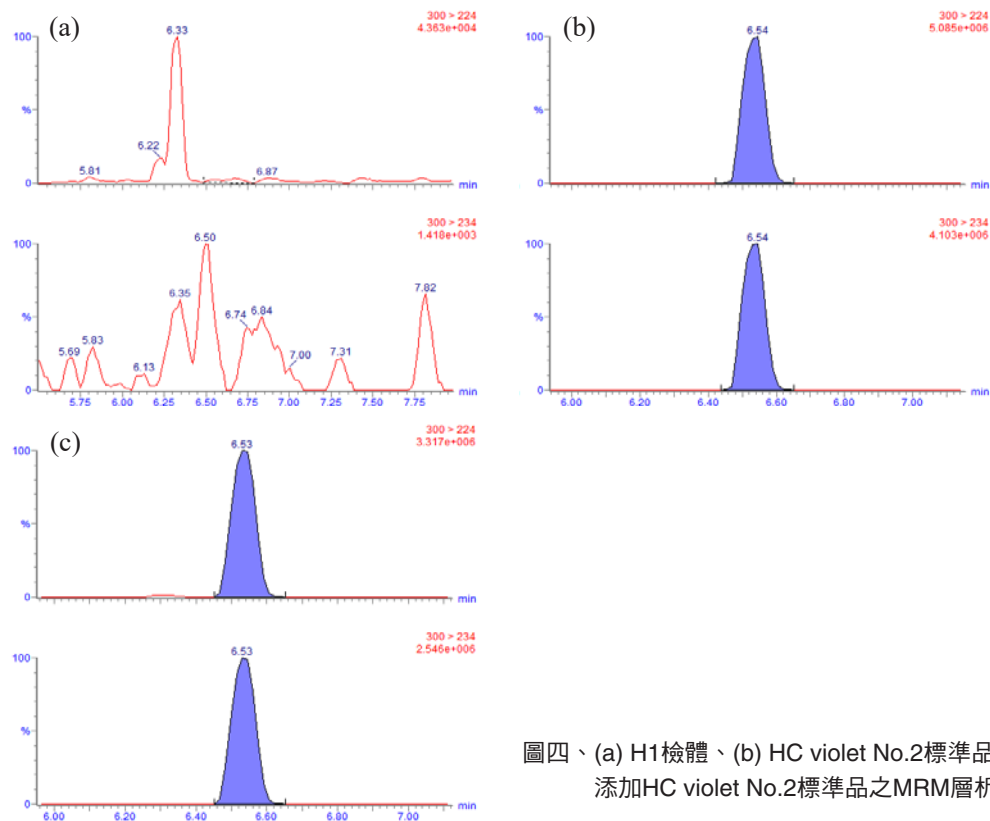
於空白樣品中添加5項成分之標準品，添加濃度分別為LOQ濃度及2倍或5倍之LOQ濃度。試驗結果如表五，添加LOQ濃度之平均回收率介於82.2-100.9%，變異係數均小於13.50%；而添加2倍或5倍LOQ濃度之平均回收率則介於85.4-102.7%，變異係數均小於12.34%，本方法之回收率及重複性均符合OCCLs及食藥署檢驗方法之確效規範。

### 五、市售產品適用性之評估

於法規尚未變更前(113年5月)查詢本研究5項染髮劑成分之未註銷許可證，其中2-Chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol及4-Nitrophenyl aminoethylurea等2項成分均無許可證資料，HC violet No.2、6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride及Hydroxybenzomorpholine等3項成分之許可證張數則分別為3張、30及81張，故購入含前述3項成分之產品各1件進行測試(檢體代號H1-H3)。另針對本研究染髮劑成分之顏色、其於許可證中染髮產品之顏色、染髮產品種類及劑型等，選購11件未標示含有本次研究成分之染髮劑產品(檢體代號S1-S11)，作為方法適用性測試。14件市售染髮產品之方法適用性檢測結果如表六。結果顯示13件產品均與標示相符，惟H1檢體未檢出標示之HC violet No.2成分(圖四)，已送衛生單位進行後續查處。

表六、市售染髮產品中5項染髮劑成分之檢測結果

檢體代號	劑型	國別	產品標示 <sup>a</sup>	檢驗結果
S1	2劑型(膏劑)	泰國	未標示	未檢出
S2	2劑型(膏劑)	泰國	未標示	未檢出
S3	1劑型(粉劑)	印度	未標示	未檢出
S4	2劑型(液劑)	臺灣	未標示	未檢出
S5	2劑型(膏劑)	中國	未標示	未檢出
S6	2劑型(膏劑)	義大利	未標示	未檢出
S7	2劑型(膏劑)	臺灣	未標示	未檢出
S8	2劑型(膏劑)	中國	未標示	未檢出
S9	1劑型(液劑)	臺灣	未標示	未檢出
S10	1劑型(粉劑)	印度	未標示	未檢出
S11	1劑型(液劑)	臺灣	未標示	未檢出
H1	1劑型(液劑)	中國	HC violet No.2	未檢出
H2	2劑型(膏劑)	中國	Hydroxybenzomorpholine	檢出
H3	2劑型(膏劑)	德國	6-Methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride	檢出

<sup>a</sup> 產品是否標示本研究之5項染髮劑成分

圖四、(a) H1檢體、(b) HC violet No.2標準品及(c) H1檢體添加HC violet No.2標準品之MRM層析圖

## 結 論

本研究以LC-MS/MS建立化粧品中5項染髮劑成分之定量檢驗方法，適用於氧化性及非氧化性染髮產品，可快速篩檢並有效縮短分析時間及減少複雜基質造成檢驗誤判之可能性。已完成染髮產品中該5項成分之定量方法確效，結果顯示本方法具有良好之專一性、準確度及精密度，可應用於化粧品中染髮劑成分之檢驗，擴增現行公開方法「化粧品中染髮劑之檢驗方法(三) (RA03D006.005)」<sup>(13)</sup>之可檢測品項數，由31項增加為36項，並提供地方衛生局及檢驗單位使用，以提升國內產業水準，增加國際競爭力並可應用於監測上市後化粧品之品質，保護民眾化粧品使用安全。

## 參考文獻

1. He, L., Michailidou, F., Gahlon, H.L. and Zeng, W. 2022. Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. *Chem. Res. Toxicol.* 35(6): 901-915.
2. 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號公告訂定。
3. 衛生福利部。2024。化粧品成分使用限制表。113.05.30衛授食字第1131602014號公告修正。
4. 日本厚生勞動省。2021。染毛劑製造販売承認基準について。  
[[https://www.mhlw.go.jp/web/t\\_doc?dataId=00tc6009&dataType=1](https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc6009&dataType=1)]
5. 日本厚生勞動省。2000。化粧品基準。  
[<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisaku-jouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/keshouhin-standard.pdf>]
6. Government of Canada. 2024. Cosmetic Ingredient Hotlist: Prohibited and Restricted Ingredients.  
[<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/consumer-product-safety/cosmetics/cosmetic-ingredient-hotlist-prohibited-restricted-ingredients.html>]
7. European Commission. 2009. Regulation (EC) No.1223/2009 – Annex III List of substances which cosmetic products must not contain except subject to the restrictions laid down.  
[<https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/reference/annexes/list/III>]
8. Zuo, X., DI, Z., DU, Y., Yang, L. *et al.* 2021. Determination of 40 dyes in oxidative hair dye products by high performance liquid chromatography. *Se Pu.* 39(11): 1222-1229.  
[<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9404089/>]
9. Guerra, E., Llompарт, M. and Garcia-Jares, C. 2018. Analysis of dyes in cosmetics: challenges and recent developments. *Cosmetics* 5(3): 47.
10. The European Network of Official Cosmetics Control Laboratories (OCCLs). 2021. OCCL Guideline on validation and verification of the performance of analytical procedures for cosmetic products. PA/PH/OCCL (19) 3 R5.
11. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]
12. 衛生福利部食品藥物管理署。2023。化粧品中染髮劑之檢驗方法(RA03D002.004)。
13. 衛生福利部食品藥物管理署。2023。化粧品中染髮劑之檢驗方法(三) (RA03D006.005)。
14. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。化粧品中染髮劑之檢驗方法(四) (RA03D010.001)。
15. Rico, F., Mazabel, A., Egurrola, G., Pulido, J. *et al.* 2024. Meta-analysis and analytical methods in cosmetics formulation: A review. *Cosmetics* 11(1): 1.

# Establishment of the Analytical Method for Hair Dyes in Cosmetics

CHIUNG-WEN CHANG, SHIN-HAO CHEN, CHIU-YU HUANG,  
SHU-FANG TENG, SHOU-CHIEH HUANG, MEI-CHIH LIN  
AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research & Analysis, TFDA, MOHW

## ABSTRACT

This study develops a quantitative analytical method for the detection of five hair dye ingredients in cosmetic products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method utilizes electrospray ionization (ESI) coupled with multiple reaction monitoring (MRM), employing a Cortecs UPLC C18<sup>+</sup> column (1.6  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm) for chromatographic separation. The five target compounds include 2-chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol, HC violet No.2, hydroxybenzomorpholine, 4-nitrophenyl aminoethylurea, and 6-methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride could be analyzed by the method. Samples were extracted with 50% methanol solution containing 0.1% ascorbic acid prior to LC-MS/MS analysis. Gradient elution was performed using 10 mM ammonium formate aqueous solution at pH 3.5 and methanol: acetonitrile (1:1, v/v) solution, with a chromatographic run time of 15 minutes, yielding good analytical results. The method was validated using commercially available hair dye products as matrices, and the results showed no interference from added standards, demonstrating good specificity. The limits of quantification (LOQs) for HC violet No. 2, hydroxybenzomorpholine, and 4-nitrophenyl aminoethylurea were 2  $\mu\text{g/g}$ , while the LOQs for 2-chloro-6-ethylamino-4-nitrophenol and 6-methoxy-2-methylamino-3-aminopyridine hydrochloride were 4  $\mu\text{g/g}$ . The correlation coefficients ( $r$ ) for the calibration curves of these five compounds exceeded 0.9968. Average recovery rates ranged from 82.2% to 102.7%, and the coefficients of variation were all below 13.5%, indicating good accuracy and precision. A total of 14 hair dye products were evaluated, and the results demonstrated that the established method is applicable for the analysis of related products. In the future, this established testing method will be announced for reference and used by relevant parties.

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