

利用液相層析串聯質譜法分析化粧品中之雌激素

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

本研究係採用液相層析串聯質譜法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)，以正/負離子電灑法(positive/negative mode)之多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式同時檢測化粧品中Estriol、Estradiol、Estrone、Ethinyl estradiol、Diethylstilbestrol、Pregnanediol、Progesterone及Estradiol benzoate 8種雌激素(Estrogens)成分之檢測方法。使用之層析管柱為 Waters UPLC BEH C18 (1.7 μm , 內徑2.1 mm $\times$ 100 mm)；移動相為去離子水和乙腈進行梯度流洗；流速為0.3 mL/min；本研究方法中針對8種雌激素成分檢測，可在10分內鐘完成分析，標準曲線之線性範圍為0.005-1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，標準曲線線性回歸係數 r^2 皆為0.9953以上。添加不同濃度之標準品於空白乳液中進行三重複試驗，回收率介於85.2-115.0%，相對標準偏差均小於8.8%。

關鍵詞：液相層析串聯質譜法、雌激素、化粧品

前言

隨著時代進步，化粧品已成為現今人們不可或缺的消费產品之一。而化粧品的功能及效用也越來越多，所含成分之複雜具多樣化，隨之而來化粧品的安全性問題也逐漸受到消費者所關注。化粧品中添加雌激素就是一個熱門的話題，雌激素可以使產品帶來更好的發揮及使用效果，但長期使用含雌激素之化粧品，對人體生殖、骨質、神經及免疫系統會產生較大的副作用^(1,2)；研究顯示容易導致人體代謝紊亂及癌症之發生⁽³⁾。為保障消費者使用化粧品之安全，除Estradiol、Ethinyl estradiol及Estrone列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^(4,5)，其他雌激素成分皆不得使用於化粧品中。

本實驗選用液相層析串聯質譜法與高效液相層析技術相比，因大部分雌激素UV最

大吸收波長為280 nm 在鑑別若僅依賴滯留時間作鑑別，但容易造成結果上誤判⁽⁶⁾。透過LC/MS/MS可大幅度改善分析速度、解析度、分離度及靈敏度上之提升，並降低化粧品中基質干擾及結果上之誤判⁽⁷⁾。本研究擬利用液相層析串聯質譜儀，建立同時檢測化粧品中estriol、estradiol、estrone、ethinyl estradiol、diethylstilbestrol、pregnanediol、progesterone及estradiol benzoate 8種雌激素(Estrogens)成分之檢測方法，以達到提升檢驗效能之目的。

材料與方法

一、樣品來源

於102年1至12月間，由各縣市衛生局抽驗檢體主要為乳液產品，再依其產地細分為3類，其中輸入品為8件、國產品為11件及未標示國別為5件，共計24件。

二、試藥

Estriol、estradiol、ethinyl estradiol、estrone、diethylstilbestrol、pregnanediol、progesterone及estradiol benzoate 對照用標準品皆購自美國USP。甲醇及乙腈採用液相層析級，皆購自德國Merck公司。

三、器具

定量瓶、濾膜(0.22 mm, 25 mm, Nylon, 美國Titan公司)、液相層析管柱(ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm, 美國Waters公司)。

四、儀器設備

液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)：液相層析系統為(ACQUITY UPLC system, Waters, USA)。三段串聯四極式質譜儀(TQD, Waters, USA)，離子源採電灑法(electron spray ionization, ESI)，同時搭配Mass Lynx[®]軟體之電腦系統。純水製造機(Milli-Q Waters Purification System, Millipore Ltd., USA)。

五、標準品溶液之配製

精確取estriol、Estradiol、Ethinyl estradiol、Estrone、diethylstilbestrol、pregnanediol、progesterone及estradiol benzoate對照用標準品5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液，貯存於4℃。臨用時，取適量標準原液，以甲醇稀釋至0.005-1.0 μg/mL，供作標準溶液。

表一、液相層析流動相梯度

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
0.0 → 4.0	0.3	50 → 30	50 → 70
4.0 → 5.0	0.3	30 → 10	70 → 90
5.0 → 7.0	0.3	10 → 10	90 → 90
7.0 → 7.5	0.3	10 → 50	90 → 50
7.5 → 8.0	0.3	50 → 50	50 → 50

六、檢液之調製

先將檢體混勻，精確量取檢體1 g，置於20 mL容量瓶中，加入甲醇15 mL，以超音波振盪30分鐘，再以甲醇定容置20 mL，經0.22 μm濾膜過濾，取濾液供作檢液。

七、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 × 100 mm, 1.7 μm

移動相：A液為去離子水；B液為乙腈，移動相梯度如表一

層析管柱溫度：35℃

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：3.98 kV

離子源溫度：150℃

溶媒揮散溫度：350℃

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8種雌激素混和標準液，濃度範圍為0.005-1.0 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、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各5 μL，進行高效液相層析串聯質譜分析，依前述條件進行分

表二、質譜分析之相對離子強度最大容許範圍⁽⁷⁾

相對離子強度 Relative intensity (% of base peak)	液相層析串聯質譜儀之 容許範圍 Tolerance range (%)
> 50%	± 20%
> 20 to 50%	± 25%
> 10 to 20%	± 30%
≤ 10 %	± 50%

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(表三)⁽⁸⁾鑑別之，並依下列計算式求得檢體中各雌激素之含量(μg/g)。

$$\text{檢體中雌激素之濃度}(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{V}{M}$$

C：由標準曲線求個雌激素之濃度(mg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

十、添加回收試驗

取乳液檢體約1 g，分別加入雌激素混和標準溶液，使其濃度為0.005-0.5 μg/g，依檢液之調製流程(六)操作後，以LC/MS/MS進行分析，同時進行空白試驗，以檢液所得各雌激素離子碎片質量波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量，求出雌激素之回收率。

十一、基質效應(matrix effect)

基質效應參考蔡等人於2011年發表之方法⁽⁸⁾，分別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0.005-0.5 μg/mL。

(二)空白基質萃取後添加之檢量線(matrix matched calibration curve, MCC)：取空白乳液萃取液添加雌激素混合標準品使其最終濃度為0.005-0.5 μg/mL。

(三)基質效應計算公式如下：基質效應 = (MCC之斜率→SCC之斜率)/SCC之斜率 × 100%

十二、定量極限之評估

取經均質之乳液空白檢體，精確稱定，加入適當標準溶液，依所建立之方法製備檢液並以LC/MS/MS分析。以每種雌激素之離子訊號

表三、質譜儀之分析參數

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity
Estriol	287.0	145.0	26	42	ESI ⁻
	287.0	170.9 ^a		36	
Estradiol	271.1	145.0	78	44	ESI ⁻
	271.1	271.1 ^a		22	
Estrone	269.1	145.0 ^a	66	42	ESI ⁻
	269.1	158.9		40	
Ethinyl Estradiol	295.0	144.8	68	48	ESI ⁻
	295.0	295.0 ^a		28	
Diethylstilbestrol	266.9	237.0 ^a	52	34	ESI ⁻
	266.9	250.9		32	
Pregnanediol	285.1	175.0	30	28	ESI ⁺
	285.1	189.0 ^a		34	
Progesterone	315.0	108.9 ^a	40	44	ESI ⁺
	315.0	122.9		28	
Estradiol benzoate	377.1	104.9	38	2	ESI ⁺
				6	
	377.1	135.0 ^a		26	

a. 定量離子

與雜訊之比值(S/N ratio)大於10作為定量極限(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 × 100 mm, 1.7 μm)層析管柱，所用的移動相A為去離子水；移動相B為乙腈，進行梯度沖提(gradient)，條件如表一，流速為0.3 mL/min，可於8分鐘內完成分析。圖一為estriol、estradiol、ethinyl estradiol、estrone、diethylstilbestrol、pregnanediol、progesterone及estradiol benzoate 8種雌激素成分，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。8種雌激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8種雌激素分析物。

二、質譜最佳條件

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(表二)。

三、標準曲線(Standard curve)結果

8種雌激素成分混合標準品濃度在0.005-1.0 μg/mL 所繪製之標準曲線公式，判定係數(r^2)皆在0.9953以上(表四)。

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 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⁽⁹⁾。基質效應評估結果範圍介於-5.45-6.23% (表四)。

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

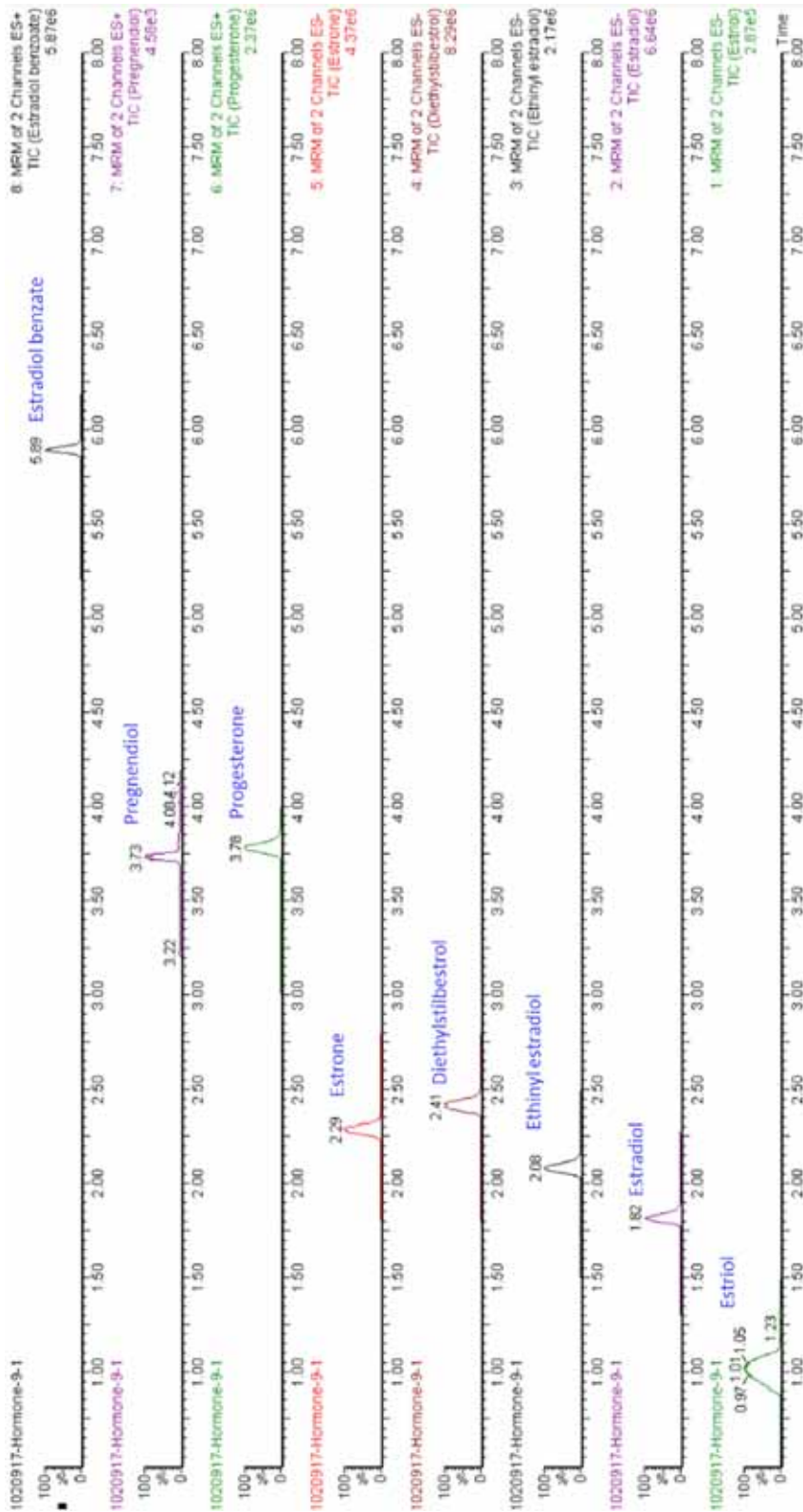
A：基質為背景之線性迴歸曲線斜率。

B：溶劑為背景之線性迴歸曲線斜率

五、添加回收試驗

表四、基質效應之影響情形

Estrogen	standard calibration curve	r^2	matrix matched calibration curve	r^2	Matrix Effect (%)
Estriol	$y = 15.18x + 23.12$	0.9964	$y = 14.85x - 32.81$	0.9992	-2.19
Estradiol	$y = 696.38x + 329.75$	0.9996	$y = 633.79x + 551.14$	0.9995	-5.45
Estrone	$y = 276.42x + 80.64$	0.9986	$y = 264.87x - 178.92$	0.9975	-4.18
Ethinyl estradiol	$y = 239.05x + 280.47$	0.9992	$y = 215.50x + 328.91$	0.9996	-1.28
Diethylstilbestrol	$y = 270.96x + 196.98$	0.9953	$y = 269.44x - 147.46$	0.9996	-0.77
Pregnanediol	$y = 0.24x + 1.17$	0.9970	$y = 0.25x + 0.68$	0.9995	6.23
Progesterone	$y = 81.26x + 67.18$	0.9994	$y = 81.86x + 51.35$	0.9997	0.74
Estradiol benzoate	$y = 17.50x - 1.12$	0.9997	$y = 16.83x + 18.35$	0.9974	-3.86



圖一、8種雌激素成分之質譜總離子層析

表六、8種雌激素之定量極限評估結果

Compound	LOQ (mg/mL)
Estriol	0.1
Estradiol	0.1
Estrone	0.1
Ethinyl estradiol	0.1
Diethylstilbestrol	0.1
Pregnanediol	1.0
Progesterone	0.1

經均質之空白乳液中分別添加8種雌激素混和標準液，使其濃度分別介於0.005-0.5 µg/g，所得之添加回收率(表五)，其回收率(recovery)介於85.2-115.0%之間，變異係數(CV)介於0.2-8.8 %之間，顯示所開發之分析方法具有良好之回收率(表五)。

六、定量極限之評估

本檢驗方法之定量極限分別為estriol、estradiol、ethinyl estradiol、estrone、diethylstilbestrol、progesterone及estradiol benzoate為0.1 ppm；pregnanediol為1.0 ppm (表六)。

七、市售化粧品樣品分析

利用所建立之方法應用於市售檢體之檢驗，各縣市衛生局抽驗檢體共24件，其中輸入品為8件，國產品為11件及未標示國別為5件(圖二)，結果2件檢體分別檢出Estradiol及Estradiol benzoate成分。檢出Estradiol者為核准有許可證字號之產品，另檢出Estradiol benzoate者已移請原送衛生局進行行政處理。

結 論

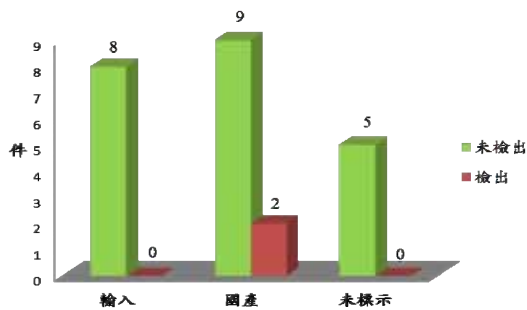
本研究建立以液相層析串聯質譜法(LC/MS/MS)同時分析化粧品中8種雌激素之分析方法。可準確鑑別雌激素，簡短分析流程，回收率及再現性均佳，可應用於例行性之檢驗工作。本研究方法在基質效應之影響情形如表四

表五、8種雌激素成分之添加回收

Compounds	Spiked conc. (µg/kg)	Recovery (%) Mean ^a	CV (%)
Estriol	5	93.0	2.47
	50	92.6	0.94
	100	88.3	0.61
Estradiol	5	85.7	1.71
	25	94.5	1.26
	50	93.2	0.20
Estrone	5	84.8	4.03
	25	88.2	1.94
	50	88.5	0.79
Ethinyl Estradiol	5	115.0	1.28
	25	97.8	2.69
	50	94.6	1.28
Diethylstilbestrol	5	84.8	4.04
	25	88.1	0.50
	50	92.2	0.71
Pregnanediol	50	105.4	4.12
	100	106.7	7.96
	500	85.2	6.22
Progesterone	5	94.0	8.84
	25	101.0	2.52
	50	100.4	1.64
Estradiol benzoate	5	92.4	3.03
	25	100.1	1.03
	50	113.7	1.16

a. n=3

可看出，當基質效應 $\leq \pm 10$ 其結果上可證明本方法應無明顯之基質效應，可降低分析時之干擾。其線性迴歸方程式之判定係數(correlation coefficient, r^2)皆在0.995以上，而基質效應之結果顯示，除Pregnanediol為6.23%外，其餘7種雌激素於乳液中無明顯基質效應。利用所建立之方法應用於市售檢體之檢驗，圖二所示102年度由各縣市衛生局抽驗檢體24件，其中輸入品8件，國產品11件及未標示國別5件，結果2件檢體分別檢出Estradiol及Estradiol benzoate成分(圖二)。



圖二、市售化粧品於8種雌激素之檢驗結果

檢出Estradiol者為核准有許可證字號之產品，另檢出Estradiol benzoate者並無核准許可證之產品，已移請原送衛生局進行行政處理。所以透過市售產品的驗證，可確定本方法可確實應用在例行性檢驗上，縮短分析上時間及鑑別上的困難。

參考文獻

1. 魏慧斌、林金明。2005。環境雌激素檢測方法研究進展。生命科學儀器，3(5): 3-10。
2. 代洪賓、張偉濱。2009。雄激素，雌激素與男性骨質疏鬆症。國際骨科學雜誌，30(2): 121-123。
3. Darbre, P. D. 2006. Environmental estrogens, cosmetics and breast cancer. Best Pract Res Clin Endoc Metab. 20: 121-143.
4. 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、Estroner、Ethinyl estradiol除外)。94.04.21衛署藥字第0940306865號公告。
5. 行政院衛生署。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。
6. 熊小婷、譚建華、李慧勇、趙田甜、招啟文等。2012。高效液相色譜/二級管陣列檢測法快速測定化粧品中違禁藥物。分析測試學報，32(4): 448-453。
7. 林雪霞、劉艷、張經華、林金明。2009。超高效液相色譜法測定護手霜中5種不同的雌激素。中國科學B輯：化學，39(8): 832-837。
8. Office for official publications of the European Communities. 2002. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results.
9. 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。

Determination of Estrogens 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

A method for the analysis of 8 estrogens in cosmetics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with electro spray ionization was developed. Data acquisition under MS/MS for each estrogen was achieved by applying multiple reaction monitoring (MRM). Estriol、estradiol、ethinyl estradiol、estrone、diethylstilbestrol、progesterone and estradiol benzoate were extracted from cosmetics with methanol, and analyzed by LC/MS/MS with electrospray ionization. The LC separation was conducted on an Waters ACQUITY BEH C18 (I.D. 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column with gradient elution of water and acetonitrile as the mobile phase. The concentration range of standards were 0.005-1.0 μg/mL with an r^2 value greater than 0.9953. The average recoveries of the 8 estrogen spiked in instant creams ranged from 85.2-115.0% and the relative coefficients of variation of all estrogens were below 8.8%.

Key words: LC/MS/MS, estrogen, cosmetics