

利用高效液相層析法分析化粧品中Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone等成分

陳信豪 黃守潔 陳玉盆 闕麗卿 施養志

食品藥物管理局研究檢驗組

摘要

本研究係利用高效液相層析配合光二極體陣列檢出器，同時分析化粧品中Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone成分。檢體先經甲醇溶解定容過濾後，以高效液相層析儀進行分析。使用之層析管柱為Lichros-pher RP-18 (管徑4.0 mm × 250 mm, 5 μm)；移動相為去離子水和乙腈比例為50 : 50 (v/v)；流速為0.8 mL/min；檢測波長為280 nm。三種成分標準曲線之線性範圍為1.0-20.0 μg/mL，線性回歸之判定係數(r²)介於0.9974-1.0000之間，同日內及異日間試驗之相對標準偏差均小於9.1%。添加不同濃度之標準品於空白面霜中，回收率介於86.1-117.6%，相對標準偏差均小於2.2%。最低定量濃度則均為5.0 ppm。應用本研究建立之方法檢測市售化粧品11件，除1件檢體檢出estradiol外，其餘均未檢出。

關鍵詞：Estradiol、Ethinyl estradiol、Estrone、高效液相層析法

前言

婦女在更年期停經後卵巢功能減退，無法分泌足夠的雌激素，就開始會有典型的更年期症狀，像是熱潮紅、盜汗、心悸等不適，更年期的婦女也容易出現體態發福、肌膚老化的問題，其因為雌激素不足的緣故。所以近年來針對這方面問題，市面上也開始推出含雌激素化粧品，主要功能是針對皮膚老化的問題。但通常產品內所含濃度較低，其效用也只有局部性皮膚，對一般成人的健康不至於有負面影響。

雌激素主要由卵巢卵泡顆粒細胞及卵泡膜分泌，在腎上腺皮質網狀帶也有少量生成。其作用為促進陰道上皮細胞成熟、增生和角化、黏膜變厚及增加細胞內糖原含量。臨床上可以用陰道細胞脫落的角化程度作為雌激素水平含量的標誌。雌酮(Estrone)主要來自雄烯二酮(Androstenedione)，而雌激素是由孕酮所形成。

雌酮(Estrone)和雌二醇(Estradiol)互為轉換酶，是由17β-羥基類固醇脫氫酶(17β-hydroxysteroid dehydrogenase)不同的同工酶所產生⁽¹⁾。

合成雌激素的主要來源是正值生育年齡的女性卵巢中。雌激素在男性方面，可以在周圍組織產生睪固酮(Testosterone)的作用。但脫氫表雄酮(DHEA)的產量也隨著年齡增加而逐漸減少。在青春期前的雌激素在血清濃度為最低，而在成年期後將達到高峰期⁽¹⁾。

目前許多研究都顯示雌激素在皮膚的保護上，不論在男女上都扮演重要的角色，在更年期的婦女研究上，雌激素的下降會造成皮膚乾燥、萎縮、皺紋、表皮變薄、在真皮的膠原蛋白量下降及傷口癒合不良等情形發生^(2,3)，利用雌激素替代療法(HRT)可有效增加皮膚水分和光澤及日曬所造成的皮膚老化⁽⁴⁾。研究顯示透過外用雌激素的治療，刺激皮膚角質形成細胞增殖及減少細胞凋亡的萎縮，增加皮膚膠原蛋白的生產，抑制

MMP的形成；通過改變角質細胞功能，增加皮膚含水分能力，減少皮膚乾燥，並增加皮脂生產。抑制皮膚皺紋，增加皮膚彈性纖維等改善方⁽⁵⁾。

Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone係屬行政院衛生署公告「化粧品含有醫療或毒劇藥品基準」所載成分^(6,7)，規定使用於頭部黏膜及頭部黏膜部以外，含脂肪族第一級醇類(用於溶解成分為目的者)之化粧品，其限量為每一公克200國際單位以下；用於其他化粧品中，限量為每一公克500國際單位以下。含有上述三種雌激素成分之產品需辦理查驗登記始能製造或輸入販售。為確保產品品質保護消費者之健康安全，本研究擬建立一快速且再現性高之液相層析法，可同時分析、鑑別及定量三種雌激素成分，並應用於例行性化粧品中雌激素之檢驗。

材料與方法

一、材料

Estradiol ($\geq 98\%$)、Ethinyl estradiol ($\geq 98\%$)及Estrone ($\geq 98\%$) 對照用標準品皆購自美國USP。空白面霜購自台灣啟超有限公司。甲醇採用液相層析級為試藥特級，皆購自德國Merck公司。濾膜(0.45 μm ，Nylon)購自Titan。

二、儀器設備

本實驗使用高效液相層析儀Waters 515 HPLC Pump連接Waters 717 plus Autosampler及Waters 2996 Photodiode Array Detector。水淨化組件為Milli-Q Waters Purification System (Milli-pore Corp)。

三、實驗方法

(一)分析條件

層析管柱型號為Lichrospher RP-C18，管徑4.0 mm \times 250 mm，5 μm ；移動相為乙腈與去離子水以50：50 (v/v)之比例混合，流速為0.8 mL/min；檢測波長為280 nm，注入量為20 μL 。

(二)標準品溶液之配製

1. 分別取Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone對照用標準品10.0 mg，精確稱定，共置於100 mL容量瓶中，以甲醇溶解並定容，做為標準品儲備溶液。
2. 標準品溶液由上述之儲備溶液配製，臨用時再以甲醇稀釋。

(三)檢液之配製

取檢體約1 g，精確稱定，置於10 mL容量瓶中，以甲醇溶液溶解並定容至10 mL，置於超音波震盪約30分鐘，冷卻後，以濾膜(0.45 μm)過濾，取濾液供做檢液。

(四)標準曲線之製作

分別取Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone標準品儲備溶液，以甲醇稀釋成1.0-20.0 $\mu\text{g/mL}$ 之系列濃度，注入高效液相層析分析後，就標準溶液所得波峰之面積，求出標準曲線之線性迴歸方程式及相關係數。

(五)確效試驗

1. 精密度(Precision)

於對照標準品之線性範圍內，精確量取上述標準品儲備溶液，以甲醇稀釋，分別配製5種不同濃度之標準品溶液，於同一日內及不同的三日連續注入高效液相層析儀分析，每一濃度各進行三重覆，計算標準偏差(S.D.)及相對標準偏差(R.S.D.)。

2. 準確度(Accuracy)

添加已知三種標的成分於不含雌激素之空白面霜中，同上述方法(三)配製成檢體溶液後，注入高效液相層析儀分析，求取回收率並計算準確度。

3. 最低檢測濃度(Limit of Detection)

分別將三種成分標準品溶液，以甲醇稀釋，配製成一系列濃度之溶液，添加於不含雌激素之空白面霜(1 g)中，溶解並定容至10 mL，配製成檢體溶液，注入高效液相層析儀分析，通常以波峰面積之雜訊比為3：1時之濃度，作為最低檢測濃度⁽⁸⁾。

4. 最低定量濃度(Limit of Quantity)

分別將三種成分標準品溶液，以甲醇稀釋，配製成一系列濃度之溶液，添加於不

含雌激素之空白面霜(1 g)中，溶解並定容 10 mL，配備成檢體溶液，注入高效液相層析儀分析，通常以波峰面積之雜訊比為 10:1 時之濃度為最低定量濃度值⁽⁸⁾。

結果與討論

本計畫所建立之方法係利用高效液相層析法同時分析 Estradiol、Ethinyl estradiol 及 Estrone 成分，三成分標準曲線之線性範圍為 1.0-20.0 µg/mL，線性回歸之判定係數(r^2)介於 0.9974-1.0000 之間，呈良好線性關係。分別配製含 Estradiol、Ethinyl estradiol 及 Estrone 不同濃度之標準品溶液，於同日內及異日間分析，其結果如表一，同日內及異日間試驗之相對標準偏差，分別介於 1.4-4.0 及 0.8-9.6% 之間，顯示此高效液相層析方法用於此三種成分之再現性良好。表二則為添加此三種成分標準品溶液於空白面霜之回收率，介於 86.1-117.6%，相對標準偏差(R.S.D.)範圍介於 0.2-2.2%。依前述方法添加 Estradiol、Ethinyl estradiol

表二、三種雌激素於樣品中之添加回收率

Componds	Spiked conc. (µg/mL)	Recovery(%)	R.S.D.
		Mean ± S.D	(%)*
Estradiol	0.5	111.5 ± 0.012	2.2
	1.0	117.6 ± 0.021	1.9
	2.0	112.2 ± 0.028	1.2
Ethinyl estradiol	0.5	102.6 ± 0.003	0.7
	1.0	94.2 ± 0.017	1.8
	2.0	91.2 ± 0.029	1.5
Estrone	0.5	97.4 ± 0.002	0.3
	1.0	86.1 ± 0.004	0.4
	2.0	93.0 ± 0.006	0.2

n=3

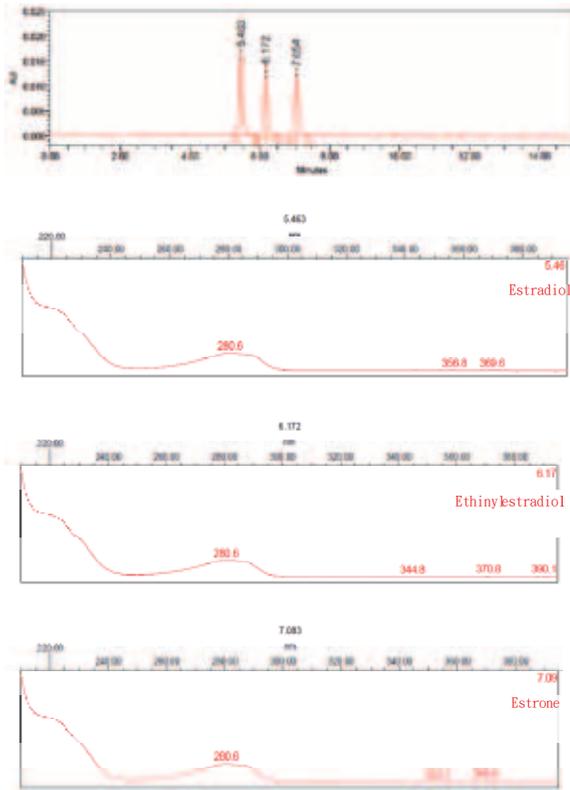
及 Estrone 標準品溶液於不含雌激素之化粧品中，檢體經前處理所後，於 HPLC 分析得各成分之最低偵測極限(LOD)及最低定量濃度(LOQ)，分別為 0.20 及 0.5 mg/mL。圖一為三種雌激素之標準品溶液，在高效液相層析進行分析之 UV 圖譜，最適

表一、三種雌激素於同日間及異日間之標準偏差

Componds	Concentration (µg/mL)	Mean ± S.D		R.S.D.(%)	
		Intraday*	Interday**	Intraday*	Interday**
Estradiol	0.96	0.824 ± 0.0272	0.909 ± 0.087	3.3	9.6
	1.92	2.001 ± 0.049	2.013 ± 0.037	2.5	1.8
	2.88	2.767 ± 0.064	2.839 ± 0.072	2.3	2.5
	9.6	9.905 ± 0.171	9.597 ± 0.340	1.7	3.5
	19.2	19.064 ± 0.348	19.201 ± 0.152	1.8	0.8
Ethinyl estradiol	0.96	0.903 ± 0.024	0.961 ± 0.057	2.7	5.9
	1.92	1.880 ± 0.033	1.943 ± 0.055	1.8	2.9
	2.88	2.615 ± 0.100	2.839 ± 0.072	3.8	7.8
	9.6	10.230 ± 0.174	9.597 ± 0.340	1.7	4.4
	19.2	18.932 ± 0.311	19.201 ± 0.152	1.6	2.7
Estrone	1.0	0.9785 ± 0.037	0.986 ± 0.028	3.8	2.9
	2.0	2.096 ± 0.033	2.015 ± 0.071	1.6	3.5
	3.0	2.771 ± 0.039	2.900 ± 0.416	1.4	5.0
	10.0	10.257 ± 0.414	9.896 ± 0.449	4.0	4.5
	20.0	19.897 ± 0.399	19.724 ± 0.372	2.0	1.9

*n=3, Repeat injection three times on the same day.

**n=9, Repeat injection three times each day and a successive three-day.



圖一、雌二醇、炔雌醇和雌酮之層析圖及UV光譜圖

吸收波長皆為280 nm。

為了解本計畫所建立的方法對一般市售化粧品之適用性，取11種不同之市售化粧品檢體，將檢體經前述方法製備成檢液後，再以所建立之高效液相層析法，分析其是否含有Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone成分，其中10件檢體外包裝上無許可證字號，經分析後並未檢出雌激素成分；1件美胸霜檢體外包裝上有標示許可證字號及Estradiol成分，經分析後檢出Estradiol成分含量為0.003%，該檢體符合規定標準，判定方式為Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone成分用於其他化粧品，其總含量濃度為500個國際單位以下，換算方式為0.1 μg純雌酮(Estrone)所引起的陰道上皮角質化作用，作為一國際單位(IU)，換算出的限量為50 μg/g，檢驗結果如表三。

本研究建立高效液相層析法，除了可針對市售化粧品進行三種雌激素分析、大幅減少分析

表三、市售化粧品檢驗結果

編號	檢體類別	製造國別	許可證字號	檢驗結果
1	精油	未標示	無	未檢出
2	精油	西班牙	無	未檢出
3	精油	法國	無	未檢出
4	香水	台灣	無	未檢出
5	香水	台灣	無	未檢出
6	潤滑液	丹麥	無	未檢出
7	潤滑液	西班牙	無	未檢出
8	私密清潔劑	越南	無	未檢出
9	私密清潔劑	未標示	無	未檢出
10	乳膏	日本	無	未檢出
11	美胸精華霜	台灣	有	Estradiol 0.003%

時間及提高分析的效率，在雌激素成分之鑑別及含量分析都有很高之再現性。為避免使用化粧品時身體受到不當之傷害，建議消費者在選購化粧品時，且應注意產品標示，不宜購買標示不明、誇大不實及來路不明之產品，以確保自身使用安全及保障自身的權益。

參考文獻

1. Labrie, F. 2004. Adrenal androgens and intracrinology. *Semin. Reprod. Med.* 22: 299-309.
2. Hall, G. and Phillips, T. J. 2005. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53: 555-568; quiz 569-572.
3. Brincat, M. P., Baron, Y. M. and Galea, R. 2005. Estrogens and the skin. *Climacteric* 28: 110-123.
4. Emmerson, E. and Hardman, M. J. 2012. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. *Biogerontology* 13: 3-21. doi: 10.1007/s10522-011-9322-y.
5. Brincat, M. P. 2000. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* 35: 107-117.
6. 行政院衛生署。2005。增列Estrogens為禁用成分(含藥化粧品基準中之Estradiol、Estrone、

- Ethinyl estradiol除外)。94.04.21衛署藥字第0940306865號公告。
7. 政院衛生署。1991。化粧品中含雌激素(Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone)之殘留限量規定。80.08.07衛署藥字第963940號公告。
8. 政院衛生署。2009。分析方法確效指導手冊。行政院衛生署食品藥物管理局，台北。

Simultaneous Determination of Estradiol, Ethinyl Estradiol and Estrone in Cosmetics by HPLC

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

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

A high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of Estradiol, Ethinyl estradiol and Estrone in cosmetics, using Lichrospher RP-18 (I.D. 4.0 mm × 25 cm, 5 μm) column. In order to investigate the quality of marketed cosmetics, 11 samples were randomly collected by local health bureaus in Taiwan area during the year of 100. A mixture of water and methanol (50 : 50, v/v) was used as mobile phase. Flow rate was 0.8 mL/min and the chromatography was monitored by absorbance at 280 nm wavelength. The related coefficients R², of regression equations of the three calibration curve were 0.9974-1.0000. The relative standard deviations (RSD) of the three estrogen ingredients for intraday and interday analysis of relative standard deviation (RSD) were less than 9.1%. The average recoveries of these three ingredients spiked in sample ranged from 86.1 to 117.6%. The RSD's of average recoveries were less than 2.2%. The limits of quantitation in cosmetics were 0.5 μg/mL for Estradiol, Ethinyl estradiol and Estrone.

Key words: Estradiol, Ethinyl estradiol, Estrone, HPLC