

## 化粧品中雌激素類之檢驗方法

### Method of Test for Estrogens in Cosmetics

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於化粧品中 estriol、estradiol、estrone、ethinyl estradiol、estradiol benzoate、diethylstilbestrol、pregnanediol 及 progesterone 8 品項雌激素類(estrogens)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。
  - 2.1. 裝置：
    - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
      - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
      - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑 2.1 mm  $\times$  10 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 M $\Omega$ ·cm 以上)；estriol、estradiol、estrone、ethinyl estradiol、estradiol benzoate、diethylstilbestrol、pregnanediol 及 progesterone 對照用標準品。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、20 mL 及 50 mL。
    - 2.3.2. 濾膜：孔徑 0.22  $\mu\text{m}$ ，Nylon 材質。
  - 2.4. 移動相溶液之調製：
    - 2.4.1. 移動相溶液 A：去離子水。
    - 2.4.2. 移動相溶液 B：乙腈。
  - 2.5. 標準溶液之配製：

取雌激素類對照用標準品各約 5 mg，精確稱定，共置於 50 mL 容量瓶，以甲醇溶解並定容，作為標準原液，貯存於 4°C。臨用時，取適量標準原液，以甲醇稀釋至 0.005~1.0  $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。
  - 2.6. 檢液之調製：

將檢體混勻，取約 1 g，精確稱定，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，經濾膜過濾，供作檢液。
  - 2.7. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各 5  $\mu\text{L}$ ，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就各雌激素之波峰面積，與對應之各雌激素濃度，分別製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析條件<sup>(註)</sup>：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑 2.1 mm  $\times$  10 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件，進行梯度分析。

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 4.0	50 $\rightarrow$ 30	50 $\rightarrow$ 70
4.0 $\rightarrow$ 5.0	30 $\rightarrow$ 10	70 $\rightarrow$ 90
5.0 $\rightarrow$ 7.0	10 $\rightarrow$ 10	90 $\rightarrow$ 90
7.0 $\rightarrow$ 7.5	10 $\rightarrow$ 50	90 $\rightarrow$ 50
7.5 $\rightarrow$ 8.0	50 $\rightarrow$ 50	50 $\rightarrow$ 50

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5  $\mu\text{L}$ 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.98 kV。

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)。

離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

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( $m/z$ )		
estriol	ESI <sup>-</sup>	287	> 171*	26	42
		287	> 145		36
estradiol	ESI <sup>-</sup>	271	> 145*	78	44
		271	> 183		50
estrone	ESI <sup>-</sup>	269	> 145*	66	42
		269	> 159		40
ethinyl estradiol	ESI <sup>-</sup>	295	> 145*	68	48
		295	> 159		42
diethylstilbestrol	ESI <sup>-</sup>	267	> 237*	52	34
		267	> 251		32

pregnanediol	ESI <sup>+</sup>	285 > 189*	30	34
		285 > 175		28
progesterone	ESI <sup>+</sup>	315 > 109*	40	44
		315 > 123		28
estradiol benzoate	ESI <sup>+</sup>	377 > 135*	38	26
		377 > 105		26

\*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

## 2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依 2.7.節條件進行分析，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<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各雌激素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各雌激素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各雌激素之濃度(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

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限estriol、estradiol、estrone、ethinyl estradiol、diethylstilbestrol、progesterone及estradiol benzoate均為0.1 ppm，pregnanediol為1.0 ppm。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。