

嘉南藥理科技大學
化粧品科技研究所

碩士論文

以高效能液相層析法
分析化粧品中荷爾蒙之方法開發

Study of Analysis Hormones in Cosmetics by High
Performance Liquid Chromatographic Method

指導教授：李 淵 博 博士

共同指導：林 維 炤 博士

研 究 生：李 怡 霈

中華民國一百零二年七月三十一日

嘉南藥理科技大學
化粧品科技研究所

Department of Cosmetic Science
Chia-Nan University of Pharmacy and Science

碩士論文
Thesis for the Degree of Master

以高效能液相層析法
分析化粧品中荷爾蒙之方法開發
Study of Analysis Hormones in Cosmetics by High Performance
Liquid Chromatographic Method

指導教授：李 淵 博 博士 (Dr. Yuan-Po Lee)

共同指導：林 維 炤 博士 (Dr. Wei-Chao Lin)

研 究 生：李 怡 霽 (Yi-Pei Li)

中華民國一百零二年七月三十一日

31, July 2013

摘要

本研究針對化粧品中荷爾蒙物質利用高效能液相層析法(HPLC)建立兩種不同分析方法，第一部分為分析 Estradiol (E_2) 和 Ethinyl estradiol (EE_2)，以高效能液相層析儀連接螢光偵測器以提高其感度，由研究結果顯示雌激素成分之標準曲線之線性範圍為 0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，相關係數(R^2)皆達於 0.9999，評估同日內及異日間之相對標準偏差均低於 0.7%。本研究於自製樣品之添加回收率介於 97.31-99.75%，相對標準偏差均低於 2.34%。

第二部分使用微胞液相層析(MLC)分析化粧品中未允許添加之四種荷爾蒙成分，由研究結果顯示其類固醇成分之標準曲線之線性範圍為 5-100 $\mu\text{g/mL}$ ，相關係數(R^2)皆達於 0.9995，評估同日內及異日間之相對標準偏差均低於 0.8%；於自製樣品之添加回收率介於 96.95-99.75%，相對標準偏差均低於 4.19%。

關鍵字：荷爾蒙、雌激素、類固醇

Abstract

This study is to establish two difference analytic methods for hormones in cosmetics by high performance liquid chromatographic (HPLC). The first one is to analyse estradiol (E_2) and Ethinyl estradiol (EE_2) by HPLC with fluorescence detector was used to increase the sentivity. The result showed good linearity is also achieved in the range of 0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$ with a linear coefficient R^2 of 0.9999. Excellent method reproducibility was found for intra- and inter-day precisions with relative standard deviations of $<0.7\%$. The spike of samples are ranging from 97.31 to 99.75%, with standard deviations (RSD) less than 2.34%.

The second attempt is to analyse four illegal hormones in cosmetics by Micellar liquid chromatography (MLC) method. The results showed good linearity was achieved in the range of 5-100 $\mu\text{g/mL}$ with linear coefficient R^2 higher than 0.9995. The spike of samples are ranging from 96.95 to 99.75%, with standard deviations (RSD) less than 4.19%.

Keyword : Hormone 、 Estrogens 、 Steroids

致謝

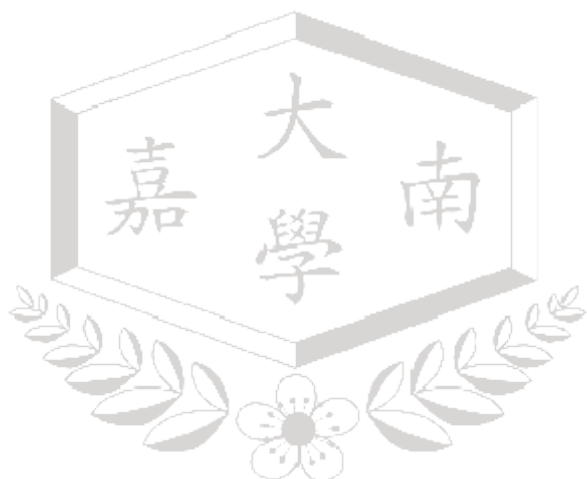
本論文可以如期完成，真的要很感謝林維炤老師，雖老師公務忙碌但只要實驗上碰到問題和困難總是會不厭其煩地耐心指導和鼓勵，才讓我能夠在研究過程中克服許多困難，因此從老師身上學到很多豐富的研究經驗及培養解決問題的能力，對於老師的感謝及所學到的皆會永銘於心。

感謝口試委員成功大學桂椿雄博士、嘉藥藥學系劉國盛博士以及指導教授李淵博博士和林維炤博士在百忙之中對本論文加以耐心審閱及指正，並給予許多專業的經驗和寶貴的意見，使得論文更加完善，口試能得以順利通過，致以誠摯的感謝。

經過了兩年來的努力，總算完成這本論文，在這過程中真的非常感謝許多人的支持和鼓勵，讓我能夠堅持下去。首先感謝實驗室的詩欣、玳汝及虹潔學姊們對於實驗上的教導，感謝在實驗時互相支持及鼓勵的兩位最重要夥伴企鵝和瓜瓜，實驗室的宛琪、培鎂、宗儒、雅琳、睿智、昆謙、妍伶、阿淮、余柔以及醫化系欣珊和宗穎這些學弟妹們在實驗上的協助和陪伴，感謝碩班同學們和患難與共的好友意舒、慧溫、懿君及宣羽不時地貼心及鼓勵。在我求學各階段的好姊妹們小美、喬惟、伊庭、宜平、情雯、色妹、婷文、雅萍及宥宥等人謝謝妳們給的鼓勵，大學好友鈺郢、家瑋、雅嵐、紀朋、偉心、書婷、佳霖、秀虹和肉球學長等人非常感謝這兩年來妳們大家給予精神

上的加油和陪伴，是讓我支持下去的動力。

最後，要感謝我最重要的家人們爸爸、媽媽及妹妹不時給予關心和鼓勵，而這兩年因有家人的大力支持加上妹妹貼心幫忙負擔家中部分的經濟，讓我更專心努力於學業上，因此將此論文獻給你們，再次由衷感謝所有曾經關心且協助過我的人，在此獻上我最真誠的感謝。

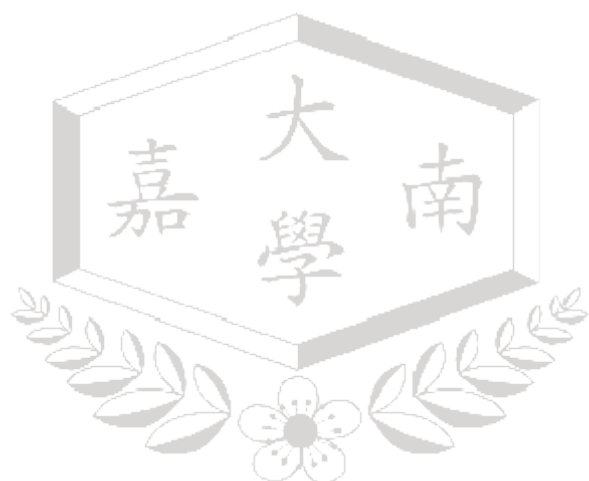


目錄

摘要	I
Abstract.....	II
致謝	III
目錄	V
圖目錄	VIII
表目錄	IX
縮寫表	X
第一章 緒論	1
1.1 前言	1
1.2 研究動機與目的	3
1.3 文獻回顧	6
1.3.1 雌激素	6
1.3.2 類固醇	12
第二章 以高效能液相層析連接螢光偵測器分析化粧品中雌激素	20
2.1 實驗藥品與設備	20
2.1.1 實驗藥品	20
2.1.2 儀器設備	21

2.2 實驗方法.....	21
2.3 分析參數評估.....	24
2.4 計算並分析結果.....	25
2.5 結果與討論.....	26
2.5.1 螢光光譜圖.....	26
2.5.2 分析雌激素參數探討.....	28
2.5.3 雌激素之檢量線.....	32
2.5.4 分析方法確效.....	33
2.5.5 市售樣品測定.....	33
第三章 以微胞液相層析分析化粧品中類固醇.....	36
3.1 實驗藥品與設備.....	36
3.1.1 實驗藥品.....	36
3.1.2 儀器設備.....	37
3.2 類固醇配製方法.....	37
3.3 分析參數評估.....	38
3.4 結果與討論.....	40
3.4.1 類固醇 UV 光譜圖.....	40
3.4.2 分析類固醇參數探討.....	41

3.4.3 類固醇之檢量線.....	47
3.4.4 分析方法確效.....	47
3.4.5 市售樣品分析.....	48
第四章 結論	52
參考文獻.....	54



圖目錄

圖 1.1 研究架構圖	5
圖 1.2 移動相中含 SDS 界面活性劑於 C ₁₈ 管柱中之作用機制	17
圖 2.1 雌激素 UV 光譜圖	27
圖 2.2 雌激素螢光放射光譜圖(Ex=280 nm)	27
圖 2.3 改變甲醇比例之滯留時間及解析度	29
圖 2.4 改變乙腈比例之滯留時間及解析度	30
圖 2.5 比較雌激素 UV-FL 感度及層析圖譜	31
圖 2.6 雌激素之層析圖譜	32
圖 3.1 類固醇 UV 光譜圖	40
圖 3.2 使用不同 SDS 濃度分析類固醇之滯留時間與解析度	42
圖 3.3 使用不同有機修飾劑分析類固醇之滯留時間與解析度	44
圖 3.4 改變有機修飾劑比例分析類固醇之滯留時間與解析度	44
圖 3.5 在不同溫度分析類固醇之滯留時間與解析度	46
圖 3.6 使用不同流速分析類固醇之滯留時間與解析度	46
圖 3.7 類固醇之層析圖譜	49

表目錄

表 1.1 雌激素之理化性質.....	8
表 1.2 分析雌激素(Estrogens)之相關研究	11
表 1.3 類固醇之理化性質.....	14
表 1.4 分析類固醇(Steroids)之相關研究.....	15
表 1.5 MLC 常使用的界面活性劑及其特性	19
表 2.1 自製樣品配方表.....	23
表 2.2 比較紫外/可見光偵測器(UV)及螢光偵測器(FL)感度.....	34
表 2.3 雌激素之檢量線濃度範圍、線性關係(R^2)及偵測極限(LOD).....	34
表 2.4 雌激素於同日間及異日間之標準偏差.....	34
表 2.5 分析自製樣品及添加回收率.....	35
表 2.6 分析自製樣品及添加回收率.....	35
表 3.1 類固醇之檢量線濃度範圍、線性關係(R^2)及偵測極限(LOD).....	49
表 3.2 類固醇於同日間及異日間之標準偏差.....	50
表 3.3 分析自製樣品及添加回收率.....	51
表 3.4 分析市售樣品及添加回收率.....	51

縮寫表

Fluorescence	FL
Micellar Liquid Chromatography	MLC
Estrone	E ₁
Estradiol	E ₂
Ethinyl estradiol	EE ₂
Estriol	E ₃
Mestranol	MeEE ₂
Hydrocortisone	HYD
Dexamethasone	DEX
Prednisolone	PL
Prednisone	PS
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Iso-propyl alcohol	PrOH
Pentanol	PeOH
Butanol	BuOH

第一章 緒論

1.1 前言

隨著科技的發展且生活水準不斷提升，化粧品與人們生活更是密切相關；台灣化粧品市場商機無限已是個競爭激烈的產業，成為不可或缺的消費品之一。由於皮膚經年齡之變化問題一直是社會大眾所關注的話題，「老化」速度因人而異，並不是因年齡增加使身體機能下降為必定條件，荷爾蒙分泌量改變並衰退才是主要因素[1]。因此，市面上不斷陸續開發在化粧品中添加雌激素，主要針對皮膚老化和更年期的婦女因雌性荷爾蒙減少所產生的肌膚問題。另外，消費者意識的抬頭對於化粧品功能性訴求越多，化粧品成分就越趨向複雜多元化，而化粧品中所添加的化學物質對人體健康是否構成直接的威脅，在化粧品的安全性已成為廣大消費者密切關注。

「荷爾蒙」(Hormones)又稱為「激素」，是體內各器官之間傳導訊息的化學成分，由生物體內內分泌系統（endocrine system）所分泌的化學物質，主要功能是為了調控生理機制以及支配生物體內生長、發育、生殖或行為，藉血液循環輸送到至全身，以維持身體、細胞的協調功能並影響和控制許多生理反應及功能[2-4]。

在環境中對於人類健康及生態可能會造成危害且干擾內分泌系統功能的物質，統稱為「內分泌干擾物」(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)

又稱「環境賀爾蒙」；環境賀爾蒙是一種體外的化學物質，存在環境中會透過食物鏈進入生物體內，模仿並影響生物體內合成、分泌運輸及作用，特別是雌激素和雄激素可能會害到人類及野生動物之健康甚至影響到下一代人類生長發育及器官障礙；許多研究都著重在雌激素荷爾蒙，主要在產生和使用避孕藥或作為更年期婦女用藥[5-7]。

近年來，應化粧品市場功效明顯的訴求，在市面上許多產品標示著「藥粧」、「醫療通路」及「經皮膚科醫師測試」等導致消費者難以分辨藥品、含藥化粧品以及一般化粧品。依衛生福利部管理規定，將化粧品分為「一般化粧品」及「含藥化粧品」兩類，「含藥化粧品」是指含有醫療或毒劇藥品者，且其含量不超過基準限量為範圍，包括染髮劑，防曬劑、燙髮劑、止汗制臭劑、美白劑、其他類如水楊酸、尿囊素、雌激素等成分；允許添加於「含藥化粧品」之成分皆須符合規定及限量標準，因其具有療效，對人的生理機能有一定之影響，規範較「一般化粧品」嚴格。

雌激素為被允許添加於化粧品中之荷爾蒙物質屬「含藥化粧品」，雌激素成分有雌酮(Estrone, E_1)、雌二醇(Estradiol, E_2)以及乙炔基雌二醇(Ethinyl estradiol, EE_2)，使用在頭部黏膜及頭部黏膜部以外限量為每一公克200 IU以下（總含量），用於其他化粧品中之限量為每一公克500 IU以下[8]。化粧品中常見荷爾蒙物質如王基苯酚乙烯、鄰苯二甲酸酯類及類固醇等，而衛生

福利部檢驗市面上化粧產品中則常被違法添加於化粧品中之荷爾蒙物質為 Dexamethasone (DEX)、Hydrocortisone(HYD)等類固醇成分，類固醇在國內歸屬藥品管制，是禁止添加於化粧品中[9]，因許多業者為求速效而違法添加藥物，且不當使用荷爾蒙物質仍有許多嚴重的副作用。

1.2 研究動機與目的

人口結構老化與壽命延長已是現今全球性的趨勢，許多研究都顯示雌激素不論在男性和女性生理上都扮演著重要的角色，都因年齡的增長而身體各組織器官退化以及荷爾蒙減少等老化現象；而婦女隨著年齡增加而卵巢功能衰退，分泌的女性雌激素不足所造成生理情緒上的不適，稱為「更年期（climacteric）」[10, 11]。婦女在更年期停經後無法分泌足夠的雌激素及女性荷爾蒙濃度降低就會有熱潮紅、盜汗及心悸等情況發生，男性則常有荷爾蒙分泌過剩而導致的頭髮問題[12]。

近幾年，市面上開發許多具療效的化粧品並陸續出現不合乎標準的化粧品，其中大部分不合格化粧品主要為未被允許添加之荷爾蒙成分-類固醇，不僅會使身體免疫力降低，長期使用可能對人體導致乳腺癌和子宮內膜增生發生代謝紊亂，因此在化粧品的安全性已引起了廣泛的關注[13]。

本研究所探討的主題分為兩部分，研究架構如圖 1.1 所示，第一部分針

對化粧品中允許添加荷爾蒙物質之雌激素成分，使用高效能液相層析儀連接螢光偵測器分析雌激素，開發高靈敏的分析方法，因衛生福利部所公告參考檢驗方法是以高效能液相層析儀連接紫外/可見光分析雌激素，在化粧品中允許添加荷爾蒙物質之雌激素成分最低限量為 0.002%其分析感度較差，而本研究目的能提高感度及降低偵測極限。第二部分則結合微胞液相層析法建立一個可以快速檢測化粧品中禁止添加荷爾蒙物質之方法開發，並能應用於市售樣品上。因此，針對本研究兩部分所探討化粧品中荷爾蒙物質做以下文獻回顧。



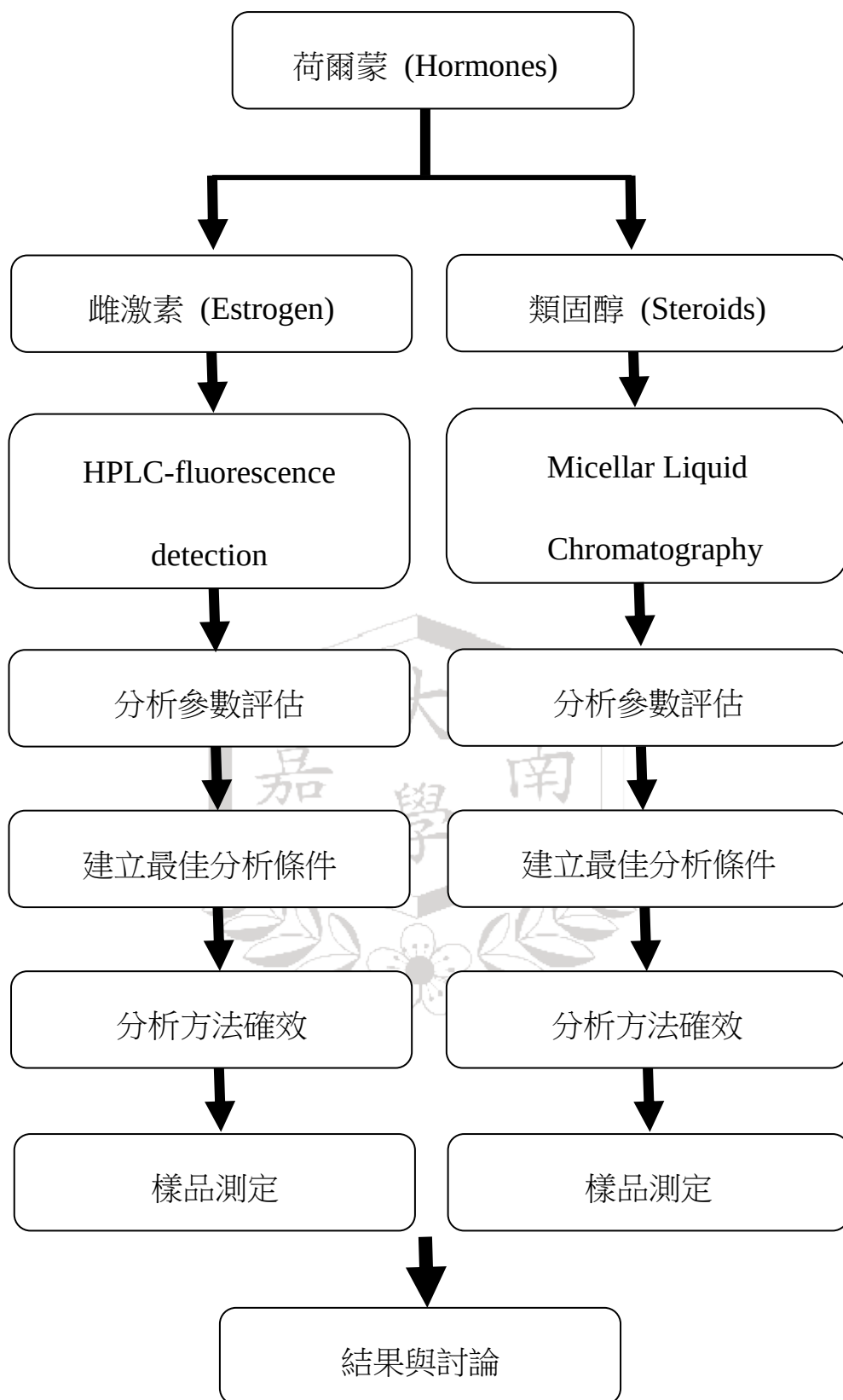


圖1.1 研究架構圖

1.3 文獻回顧

1.3.1 雌激素

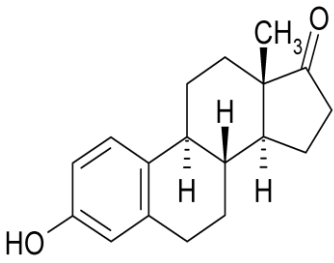
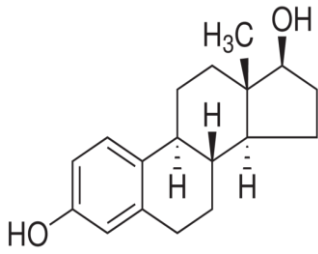
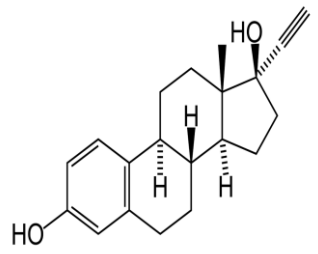
雌激素(Estrogen)由卵巢分泌，屬於一種促進生長、增生的荷爾蒙[1]，主要可分為天然(natural/endoestrogens)和合成(synthetic/exoestrogens) [14, 15]。天然雌激素包括了動物性雌激素和植物性雌激素(phytoestrogens)兩種，動物性雌激素有雌酮(Estrone, E_1)、雌二醇(Estradiol, E_2)及雌三醇(Estriol, E_3)及結合態雌激素(Conjugated estrogens)等；植物性雌激素來源相當廣泛如大豆、苜蓿及花生等豆科(Leguminosae)植物中。化學合成雌激素主要為乙炔基雌二醇(Ethinyl estradiol, EE_2)和炔雌醇甲醚(Mestranol, $MeEE_2$)在醫學上做為口服避孕藥劑或使用在一些醫療用途上，如停經、乳癌及前列腺癌等病症治療[10, 16, 17]。

雌激素為女性荷爾蒙中維持健康的生殖組織功能，對於乳房、皮膚和腦是非常重要的[17]，主要由卵巢和胎盤產生，少量由肝、腎上腺皮質及乳房分泌，男性的睪丸也可分泌少量雌激素，並刺激第二性徵出現；本研究中雌激素之成分及其理化性質列於表1-1中。雌二醇(E_2)是女性生殖系統和維持骨頭密度最基本的雌激素，為體內作用最強之雌激素，在停經前卵巢是最主要的來源，它的分泌會影響人體許多功能，尤其在生殖方面的功能。一般未停經孕齡婦女以雌二醇的作用最大，體內濃度最高而濃度會

伴隨女性的月經週期而呈現週期性的循環[5, 18]。乙炔基雌二醇 (EE_2) 作為口服避孕藥劑，是口服藥中最具有活性的類固醇雌性激素之一，有時也使用在一些醫療用途上如停經、乳癌、生殖機能不全、經期不穩定和前列腺癌等病症治療方面[19]。在醫療上常被用來調整女性經期、口服避孕藥之成分及治療更年期時體內雌激素之缺乏，目前美國約有40%更年期婦女服用雌激素替代藥物[12, 20]。

因自然老化、日曬或更年期雌激素的減少而皮膚老化，使皮膚變薄、彈性纖維和膠原蛋白減少，造成乾澀、黑色素容易沉澱而產生斑點等；而雌激素可增進皮膚的彈性及緊實度、淡化細紋及皺紋、促進乳房細胞的生長及膠原蛋白生成作用等，因此添加荷爾蒙物質於化粧品中越來越受到重視，常透過塗抹、注射及口服等方式來補充女性荷爾蒙，使用低劑量雌激素即可影響皮脂分泌量，因此常添加於化粧品中來達到改善掉髮及滋養頭皮的情形，但長期使用含雌激素的化粧品會導致色素沉澱、產生黑斑、皮膚萎縮變薄，甚至具有致癌性，引發細胞癌、卵巢癌及乳腺癌等疾病，因此化粧品安全性已經受到廣大消費者所關注的問題[21-23]。

表1.1 雌激素之理化性質

Estrogens ^a	E ₁	E ₂	EE ₂
結構			
IUPAC name	3-hydroxyestra-1,3,5(10)-triene-17-one	(17β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol	19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol
CAS Number	53-16-7	50-28-2	57-63-6
分子式	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
分子量	270.4 g/mol	272.38 g/mol	296.40 g/mol
熔點	254.5-256°C	176-180°C	182-183°C
外觀	白色粉末	白色粉末	白色結晶性粉末
溶解度 ^b	溶於乙醇、丙酮、二氧六環、苯、氯仿、氫氧化鹼溶液，微溶於乙醚和植物油，幾乎不溶於水	溶於乙醇、丙酮、二氧六環、苯、氯仿、氫氧化鹼溶液，微溶於乙醚和植物油，幾乎不溶於水	溶於乙醇、丙酮、二氧六環、苯、氯仿、氫氧化鹼溶液，微溶於乙醚和植物油，幾乎不溶於水

^a Estrone(E₁), Estradiol(E₂), Ethinyl estradiol (EE₂)

^b Martha Windholz, The Merck Index (1976)

1.3.1.1 分析雌激素之相關研究

現今對於分析雌激素已有許多研究文獻且開發不少分析技術針對環境水樣、懷孕婦女尿液、動物糞便和人體及動物體血液和血漿等偵測其雌激素含量[2, 5, 7, 19, 24]。主要使用的分析方法有氣相層析儀連接質譜儀(GC-MS)、高效能液相層析儀連接電化學偵測器(HPLC-ECD)、高效能液相層析儀連接紫外/可見光偵測器 (HPLC-UV)、高效能液相層析儀連接螢光偵測器 (HPLC-FL)及高效能液相層析儀連接質譜儀(HPLC-MS) [7, 11] 如表 1-2 所示，而應用於化粧品中雌激素甚少有深入之研究。

雖然 GC 靈敏度且專一性高已被廣泛使用，但在許多文獻中提到有些分析物質會有不安定及極性等問題，必須透過一些衍生化方式及使用不同衍生化試劑反應成低沸點、高揮發度、低極性與熱穩定的衍生物或者使分析物接上螢光團增加分析靈敏度以利於分析，但對於配方較為複雜之化粧品產品如乳霜類，在實務上也不大選擇氣相層析來分析；相較之下 LC 設備簡單、操作儀器較方便，適用於分析非揮發性或熱不穩定性之物質且不需經過衍生化繁瑣的步驟；使用上以 HPLC-UV 分析方法最為普遍，但 HPLC-FL 靈敏度會比 HPLC-UV 好三個級數，最低極限可達 1-100 ppb，而紫外/可見光只能達到 ppm 級。螢光分析的最大特點是選擇性強且具有較高的靈敏度，而且可通過激發光譜(Excitation spectrum)及放射光譜

(Emission spectrum)兩次波長的選擇比紫外/可見分光更強選擇性、提高感度以及降低方法之偵測極限[25-27]。本研究中為了建立較簡單且提高感度之分析方法並能應用於化粧品中，因此以高效能液相層析儀連接靈敏度較高的螢光偵測器(HPLC-FL)來分析雌激素。

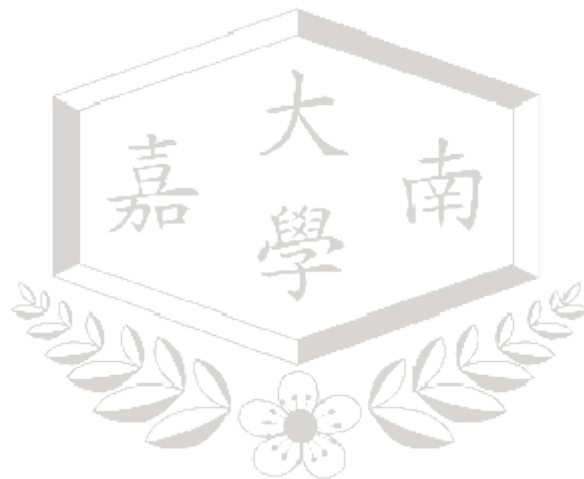


表1.2 分析雌激素(Estrogens)之相關研究

分析方法	分析物 ^a	樣品	參考文獻
GC/MS	E ₁ , E ₂	human hair	[28]
LC-chemiluminescence	E ₂	plasma	[29]
LC/MS, GC/MS	E ₁ , E ₂ , EE ₂	river water	[30]
LC-FL	E ₂ , EE ₂ , BPA	drinking water	[31]
LC-FL	E ₁ , E ₂ , E ₃ , EE ₂ , BPA, NP	human urine	[32]
GC/MS	E ₁ , E ₂ , EE ₂ , E ₃ , mestranol	water	[33]
GC/MS	E ₂ , PTBP, 4tOP, BPA	urine, water	[34]
LC-UV	E ₁ , E ₂ , E ₃	water	[24]

^a Estrone(E₁)、Estradiol(E₂)、Ethinyl estradiol (EE₂)、Estril (E₃)、Bisphenol A(BPA)、4-Nonylphenol(NP)、4-tert-butylphenol(PTBP)、4-tert-octylphenol(4tOP)、Mestranol MeEE₂)

1.3.2 類固醇

「類固醇」(Steroids)又稱「腎上腺皮質固醇」(Corticosteroids)，存在人體內腎上腺(adrenal gland)、睪丸(testis)、卵巢(ovary)中並於正常情況下所分泌的一種荷爾蒙，有抗發炎及調節新陳代謝等作用，因此被廣泛用於治療哮喘和關節炎等症狀[35]。

人體中腎上腺皮質所分泌「腎上腺皮質素」可區分三類(1)糖皮質類固醇(glucocorticoids)：維持血壓及心臟血管功能，減緩免疫發炎反應；(2)礦物皮質類固醇(mineralocorticoids)：調節鹽和水分的代謝；(3)雄性素(androgens)：在男性體內主要維持第二性徵的發育。

類固醇在體內扮演很重要的角色，多半是指糖皮質類固醇(glucocorticoids)，腎上腺產生如情緒、運動、手術、疾病或飢餓等壓力[17]或人工合成的類似物[36]；最初用於治療腎上腺功能不全，至現今已有許多化學合成藥物供臨床應用[37]。類固醇除了根據我們的生理需求，適當調節醣類與鹽份的代謝來維持體內正常生理運作外，還可衍生為各種不同的性荷爾蒙來促使男女不同性徵的表現，是維持生命不可或缺的重要荷爾蒙，在醫學上被廣泛用於抗炎藥物[36, 38, 39]，臨床上也被應用於治療許多炎症、過敏及腎上腺皮質功能不全相關的疾病並且預防不良免疫反應[40-42]。

因此，本研究同時分析常見違法添加於化粧品中的荷爾蒙物質-類固醇之分析方法開發，普賴松(Prednisone，PS)、氫皮質酮(Hydrocortisone，HYD)、地塞米松(Dexamethasone，DEX) 和普力多寧(Prednisolone，PL) 及其理化性質如表1.3所示。

(a) 分析類固醇之相關研究

文獻中已有許多分析類固醇之方法，主要以高效能液相層析儀連接紫外/可見光偵測器(HPLC-UV)、高效能液相層析儀連接螢光偵測器(HPLC-FL)、高效能液相層析儀連接質譜儀(HPLC-MS)及微胞液相層析(MLC)等分析方法如表1.4所示。

而化粧品原料種類繁多，許多配方中主要以許多油脂類、蠟類所組成，若使用傳統逆相層析方式，在樣品進樣前需經繁瑣的前處理步驟且使用大量有機溶劑；近年來，因微胞液相層析(Micellar Liquid Chromatography，MLC)的興起已取代傳統液相層析法的另一種方式，MLC有許多的優點如低成本、低毒性、揮發性低、可使用直接管柱注射法分析生理性流體樣品、同時分離帶電和不帶電的溶質、用等度沖提就有梯度沖提的效果、避免前處理的損失及安全性等優點[43, 44]。

表1.3 類固醇之理化性質

Steroids ^a	DEX	HYD	PL	PS
結構				
IUPAC name	9-Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one	4-Pregnene-11-beta,17-alpha,21-triol-3,20-dione	(11β)-11,17,21-trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione	17,21-dihydroxypregna-1,4-diene-3,11,20-trione
CAS Number	50-02-2	50-23-7	50-24-8	53-03-2
分子式	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
分子量	392.47 g/mol	362.47 g/mol	360.44 g/mol	358.43 g/mol
熔點	260°C	213-215°C	240°C	236-238°C
外觀	White powder	White powder	White powder	White powder
溶解度 ^b	可溶於水、丙酮、乙醇及氯仿	極微溶於水、甲醇，丙酮、氯仿、丙二醇及醚，可溶於硫酸	可溶於甲醇及二氧六環，可溶於乙醇，氯仿，丙酮，極微溶於水	極微溶於水，可溶於醇類、氯仿，可微溶於甲醇及二氧六環

^aHydrocortisone(HYD), Dexamethasone(DEX), Prednisolone(PL), Prednisone(PS)

^b Martha Windholz, The Merck Index (1976)

表1.4 分析類固醇(Steroids)之相關研究

分析方法	分析物 ^a	樣品	參考文獻
LC	BM, DEX	plasma	[45]
LC, GC/MS	DEX	bovine, porcine, ovine liver, muscle	[46]
MLC	TRI, PS, CS, PL, CL, DEX, CT, DF, FL, FLA, BM, DOC, MPL, TRA	human urine	[47]
LC	DEX	human plasma	[48]
MLC	BMA, BD, DEX, FL, FL, HYD, TRI	creams, gels, ointments	[49]
LC-DAD/FL	IMP, PAR, DPR, VCM, AMK, FZ, CFZ, PL, DEX, FUR, KET	human urine	[50]
MLC	BM, DEX	tablets	[51]
LC-MS/MS	PL, HYD, BM, DEX, TRA	cream, emulsion, essence lotions	[52]
LC-MS ³	PL, CT, MPL	human urine	[53]

^a Triamcinolone(TRI)、Cortisone(CS)、Prednisolone(PL)、Dexamethasone (DEX)、Prednisone(PS)、Hydrocortisone(HYD)、Cortisol(CL)、Corticosterone(CT)、Deflazacort(DF)、Fludrocortisone(FL)、Fludrocortisone acetate(FLA)、betamethasone(BM)、Deoxy-corticosterone(DOC)、Methyl-prednisolone(MPL)、Triamcinolone acetonide(TRA)、Imipenem (IMP)、Paracetamol (PAR)、Dipyrrone (DPR)、Vancomycin (VCM)、Amikacin (AMK)、Fluconazole (FZ)、Cefazolin (CFZ)、Furosemide (FUR)、Ketoprofen (KET)、Beclomethasone(BMA)、Budenoside(BD)、Fluocinolone(FL)

(b) 微胞液相層析法

微胞液相層析(Micellar Liquid Chromatography, MLC)技術於 1980 年首次被提出並應用，是一種逆相液相層析 (Reversed-phase liquid chromatographic, RPLC)的模式，主要在移動相的組成中加入界面活性劑 (Surfactant)並且濃度需高於其臨界微胞濃度(Critical micellar concentration, CMC)時才會形成微胞如圖 1.2 所示，因有微胞的存在才會改變移動相的溶解能力，而產生不同的交互作用，影響分析物的滯留行為和選擇性 [54-56]。DeLuccia 等人研究證實可應用於生理樣品且直接分析如尿液、血清及血漿等[57]，不用經過特殊前處理步驟。

關於微胞液相層析的文獻中大多都應用在藥物的分析上，至今甚少應用於化粧品中。其中，有W. Thogchai 等人開發出操作簡單方便、快速並具有精密及準確性的方法，同時測定於化粧品產品中熊果素及對苯二酚，回收率介於95.5–99.0%，呈現良好的靈敏度[43]。

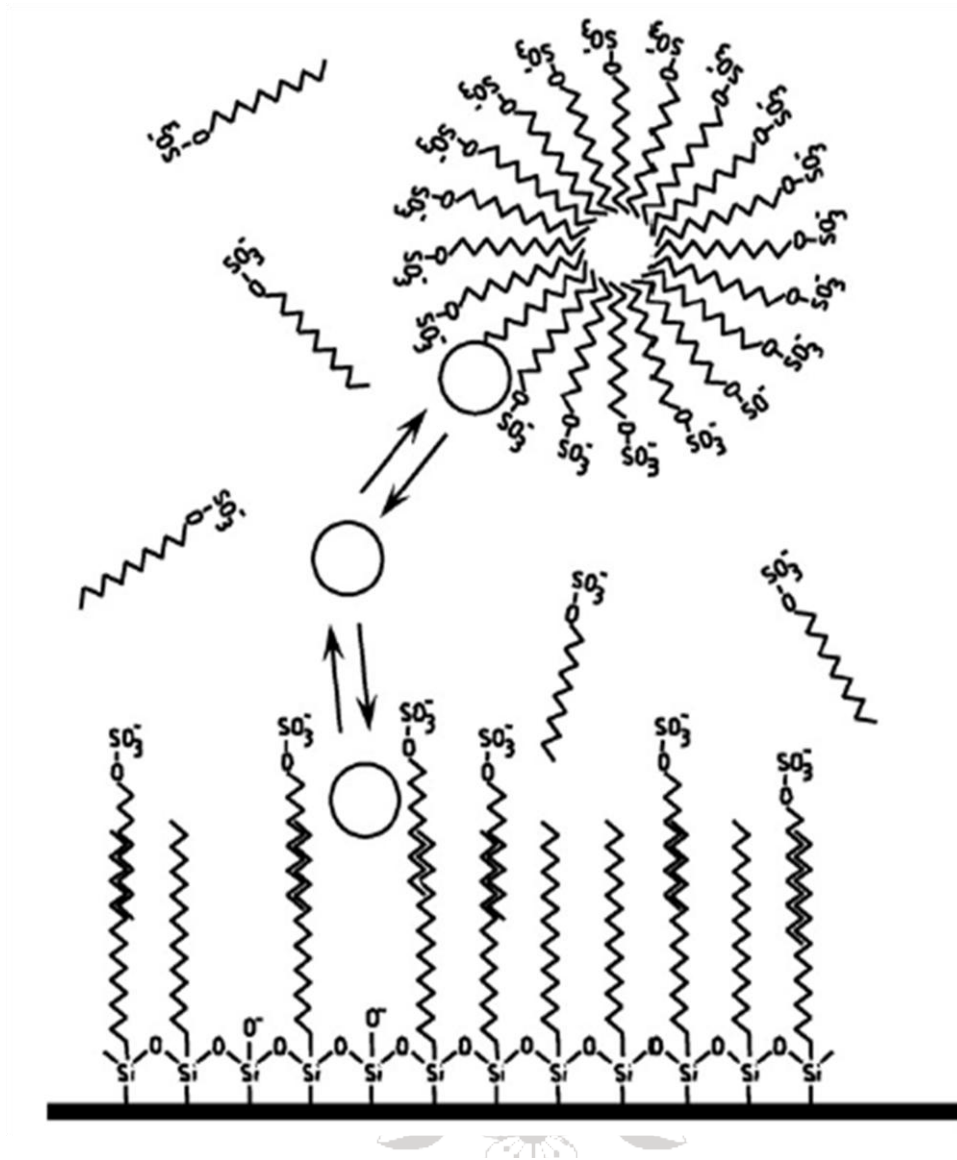


圖1.2 移動相中含SDS界面活性劑於C₁₈管柱中之作用機制

陰離子界面活性劑 SDS 的疏水端 C₁₂ 烷基鏈與 C₁₈ 結合於靜相鏈結上，因此修飾了靜相性質，SDS 親水性硫酸根在靜相外緣產生帶負電荷的親水層而影響分析物進入鏈結的深度，進而產生不同交互作用且影響分析物滯留時間及其分離程度

界面活性劑應用於化粧品配方有清潔、起泡、溶解、乳化、潤滑、懸浮及分散等目的，分為陽離子型、陰離子型、非離子型及兩性離子型界面活性劑四種類型，表1-5為MLC中常使用的界面活性劑，使用最廣泛為十二烷基硫酸鈉(SDS)屬陰離子，另外有聚氧乙烯月桂醚(Brij-35)屬中性、溴化十六烷三甲基銨(CTAB)屬陽離子以及triton X-100 屬非離子型。界面活性劑會吸附於靜相而影響分析物在液相層析之滯留，造成許多靜相表面的性質變化，因此界面活性劑吸附於靜相的量會影響到分析物的滯留行為及層析效率。文獻指出在微胞層析中加入有機修飾劑會改變微胞性質且結合至靜相也會改變其結構和性質，因此改變分析物的時間，減少滯留因子[58]。當界面活性劑吸附在靜相表面而修飾了靜相性質，SDS的疏水性C₁₂烷基鏈和逆相管柱C₁₈碳之間結合在靜相鏈結的C₁₈烷基鏈上。SDS親水性硫酸根朝向靜相表面外，因此在靜相外緣產生帶負電荷的親水層而影響溶質穿透入鍵結相的深度[59, 60]。

表1.5 MLC常使用的界面活性劑及其特性^[44]

類型	名稱 ^a	分子式	分子量 (g/mol)	CMC (mM)
陰離子型	SDS	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	288.38	8.1 ^[44]
陽離子型	CTAB	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$	364.5	0.83 ^[44]
	CTAC	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{ClN}$	319.99	1.58 ^[61]
	DTAB	$\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{BrN}$	308.34	14 ^[62]
非離子型	Brij 35	$\text{C}_{58}\text{H}_{118}\text{O}_{24}$	1199.54	0.06 ^[44]
	Triton X-100	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$	646.86	0.3 ^[44]
兩性	SB-12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$	335.55	3.0 ^[63]
	CHAPS	$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{SO}_7$	614.9	6.41 ^[64]

^a Sodium dodecyl sulfate(SDS)、Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)、Cetyl trimethylammonium chloride (CTAC)、Dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB)、Polyoxyethylene (23) dodecanol (Brij 35)、p-Octylbenzene polyoxyethylene 9.5 alcohol (Triton X-100)、N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB-12)、3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)

第二章 以高效能液相層析連接螢光偵測器分析化粧品中雌激素

依目前衛生福利部公告允許添加於化粧品之荷爾蒙物質，使用高效能液相層析連接螢光偵測器分析化粧品中的雌激素，建立分析方法之開發，以提高敏感度且降低偵測極限並應用於市售化粧品中。

2.1 實驗藥品與設備

實驗所使用的二次水，其比阻抗值均大於 17 MΩ-cm以上。

2.1.1 實驗藥品

實驗所用之藥品及溶劑列表如下；

名稱	化學式	廠牌	等級
Estrone	$C_{18}H_{22}O_2$	SIGMA-ALDRICH	≥99%
Estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	TCI, Japan	>97.0%
Ethinyl estradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	SIGMA-ALDRICH	≥98%
Methanol	CH_3OH	J. T. Baker	HPLC級
Acetonitrile	CH_3CN	J. T. Baker	HPLC級

2.1.2 儀器設備

實驗中所使用儀器設備名稱、規格及廠牌列表如下：

名稱	規格或型號	廠牌
精密分析天秤	XS 225A	Precisa
超音波振盪器	BRANSON 3210	USA
高效能液相層析儀	L-7100	Hitachi , Japan
紫外/可見光譜儀	U-2900	Hitachi , Japan
紫外/可見光偵測器	UV-VIS L-7420	Hitachi , Japan
螢光偵測器	L-7485	Hitachi , Japan
螢光光譜儀	LS-45	PerkinElmer , USA
層析管柱	Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm) Phenomenex Luna C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm)	

2.2 實驗方法

(a) 波長選擇

本研究雌激素之標準溶液皆配置於甲醇中，先從紫外/可見光譜儀偵測 190-590 nm 波長範圍中尋找最佳激發波長(Excitation)，以此作為層析分析時激發波長；再利用螢光光譜儀固定激發光的波長，設定所發射不同波長的螢光強度即為放射(Emission)光譜圖。

(b) 雌激素標準品溶液配製

精秤各取E₂、EE₂ 標準品0.01 g 於10 ml 燒杯中並以甲醇溶解定量至10 ml 定量瓶其為1000 µg/ml 最高儲備溶液，再各取0.1 ml以甲醇定量至10 ml定量瓶其為10 µg/ml 中間儲備溶液，依序往下配置0.05 µg/ml、0.1 µg/ml、0.2 µg/ml、0.5 µg/ml、1 µg/ml 之檢量線濃度範圍，並以HPLC-FL分析。

(c) 品管檢測配製

等同檢量線配製方法，重新配置最高儲備溶液再以中間儲備溶液配置濃度0.2 µg/ml、0.5 µg/ml 濃度並以HPLC-FL分析。

(d) 自製樣品配製及前處理

自製精華液及乳液兩種劑型之樣品，自行添加0.002%雌激素於配方中，配方成分如表2-1所示；將配製好的精華液及乳液中分別均勻取樣 0.1 g 以甲醇均勻溶解後定量並於超音波震盪，再經濾膜過濾後即可測定樣品添加回收率及計算準確度。

(e) 市售樣品前處理

挑選兩種劑型之市售樣品且產品皆標示添加雌激素成份，從市售樣品一與二均勻取樣 0.1 g 以甲醇均勻溶解定量並於超音波震盪，再經濾膜過濾並以HPLC-FL分析其含量及測定添加回收率。

表2.1 自製樣品配方表

	A 相		B 相	
		%		%
精華液 ^a	Xanthan gum	0.2	E ₂	0.002
	Germaben II	0.6	EE ₂	0.002
	EDTA-2Na	0.1	Tween20	1
	Water	To 100		
	A 相		B 相	
		%		%
乳液 ^b	Tween 60	2	Carbopol	0.3
	Tween 20	2	Water	To 100
	Span 80	2		
	Squalane	1.5		
	Mineral oil	1.5		
	Germaben II	0.6		
	Dimethicone	1		
	Capric triglyceride	1.5		
	C 相			
		%		%
	Estrogens/Steroids	0.002/0.5	TEA	2~3 滴

^a 將 A、B 相原料分別各秤於燒杯中，但 B 相會中加些許水去攪拌，兩相分別均勻完全再將 B 相加入 A 相中均勻攪拌後，補水重量即可

^b 將 A、B 相原料分別各秤於燒杯中，B 相加一半水先攪拌均勻後，再將 A 相慢慢滴入 B 相中持續攪拌溶解後，再補水加入 C 相即可

2.3 分析參數評估

(a) 有機修飾劑

本研究分析雌激素之成分，探討移動相中有機修飾劑種類及比例對於雌激素之改變，並分別以滯留時間(retention time)及解析度(resolution)對有機修飾劑比例作圖，尋找最適合有機修飾劑比例並以高效能液相層析儀連接螢光偵測器(HPLC-fluorescence detection, HPLC-FL)偵測雌激素含量，研究所使用層析管柱為Phenomenex Luna C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm)，流速為1.0 mL/min，偵測器波長為Ex=280 nm、Em=310 nm，注射量為20 μL。

(b) 感度比較

配製雌激素E₂、EE₂ 1 μg/ml 標準溶液皆溶於甲醇，以高效能液相層析儀分別連接FL與UV偵測器偵測雌激素比較兩者感度靈敏的差異性。研究所使用層析管柱為Phenomenex Luna C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm)，FL偵測器波長為Ex=280 nm、Em=310 nm，UV偵測器波長為280 nm，流速為1.0 mL/min，注射量為20 μL。

2.4 計算並分析結果

(1) 精準度(precision)

配置不同濃度之標準溶液，於同一天及異日間注入 HPLC 分析，皆連續注入三次，並記錄各濃度之峰面積並計算其平均值(Mean)與標準偏差(S.D)及相對標準偏差(R.S.D)，可評估分析所測定之重複性和再現性。

(2) 準確度(accuracy)

以測定添加回收率(spike recovery)之方法，在已知濃度之樣品中加入等量濃度標準溶液，並分析後所得測定量除以添加已知濃度即為回收率，可表示本研究之分析方法確實能測得分析物之正確濃度。

(3) 解析度(resolution, Rs)

依分析所得結果，以每一個成份的解析度(與最鄰近的層析峰之分離度表示)進行評估。

解析度(Rs)的計算公式為：

$$Rs = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

t_{R1} 、 t_{R2} ：相鄰成分間層析峰的滯留時間

W_1 、 W_2 ：相鄰成分層析峰的峰寬

(4) 最低偵測極限 (limit of detection, LOD)

最低可偵測濃度代表本研究所儀器之分析到偵測極限，依本研究建立之分析方法，利用HPLC重覆測定分析物最低濃度並算出標準偏差值(S.D)代入重新測得低濃度之標準曲線公式即可得到偵測極限濃度，當波峰面積與雜訊面積(Signal to noise ratio, S/N)之比值為3，其作為最低偵測濃度之估計值。

2.5 結果與討論

2.5.1 螢光光譜圖

圖2.1為使用紫外/可見光譜儀偵測雌激素之UV圖譜，以280 nm 吸收波長作為螢光偵測器的激發波長(Excitation wavelength, Ex)，使用螢光光譜儀固定激發光Ex=280 nm掃描螢光之放射波長(Emission wavelength, Em)圖譜，於Em=310 nm得到最佳放射波長 如圖2.2所示，因此選擇Ex=280 nm、Em=310 nm 做為分析雌激素之HPLC-FL最佳波長條件。

從螢光光譜圖譜中可明顯看到雌激素中雌酮(E₁)的螢光放射效果與雌二醇(E₂)、乙炔基雌二醇(EE₂)相比太低，且同時分析時感度差落差會太大。因此後續的研究參數評估中未將雌酮(E₁)加入同時分析及探討。

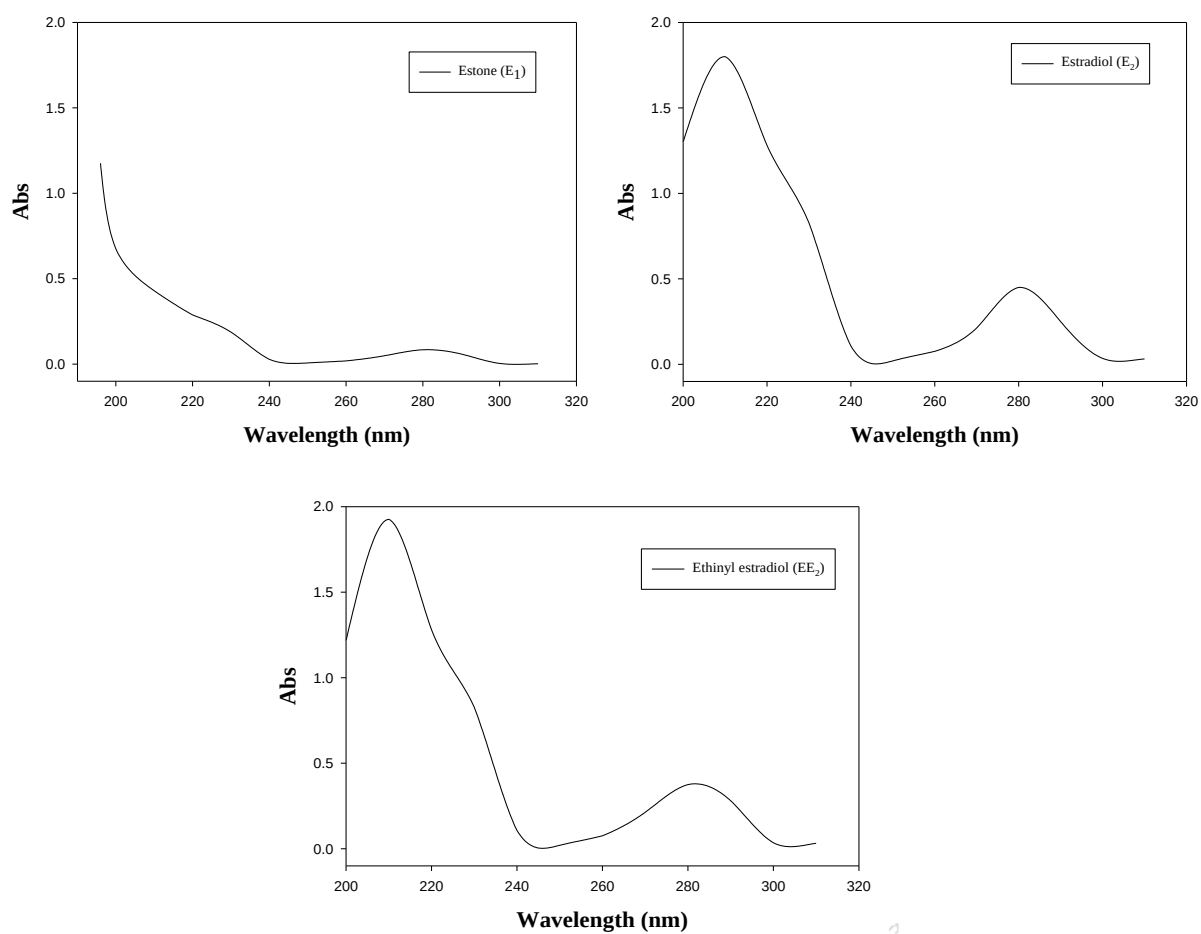


圖2.1 雌激素UV 光譜圖

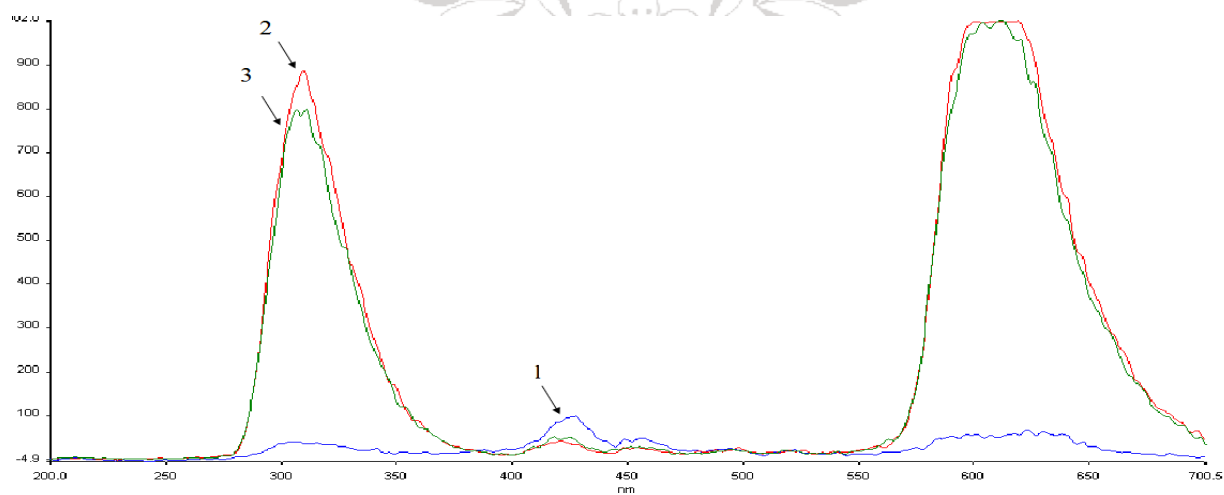


圖2.2 雌激素螢光放射光譜圖($E_x=280\text{ nm}$)

1:雌酮(E₁)、2:雌二醇(E₂)、3:乙炔基雌二醇(EE₂)

2.5.2 分析雌激素參數探討

(a) 不同有機修飾劑及比例之影響

本研究中所使用管柱為 Phenomenex Luna C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm)，流速 1.0 mL/min，注射量 20 μl，螢光偵測波長 Ex=280 nm、Em=310 nm，分別將滯留時間及解析度對有機修飾劑比例作圖；圖 2.3 和 2.4 為改變移動相有機修飾劑的比例之滯留時間及層析圖譜，由結果得知滯留時間皆會隨使用有機修飾劑比例降低而延後，改變有機修飾劑所得到之解析度(resolution)，依 2.4 解析度計算公式所得到的數值表示兩個相鄰分析物之層析峰的分離程度，改變甲醇比例之解析度皆在 0.8 以下，分離效果不好，鄰峰之間皆無法達到分離；而乙腈會隨著比例降低而解析度會增加，分離效果明顯就比甲醇好，在 50%乙腈解析度已大於 1.5 即表示達到基線分離，因此考慮滯留時間及解析度，最後選擇乙腈：水=50：50 做為移動相最佳條件。

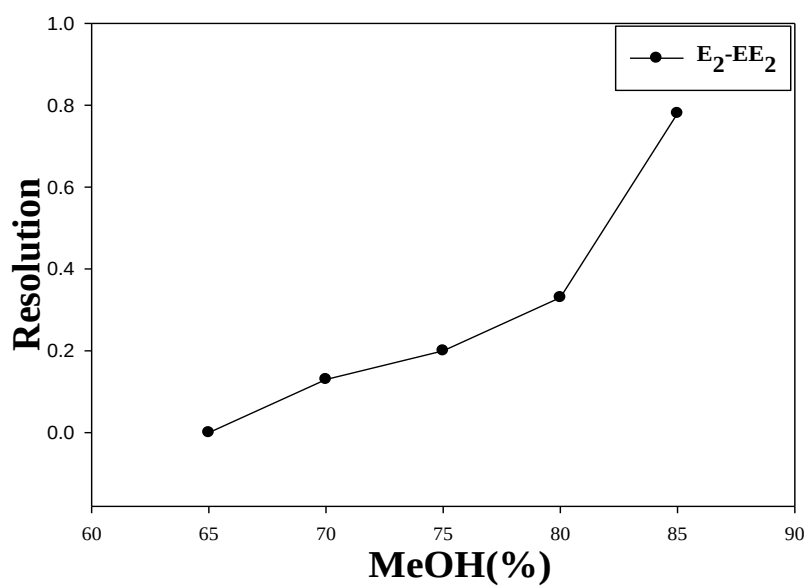
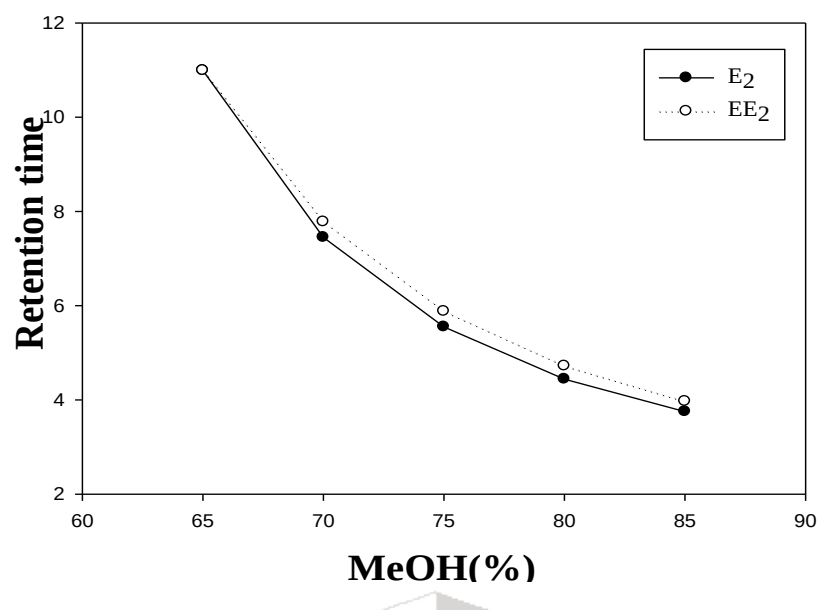


圖2.3 改變甲醇比例之滯留時間及解析度

HPLC-FL 分析條件如同 2.3 (a)

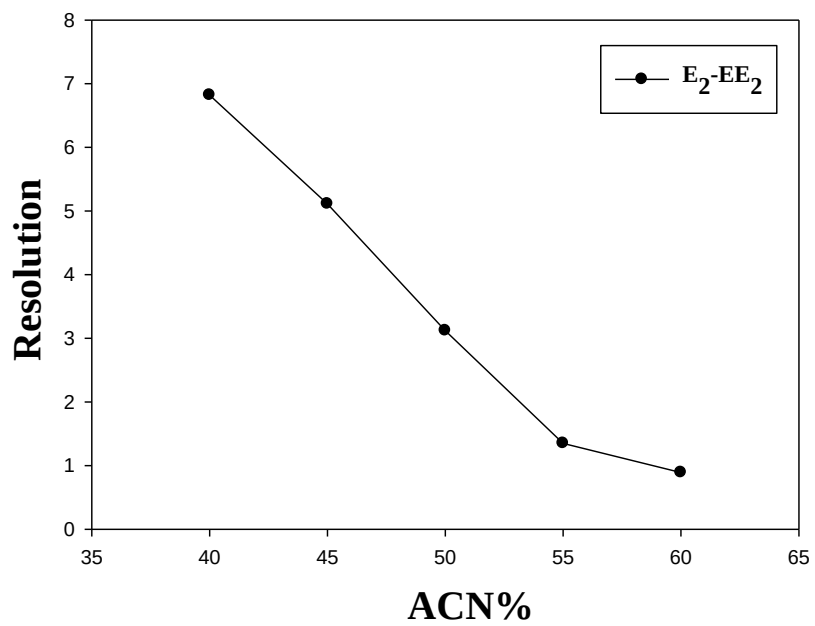
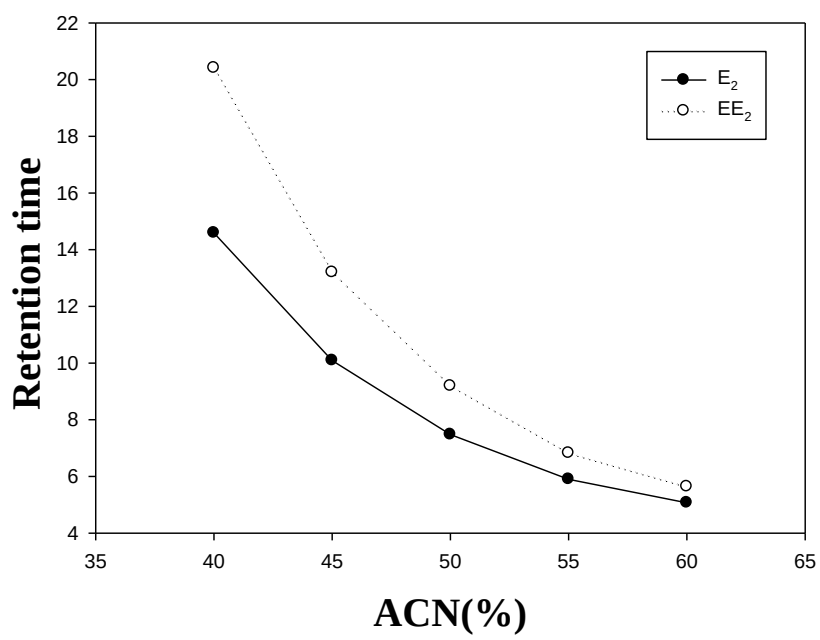


圖2.4 改變乙腈比例之滯留時間及解析度

HPLC-FL 分析條件如同 2.3 (a)

(b) UV 與 FL 感度比較

配製雌激素 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 濃度以高效能液相層析儀分別使用螢光偵測器(FL)及紫外/可見光偵測器(UV)比較兩者間之感度，圖2.5為雌激素於兩者偵測器之層析圖譜，於兩者偵測器之最低偵測極限如表2.2所示，可明顯看出兩者感度上有極大之差異。

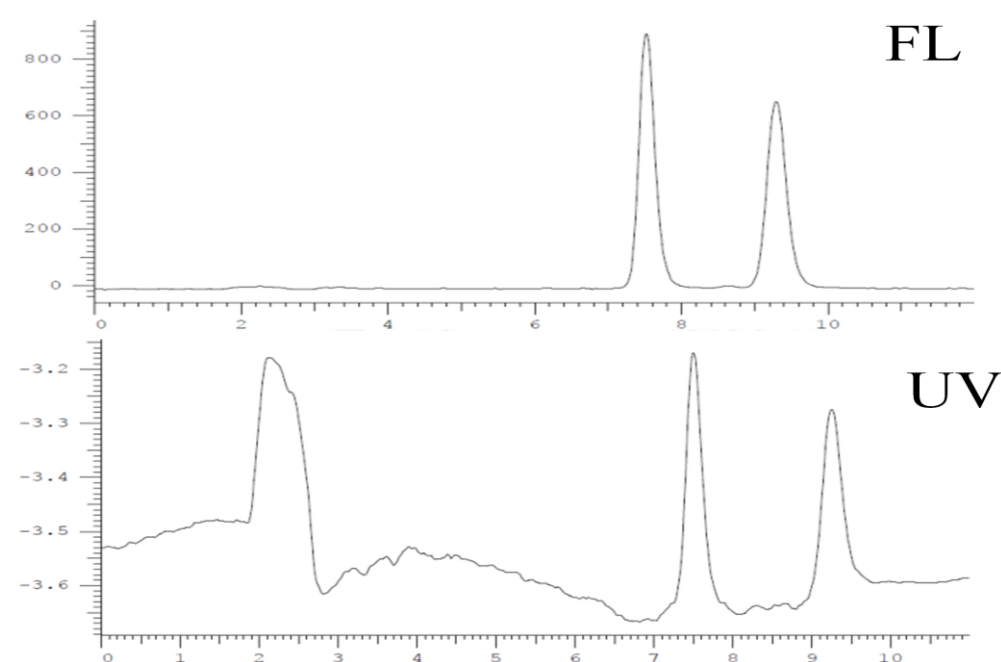


圖2.5 比較雌激素UV-FL感度及層析圖譜

移動相為乙腈：水=50：50，流速為 1.0 mL/min ，注射量為 $20\text{ }\mu\text{l}$ ，FL 偵測波長為 $E_x=280\text{ nm}$ 、 $E_m=310\text{ nm}$ ，UV 偵測波長為 280 nm ，層析管柱為 Phenomenex Luna C_{18} ($250 \times 4.6\text{ mm}$ ， $5\text{ }\mu\text{m}$)

2.5.3 雌激素之檢量線

圖 2.6 為雌激素之層析圖譜，將雌激素配製 0.05~1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度範圍且每個濃度均重覆注射三次，即所得濃度之峰面積平均值，並以濃度對峰面積作檢量線並求得線性方程式與相關係數，表 2.3 為其檢量線濃度範圍、線性關係(R^2)及偵測極限(LOD)結果呈現皆具有良好的線性關係($R^2=0.9999$)， E_2 偵測極限為 3.82 ppb， EE_2 為 3.51 ppb。

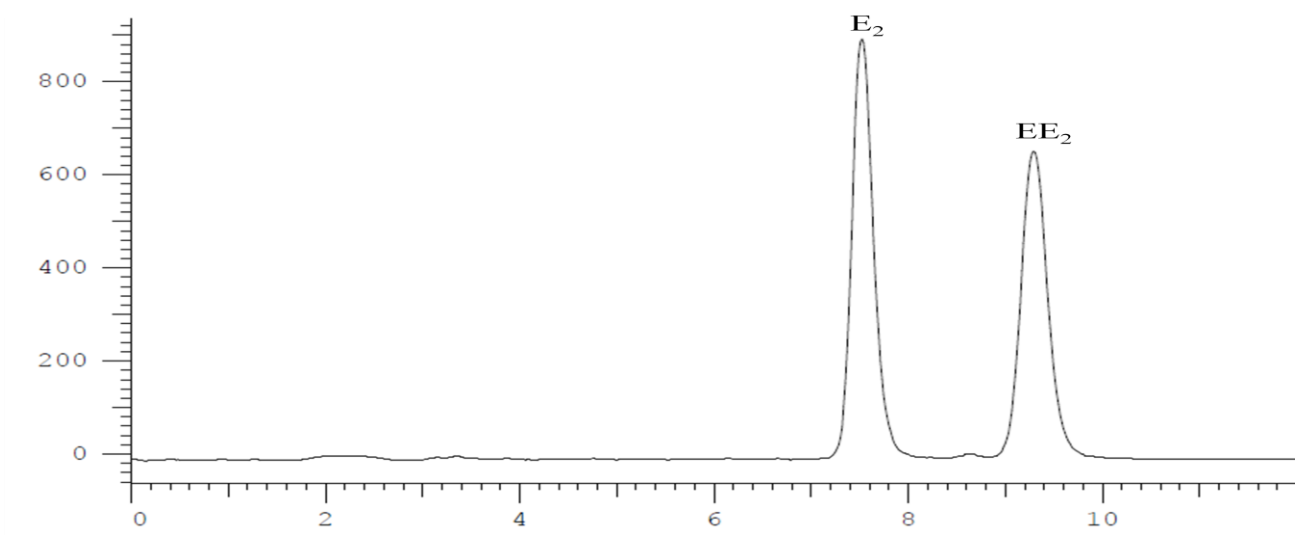


圖2.6 雌激素之層析圖譜

E_2 :雌二醇、 EE_2 :乙炔基雌二醇，移動相為乙腈:水=50:50，流速為 1.0 mL/min，注射量為 20 μl ，FL 偵測波長為 $E_x=280\text{ nm}$ 、 $E_m=310\text{ nm}$ ，層析管柱為 Phenomenex Luna C_{18} (250 $\times$ 4.6 mm，5 μm)

2.5.4 分析方法確效

表 2.3 為配製不同濃度之雌激素標準溶液於進行同日內與異日間分析，計算各濃度之平均值(Mean)與標準偏差(S.D)及相對標準偏差(R.S.D)。精密度結果如表 3.3 所示， E_2 同日內之 R.S.D 介於 0.01%~0.33%、異日間之 R.S.D 介於 0.02%~0.32%， EE_2 同日內之 R.S.D 介於 0.02%~0.32%、異日間之 R.S.D 介於 0.03%~0.27%，均低於 5%，可顯示出本研究分析方法精密度良好。

表 2.4 為分析自製樣品及添加回收率，準確度則以添加回收率(spike recovery)方式作評估，加入等量已知濃度的 E_2 及 EE_2 標準溶液於自製樣品中，並以本研究中開發之分析方法測定其濃度，將所得結果除以加入已知濃度，求得添加回收率(%)及相對標準偏差(R.S.D)；分析結果得知自製樣品回收率 E_2 介於 97.67~98.96%、 E_2 介於 97.31~99.75%； E_2 的 R.S.D 介於 1.86~2.34%、 EE_2 的 R.S.D 於 0.11~2.18%，由結果可知本研究之分析方法準確度良好。

2.5.5 市售樣品測定

表2.5為分析市售樣品之含量及添加回收率，將含有標示雌激素 E_2 含量經過2.4.5前處理之步驟，分析結果樣品一回收率97.31%、R.S.D為2.23%，樣品二回收率99.52%、R.S.D為1.39%；測定結果市售樣品一及二均含有符合標示之Estradiol (E_2)含量。

表2.2 比較紫外/可見光偵測器(UV)及螢光偵測器(FL)感度

Estrogen*	UV (LOD)	FL (LOD)	UV (peak area)	FL (peak area)
E ₂	0.43 µg/mL	3.82 ng/mL	6566	13388301
EE ₂	0.31 µg/mL	3.51 ng/mL	5268	12089878

* E₂：雌二醇，EE₂：乙炔基雌二醇；E₂及 EE₂配製濃度為 1 µg/ml 皆溶於甲醇

表2.3 雌激素之檢量線濃度範圍、線性關係(R²)及偵測極限(LOD)

Estrogen	濃度範圍	R ²	LOD(ng/mL)
E ₂	0.05~1 µg/ml	0.9999	3.82
EE ₂		0.9999	3.51

表2.4 雌激素於同日間及異日間之標準偏差

Estrogen	Concentration (µg/mL)	Mean±S.D(%)		R.S.D(%)	
		Intraday*	Interday**	Intraday*	Interday**
Estradiol	0.05	0.05±1.53	0.05±3.27	0.29	0.63
	0.1	0.11±3.47	0.10±0.39	0.33	0.04
	0.2	0.20±0.13	0.19±5.23	0.01	0.27
	0.5	0.50±1.55	0.48±6.55	0.03	0.14
	1	1.01±0.62	0.98±5.10	0.01	0.05
Ethinyl estradiol	0.05	0.05±1.64	0.05±3.27	0.32	0.25
	0.1	0.10±2.38	0.10±1.74	0.24	0.17
	0.2	0.20±2.03	0.20±5.36	0.10	0.27
	0.5	0.50±1.55	0.49±5.36	0.02	0.11
	1	1.01±0.62	1.00±3.12	0.03	0.03

*n=3, 在同一天連續注入分析，每一濃度各進行三重覆

**n=9, 在不同三天連續注入分析，每一濃度各進行三重覆

表2.5 分析自製樣品及添加回收率

	Estrogen	配製量 (%)	Mean±S.D	添加量 (%)	Recovery (%)	R.S.D (%)
精華液	E ₂	0.002	0.0019±1.2	0.002	98.96	1.86
	EE ₂	0.002	0.0018±2.4	0.002	97.31	2.18
乳液	E ₂	0.002	0.0018±0.4	0.002	97.67	2.34
	EE ₂	0.002	0.0019±1.4	0.002	99.75	0.11

表2.6 分析自製樣品及添加回收率

	Estrogen	標示量 (%)	Mean±S.D	添加量 (%)	Recovery (%)	R.S.D (%)
樣品一	E ₂	0.002	0.0019±3.5	0.002	97.31	2.23
	EE ₂	-	-	-	-	-
樣品二	E ₂	0.001	0.001±2.1	0.001	99.52	1.39
	EE ₂	-	-	-	-	-

第三章 以微胞液相層析分析化粧品中類固醇

針對化粧品中未允許添加荷爾蒙物質，目前衛生福利部公告中常違法添加之類固醇成分結合微胞液相層析法同時分析做方法之開發，建立可快速檢測化粧品之方法。

3.1 實驗藥品與設備

實驗所使用的二次水，其比阻抗值均大於 17 MΩ-cm以上。

3.1.1 實驗藥品

實驗所用之藥品及溶劑列表如下；

名稱	化學式	廠牌	等級
Dexamethasone	$C_{22}H_{29}FO_5$	Alfa Aesar	98%
Hydrocortisone	$C_{21}H_{30}O_5$	Alfa Aesar	98%
Prednisolone	$C_{21}H_{28}O_5$	SIGMA-ALDRICH	≥99%
Prednisone	$C_{21}H_{26}O_5$	SIGMA-ALDRICH	≥98%
Sodium dodecyl sulfate	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2OOSOONa$	SIGMA-ALDRICH	≥98%
Methanol	CH_3OH	J. T. Baker	HPLC級
1-Pentanol	$CH_3(CH_2)_4OH$	Alfa Aesar	HPLC級
1-Butanol	$CH_3(CH_2)_3OH$	SIGMA-ALDRICH	99.5% (GC)
2-propanol	$(CH_3)_2CHOH$	TEDIA	HPLC級

3.1.2 儀器設備

實驗中所使用儀器設備名稱、規格及廠牌列表如下；

名稱	規格或型號	廠牌
精密分析天秤	XS 225A	Precisa
超音波振盪器	BRANSON 3210	USA
高效能液相層析儀	L-7100	Hitachi , Japan
紫外/可見光譜儀	U-2900	Hitachi , Japan
紫外/可見光偵測器	UV-VIS L-7420	Hitachi , Japan
管柱烘箱	Coolbox (Hipoint)	
層析管柱	Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm)	

3.2 類固醇配製方法

(a) 類固醇波長選擇

本研究中類固醇標準溶液皆配製於甲醇中，利用紫外/可見光譜儀測定 190-590 nm 波長範圍中尋找最佳吸收波長作為層析分析之波長條件。

(b) 類固醇標準品溶液配製

精秤各取HYD、DEX、PS及PL 標準品0.01 g 於10 ml 燒杯中並以甲醇溶解定量至10 ml 定量瓶其為1000 µg/ml 最高儲備溶液，再依序往下配置5

$\mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ 、 $50\ \mu\text{g/ml}$ 、 $100\ \mu\text{g/ml}$ 之檢量線濃度範圍，並以 HPLC 分析。

(c) 品管檢測配製

等同檢量線配製方法，重新配置最高儲備溶液後再往下配置 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $25\ \mu\text{g/ml}$ 濃度分析，並以 HPLC 分析。

(d) 自製樣品配製及前處理

自製精華液及乳液兩種劑型之樣品，配方中皆添加 0.5% HYD、DEX、PS 及 PL，配方成分如表 2-1 所示；將配製好的精華液及乳液中分別均勻取樣 $0.1\ \text{g}$ 以甲醇均勻溶解定量並於超音波震盪，再經濾膜過濾後即可測定樣品添加回收率及計算準確度。

(e) 市售樣品前處理

挑選兩種劑型之市售樣品中皆標示添加雌激素成份，分析其成分中是否有類固醇，從市售樣品一與二均勻取樣 $0.1\ \text{g}$ 以甲醇均勻溶解定量並於超音波震盪，再經濾膜過濾後，以 HPLC 分析其含量及測定添加回收率。

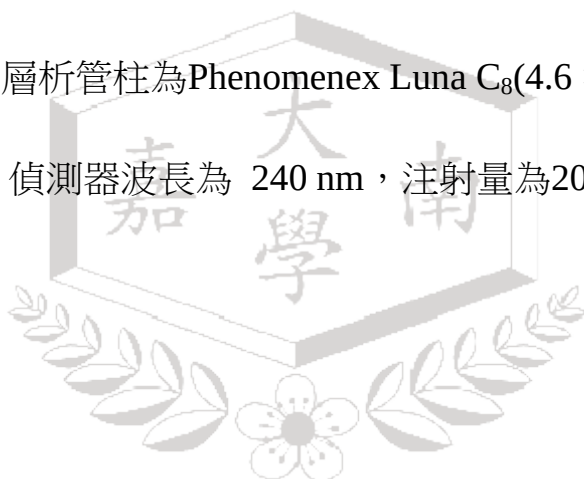
3.3 分析參數評估

本研究分析類固醇，以配製 SDS 不同濃度作為移動相，使用不同有機修飾劑種類及其比例並在不同溫度及流速做後續相關探討及評估。秤取 SDS

(MW=228.38) 於燒杯中，以二次水溶解均勻後於超音波震盪並定量。

在許多微胞液相層析相關文獻中會在移動相中添加有機修飾劑(organic modifiers)以加速分析物的沖提而降低分析物的滯留時間，也對分析物的分離效果有所改善，另外，改變溫度及流速也會影響分析物的分離效果；因此本研究在移動相添加異丙醇(iso-propyl alcohol)、丁醇(butanol)及戊醇(pentanol)來做探討；在不同溫度(室溫、40℃、50℃)及流速(0.5、0.8、1.0 mL/min)下做參數評估。

研究中所使用層析管柱為Phenomenex Luna C₈(4.6 × 250 mm, 5 μm)，流速為1.0 mL/min，偵測器波長為 240 nm，注射量為20 μL



3.4 結果與討論

3.4.1 類固醇 UV 光譜圖

圖 3.1 為使用紫外/可見光譜儀分析類固醇成分之 UV 圖譜，從圖譜中可看出，四個類固醇之成分皆於 239~241 nm 波長範圍中得到最強吸收波長，最後選擇 240 nm 作為同時分析四種類固醇成分之最適當吸收波長條件。

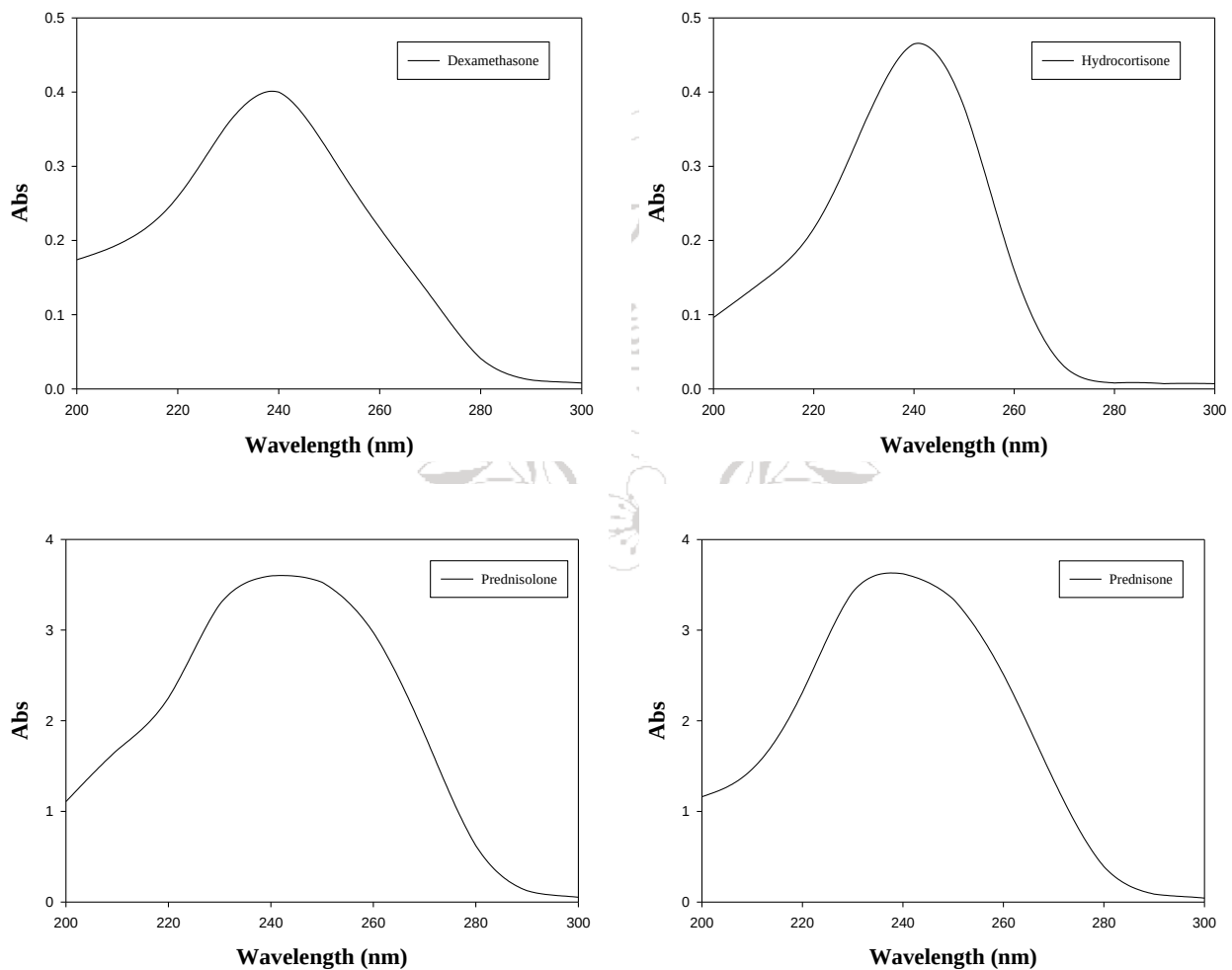


圖3.1 類固醇UV光譜圖

3.4.2 分析類固醇參數探討

結合微胞液相層析法，為了找尋分析最適合條件，因此在移動相中探討以下參數包括界面活性劑(SDS)的濃度、有機修飾劑種類及比例、溫度和流速，比較各參數之影響並建立本研究最適合之分析條件。

(a) SDS 濃度

移動相中本研究選擇使用最廣泛的界面活性劑SDS，並配製不同SDS濃度，因須超過其臨界微胞濃度($\text{SDS}=0.0082\text{M}$)，SDS濃度範圍則選擇從0.045至0.01M SDS來做探討；圖3.2為使用不同SDS濃度分析類固醇之滯留時間與解析度，從層析圖譜中可明顯看到改變SDS的濃度確實對於分離類固醇成分有所影響，研究中發現當SDS濃度越高，則會降低類固醇成分中HYD及PL間的解析度，且高過於0.01 M SDS 濃度時解析度皆在1.0 以下；研究結果顯示使用0.01M SDS 濃度時類固醇成分中HYD及PL 兩者間之解析度達到1.5以上，因此最後選擇0.01 M SDS 作為最適合之移動相溶液之濃度。

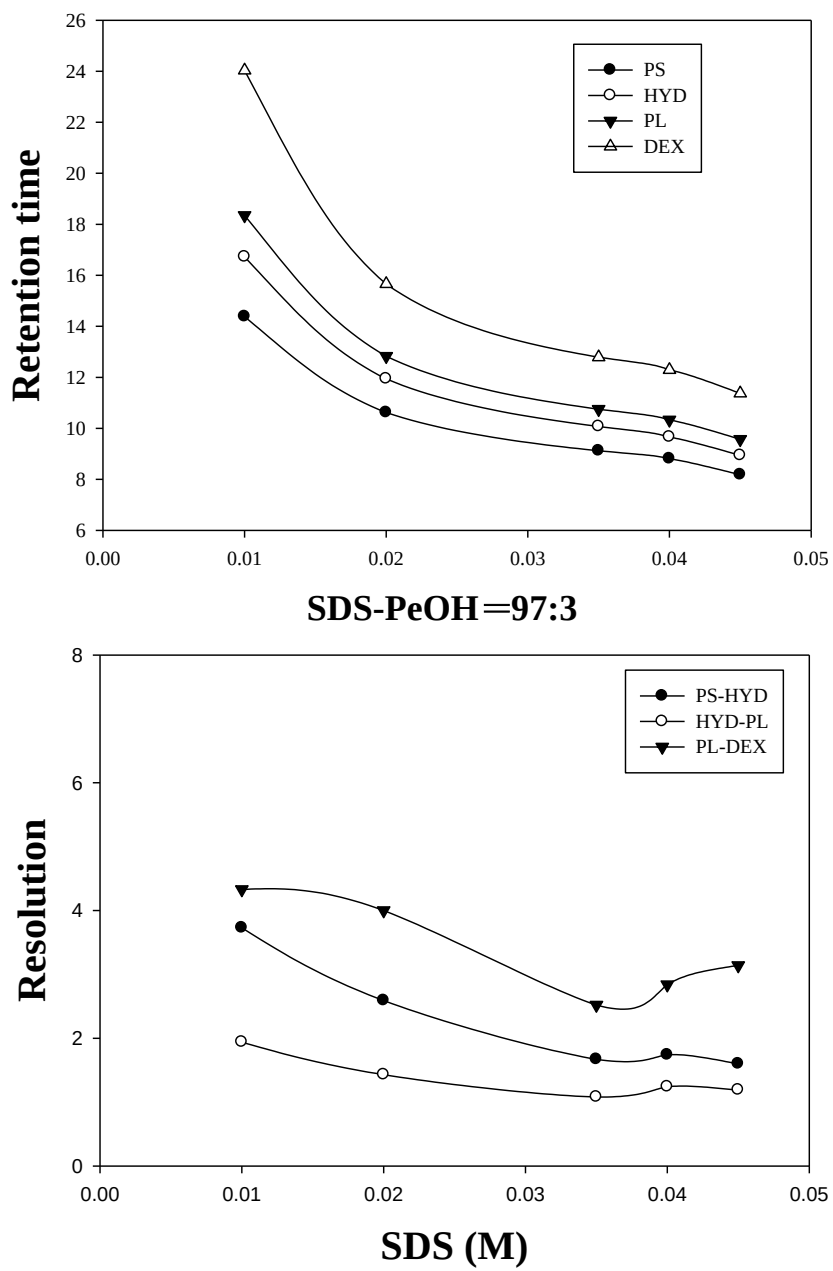


圖3.2 使用不同SDS濃度分析類固醇之滯留時間與解析度

HPLC 層析條件如 3.3，流速：1.0 mL/min

(b) 有機修飾劑及其比例

使用不同有機修飾劑種類分析類固醇之滯留時間與解析度，選擇最常添加異丙醇、丁醇及戊醇三種有機修飾劑來做探討，使用不同有機修飾劑分離四種類固醇成分中，圖 3.3 結果顯示使用異丙醇及丁醇在類固醇成分 HYD 和 PL 間分離效果沒有使用戊醇來的效果好，且使用戊醇時分離類固醇中 HYD 和 PL 成分間解析度有達到 1.5 以上，相較之下戊醇分離效果更好。因此，以戊醇做為移動相中最適當添加的有機修飾劑。

另外，改變有機修飾劑戊醇比例從 1-5% 探討分離四種類固醇成分之影響，圖 3.4 為改變有機修飾劑比例分析類固醇之滯留時間與解析度，結果顯示，當有機修飾劑比例增加則會降低滯留時間，添加 5% 戊醇時雖可大幅縮短滯留時間，卻對於類固醇成分中 PS、HYD 與 PL 分離效果卻不佳，當戊醇比例降低即可改善類固醇成分間的分離效果，但降至 1% 戊醇時分離效果也不佳且導致滯留時間延長；研究結果發現在添加 3% 戊醇時可同時分離四種類固醇成分且解析度達到 1.5 以上，因此最後選擇添加 3% 戊醇作為最佳化條件。

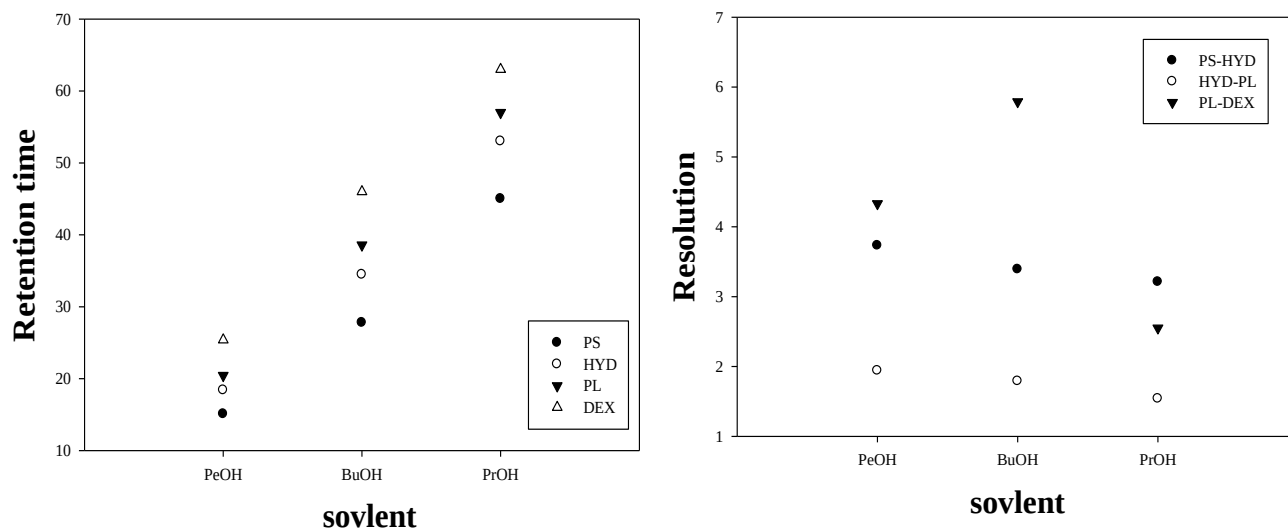


圖3.3 使用不同有機修飾劑分析類固醇之滯留時間與解析度

HPLC 層析條件如 3.3，移動相為 SDS：有機修飾劑=97：3，流速：1.0 mL/min

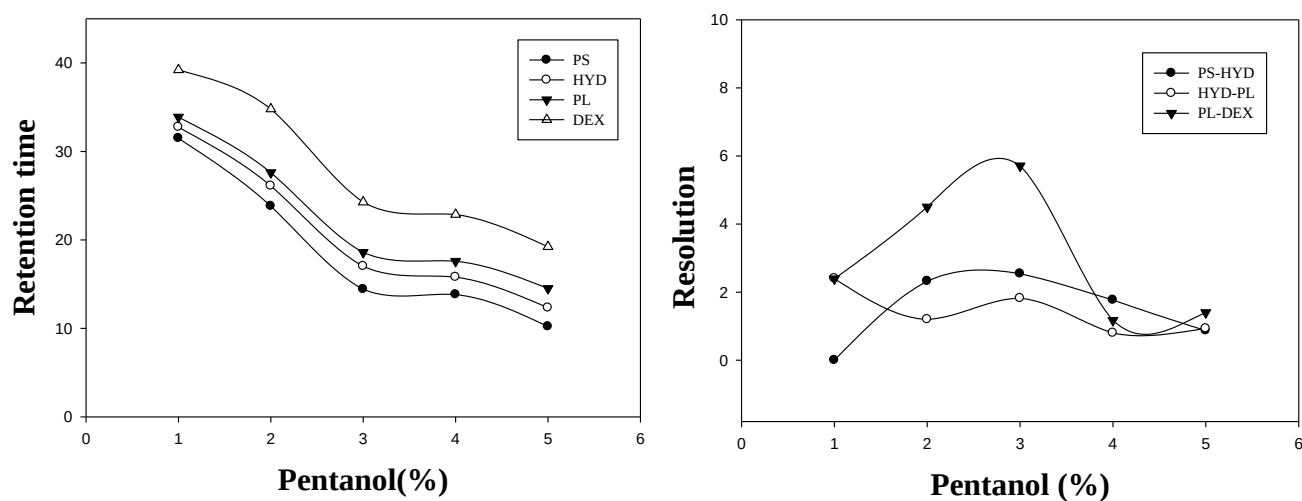


圖3.4 改變有機修飾劑比例分析類固醇之滯留時間與解析度

HPLC 層析條件如 3.3，流速：1.0 mL/min

(c) 溫度及流速

文獻指出溫度對於微胞液相層析則會影響其分離效果，研究中選擇在不同溫度(室溫、40°C、50°C)分析類固醇之滯留時間與解析度，圖 3.5 結果顯示提高溫度則會導致延長滯留時間，解析度並沒有比室溫分離效果來的好，還是以室溫時分離效果最佳，因此，最後選擇室溫做為最佳化之分析條件。

另外，在不同流速(0.5、0.8、1.0 mL/min) 分析類固醇之滯留時間與解析度，探討流速的改變對於分析物之分離效果，圖 3.6 結果顯示降低流速則會導致滯留時間延長且無法改善類固醇成分 HYD 及 PL 間的分離效果，因此還是以 1 mL/min 做為最佳化之分析條件。



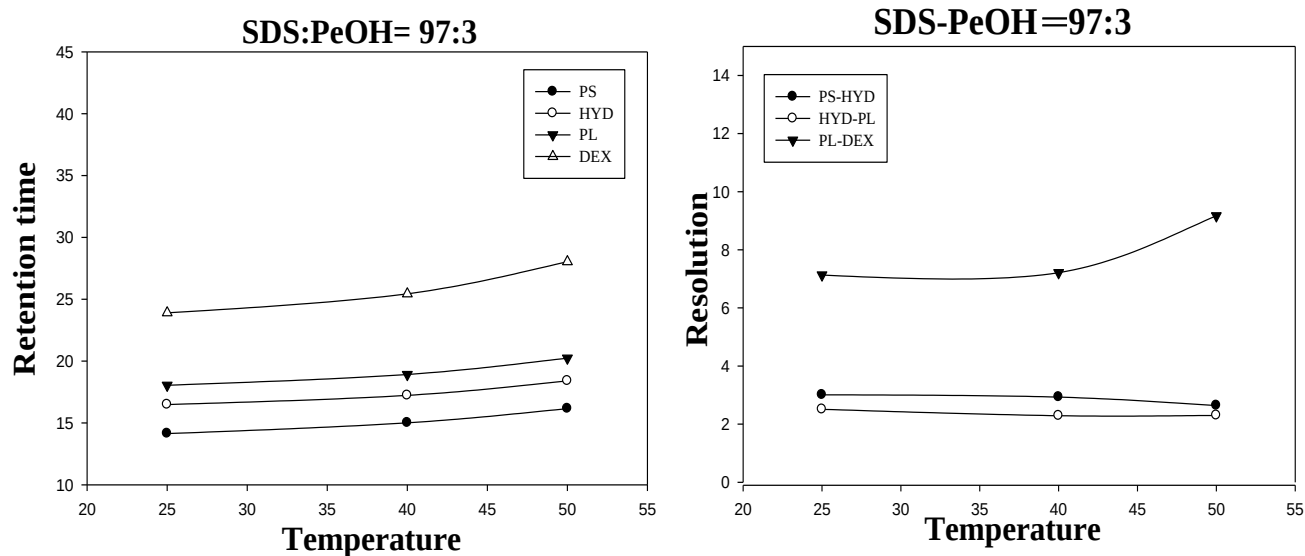


圖3.5 在不同溫度分析類固醇之滯留時間與解析度

HPLC 層析條件如 3.3，流速：1.0 mL/min

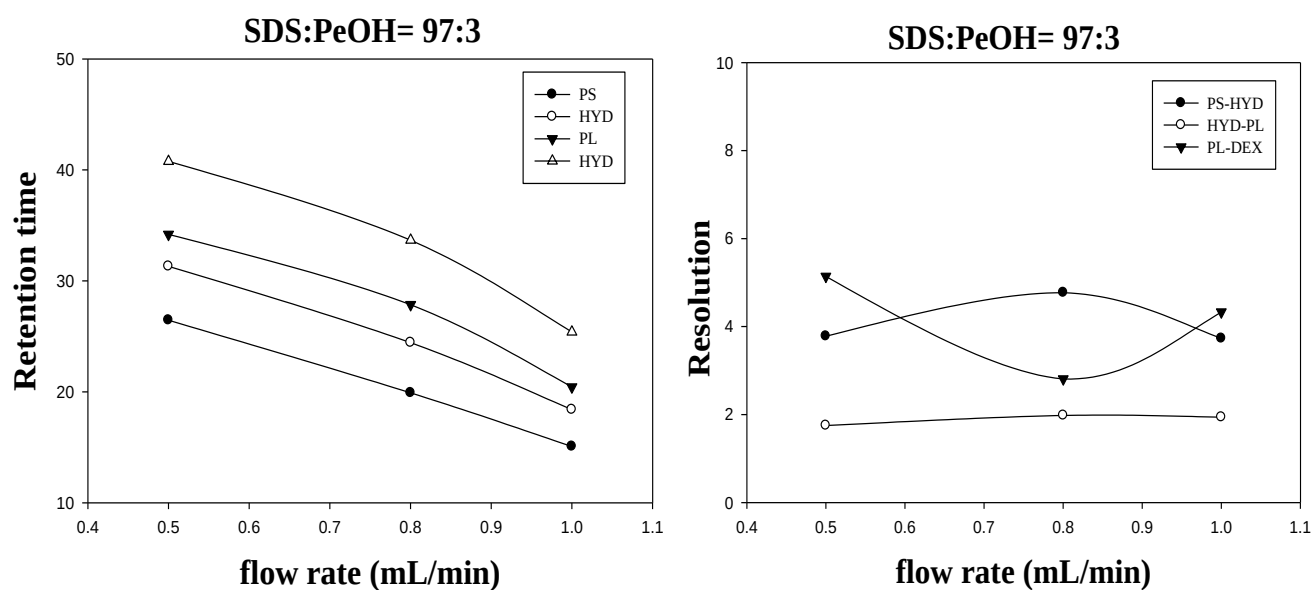


圖3.6 使用不同流速分析類固醇之滯留時間與解析度

HPLC 層析條件如 3.3

3.4.3 類固醇之檢量線

圖 3.7 為類固醇之層析圖譜，將雌激素配製 5~100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度範圍且每個濃度均重覆注射三次，即所得濃度之峰面積平均值，並以濃度對峰面積作出檢量線並求得線性方程式與相關係數，表 3.1 為其檢量線濃度範圍、線性關係(R^2)及偵測極限(LOD)結果顯示 R^2 均達到 0.9995 以上呈現良好的線性關係，類固醇 PS、HYD、PL 及 DEX 偵測極限分別為 0.26、0.34、0.45 及 0.37 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4.4 分析方法確效

表 3.2 為配製不同濃度之類固醇標準溶液於進行同日內與異日間分析，計算各濃度之平均值(Mean)與標準偏差(S.D)及相對標準偏差(R.S.D)。精密度結果如表 3.2 所示，PS 同日內之 R.S.D 介於 0.14%~0.74%、異日間之 R.S.D 介於 0.10%~0.73%、HYD 同日內之 R.S.D 介於 0.02%~0.32%、異日間之 R.S.D 介於 0.02%~0.74%、PL 同日內之 R.S.D 介於 0.001%~0.73%、異日間之 R.S.D 介於 0.01%~0.72%、DEX 同日內之 R.S.D 介於 0.02%~0.73%、異日間之 R.S.D 介於 0.01%~0.75%皆均低於 5%，可顯示出本研究分析方法精密度良好。

表 3.3 為分析自製樣品及添加回收率，準確度則以添加回收率(spike recovery)方式作評估，加入等量已知濃度的類固醇標準溶液於自製樣品中，並以本研究中開發之分析方法測定其濃度，將所得結果除以加入已知濃度，求得

添加回收率(%)及相對標準偏差(R.S.D)；分析結果得知自製樣品回收率 PS 介於 97.67~98.96%、HYD 介於 97.21~97.79%、PL 介於 96.95~98.31%、DEX 介於 97.91~99.75；PS 的 R.S.D 介於 1.86~2.34%、HYD 的 R.S.D 介於 3.11~3.35%、PL 的 R.S.D 介於 1.23~4.19%、DEX 的 R.S.D 介於 0.11~2.18%，由結果可知本研究是可行之分析方法。

3.4.5 市售樣品分析

分析市售樣品之含量及添加回收率如表3.4所示，將皆含有標示雌激素含量之市售樣品經過2.4.5前處理之步驟，測定市售樣品一及二結果皆顯示均未測得四種類固醇成分；另外添加0.5%類固醇成分，測得市售樣品一添加回收率為96.22~99.61%、樣品二回收率為96.21~98.12%。

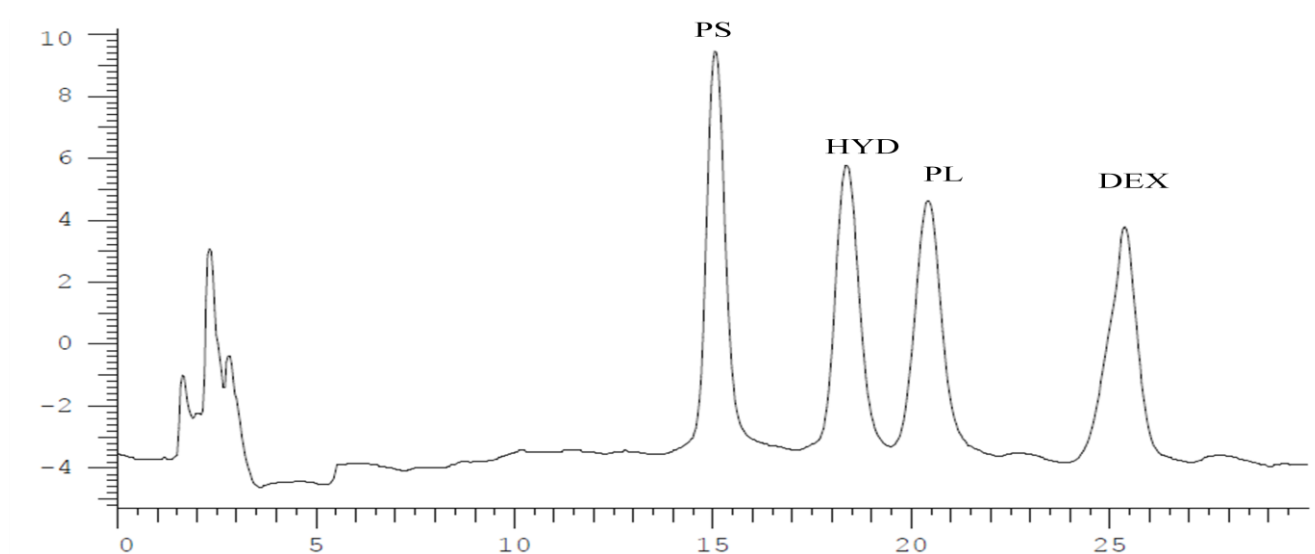


圖3.7 類固醇之層析圖譜

HPLC 層析條件：移動相為 0.01M SDS：戊醇＝97：3，流速 1.0 mL/min，室溫

表 3.1 類固醇之檢量線濃度範圍、線性關係(R^2)及偵測極限(LOD)

Steroids	濃度範圍	R^2	LOD($\mu\text{g/ml}$)
HYD	5~100 $\mu\text{g/ml}$	0.9999	0.34
DEX		0.9999	0.37
PS		0.9995	0.26
PL		0.9998	0.45

表 3.2 類固醇於同日間及異日間之標準偏差

Steroids	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean $\pm$ S.D(%)		R.S.D(%)	
		Intraday*	Interday**	Intraday*	Interday**
PS	5	4.79 $\pm$ 6.81	4.74 $\pm$ 9.56	0.08	0.10
	10	9.40 $\pm$ 8.88	9.51 $\pm$ 8.13	0.14	0.13
	20	19.16 $\pm$ 7.66	19.24 $\pm$ 7.39	0.19	0.19
	50	49.14 $\pm$ 7.21	50.14 $\pm$ 1.98	0.40	0.37
	100	100.39 $\pm$ 4.44	102.06 $\pm$ 1.75	0.74	0.73
HYD	5	5.49 $\pm$ 7.67	5.35 $\pm$ 2.70	0.32	0.02
	10	9.93 $\pm$ 2.61	10.54 $\pm$ 3.56	0.24	0.10
	20	20.12 $\pm$ 3.24	20.55 $\pm$ 0.33	0.10	0.15
	50	51.90 $\pm$ 0.35	51.29 $\pm$ 0.30	0.02	0.37
	100	103.34 $\pm$ 0.03	104.03 $\pm$ 0.41	0.03	0.74
PL	5	5.51 $\pm$ 5.35	5.59 $\pm$ 7.18	0.001	0.01
	10	10.37 $\pm$ 0.94	10.43 $\pm$ 1.69	0.07	0.06
	20	20.41 $\pm$ 1.58	20.68 $\pm$ 0.97	0.16	0.15
	50	52.76 $\pm$ 3.40	52.83 $\pm$ 3.46	0.35	0.35
	100	106.72 $\pm$ 3.42	106.46 $\pm$ 4.24	0.73	0.72
DEX	5	5.51 $\pm$ 7.63	5.49 $\pm$ 7.09	0.02	0.01
	10	10.09 $\pm$ 1.36	10.30 $\pm$ 4.38	0.08	0.10
	20	19.81 $\pm$ 1.74	19.92 $\pm$ 3.11	0.15	0.16
	50	49.45 $\pm$ 3.97	49.33 $\pm$ 2.11	0.38	0.36
	100	99.38 $\pm$ 3.10	97.45 $\pm$ 8.25	0.73	0.75

*n=3, 在同一天連續注入分析，每一濃度各進行三重覆

**n=9, 在不同三天連續注入分析，每一濃度各進行三重覆

表 3.3 分析自製樣品及添加回收率

	Steroids	配製量 (%)	Mean±S.D (%)	添加量 (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
精華液	PS	0.5	0.51±1.2	0.5	98.96	1.86
	HYD	0.5	0.49±2.0	0.5	97.21	3.35
	PL	0.5	0.49±3.2	0.5	96.95	4.19
	DEX	0.5	0.48±2.6	0.5	97.91	2.18
乳液	PS	0.5	0.51±0.4	0.5	97.67	2.34
	HYD	0.5	0.51±1.05	0.5	97.79	3.12
	PL	0.5	0.51±0.55	0.5	98.31	1.23
	DEX	0.5	0.48±1.49	0.5	99.75	0.11

表 3.4 分析市售樣品及添加回收率

	Steroids	標示量 (%)	Mean±S.D (%)	Spiked (%)	Recovery (%)
樣品一	PS	-	-	0.5	97.31
	HYD	-	-	0.5	98.23
	PL	-	-	0.5	96.22
	DEX	-	-	0.5	99.61
樣品二	PS	-	-	0.5	97.67
	HYD	-	-	0.5	97.35
	PL	-	-	0.5	98.12
	DEX	-	-	0.5	96.21

第四章 結論

本研究主要為針對化粧品中之荷爾蒙做分析方法開發，第一部分利用高效能液相層析法連接螢光偵測器同時分析 Estradiol (E_2)及 Ethinyl estradiol(EE_2)成分，圖 2.2 為雌激素標準品溶液之螢光放射圖譜，螢光偵測器最適當之分析波長條件為 $E_x=280\text{ nm}$ 、 $E_m=310\text{ nm}$ 。如表 2.2 所示標準曲線之線性範圍為 0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，線性相關係數(R^2)皆於 0.9999 呈現良好線性關係。表 2.3 配製含 Estradiol(E_2)、Ethinyl estradiol(EE_2)不同濃度之標準品溶液，於同日內及異日間分析其相對標準偏差(R.S.D)分別介於 0.01-0.33%及 0.03-0.63%之間，顯示本研究分析方法精密度良好。表 2.4 則為自製樣品中之添加回收率介於 97.6-99.7%，相對標準偏差(R.S.D)範圍介於 0.11-2.34%。圖 2.6 為雌激素之層析圖譜；依 HPLC 分析 Estradiol(E_2)、Ethinyl estradiol(EE_2)成分之最低偵測極限(LOD)分別為 3.82 及 3.51 ng/mL 。

第二部分使用微胞液相層析法來分析化粧品中類固醇成分 PS、HYD、PL、DEX，圖 3.1 為類固醇分光圖譜，結果以 240 nm 作為分析類固醇之最適當吸收波長條件。為了建立本研究最適當之分析條件，因此探討界面活性劑(SDS)的濃度、有機修飾劑種類、比例以及溫度等參數，比較各參數之滯留時間及解析度。研究所建立之分析條件，結果如圖 3.7 類固醇之層析圖譜，移動相為 0.01M

SDS：戊醇=97：3、流速 1.0 mL/min 並在室溫下進行分析，如表 3.1 所示其標準曲線之線性範圍為 0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，線性相關係數(R^2)皆達到 0.9995 以上呈現良好線性關係。表 3.2 配製不同濃度類固醇成分之標準品溶液，於同日內及異日間分析其相對標準偏差(R.S.D)分別介於 0.001~0.74%及 0.01-0.75%之間，顯示本研究分析方法精密度良好。表 3.3 為自製樣品中之添加回收率介於 96.95-99.75%，相對標準偏差(R.S.D)範圍介於 0.11-4.19%。依 HPLC 分析類固醇各成分 PS、HYD、PL 及 DEX 分別所測得最低偵測極限(LOD)為 0.26、0.34、0.45 及 0.37 $\mu\text{g/mL}$ 。

本研究除了可針對市售化粧品中允許添加之雌激素，也能對化粧品中未允許禁止添加之荷爾蒙物質-類固醇進行分析，可提高其感度、降低偵測極限，在雌激素及類固醇成分之定性及含量分析皆有良好再現性；並將建立之分析方法應用在市售化粧品中樣品檢測，測定雌激素結果中與所標示的含量相符合，並且也未超過衛生福利部所規定的基準含量範圍；結合微胞液相層析法只需使用少量的有機溶劑，能降低環境污染且更環保和使用於化粧品之樣品前處理上可大幅縮短繁瑣步驟，是一種極有價值與綠色的分析技術。

參考文獻

- [1] 歐忠儒 (2010), 管好荷爾蒙不生病-博思智庫.
- [2] 王正雄 (民 89 年), 環境檢驗-環境荷爾蒙:地球村二十一世紀之熱門課題:6-14.
- [3] J. A. McLachlan, S. F. Arnold (1996), Environmental Estrogens.Science:452-461.
- [4] 楊幸僖 (民 101 年), 國立中央大學環境工程研究所碩士論文.
- [5] 凌永健 (民 89 年), 環境檢驗:環境荷爾蒙的化學分析, 32:9-15.
- [6] 江政哲 (民 90 年), 國立中央大學化學研究所碩士論文.
- [7] F. Guo, Q. Liu, G. B. Qu, S. J. Song, J. T. Sun, J. B. Shi, G. B. Jiang (2013), Journal of Chromatography. A 1281:9-18.
- [8] 衛生福利部福利部-化粧品含有醫療或毒劇藥品基準(含藥化粧品基準), 2012/7/5 彙整版.
- [9] 衛生福利部福利部-全國化粧品不良品通報系統, 常見於化粧品中之藥品成分(包含許可添加以及違法添加者).
- [10] 洪志平 (民 91 年), 台北醫學大學藥學院藥學研究所碩士論文.
- [11] 邱麗芳 (民 95 年), 國立成功大學化學研究所碩士論文.

- [12] 簡辰霖、簡盟月、吳英黛 (2008), FJPT. 33:325-334.
- [13] D. Z. Tu, H. L. Wu, Y. N. Li, J. Zhang, Y. Li, C. C. Nie, X. H. Zhang, R. Q. Yu (2012), Analytical Methods. 4:222.
- [14] R. D. Briciu (2009), Journal of Chromatographic Science. 47:127-139.
- [15] S. R. Bárbara, A. R. Mar ía, H. B. Javier, H. H. AV, R. D. MÁ (2013), TrAC Trends in Analytical Chemistry. 44:58-77.
- [16] S. A. Bingham, C. Atkinson, J. Liggins (1998), Br J Nutr Phyto-oestrogens: where are we now. 79:393-406.
- [17] G. G. Yinga, R. S. Y, J. R. Kookanaa (2002), Environment International. 28: 545-551.
- [18] P. Mazellier, L. Meite, J. D. Laat (2008), Chemosphere. 73:1216-1223.
- [19] D. L. Villeneuve, A. L. Blankenship, J. P. Giesy, M. S. Denison, W. G. Helferich (1998), Taylor&Francis, in Toxicant-Receptor Interactions. 69-97.
- [20] 吳仲岳 (民 101 年), 國立屏東科技大學環境工程與科學系碩士論文.
- [21] 馬強、王超、王星 (2007), Chinese Journal of Chromatography. 25:541-545.
- [22] Yi W, Ying W, B. S. H. Z, X. Ying, Y. Q. F (2007), Chinese Journal of Analytical Chemistry. 35:681-684.

- [23] W. GAO, S. F. LC (2010), *Flavour Fragrance Cosmetics*. 12:28-31.
- [24] C. Wang, C. Xu, F. Chen, X. Tang (2011), *Journal of Separation Science*. 34:2371-2375.
- [25] 陳國珍、黃賢智、鄭朱梓 (1990), 螢光分析法-科學出版社(第二版).
- [26] 方禹之 (1990), 儀器分析-華東師範大學出版社.
- [27] 趙藻藩、趙文寬 (1990), 儀器分析-高等教育出版社.
- [28] H. C. Man, C. C. Bong, R. K. Kyoung (2000), *The Analyst*. 125:711-714.
- [29] H. Yamada, Y. Kuwahara, Y. Takamatsu, T. Hayase (2000), *Biomedical Chromatography*. 14: 333-337.
- [30] K. Matsumotoa, Y. Tsukaharab, T. Uemurab, K. Tsunodab, S. Kawasaki, J. Tadano, T. Matsuya (2002), *Journal of Chromatography B*. 773:135–142.
- [31] Y. Yoon, P. S. Westerhoff, A. S. M. Esparza (2003), *Water Research*. 37:3530-3537.
- [32] L. Mao, C. Sun, H. Zhang, Y. Li, D. Wu (2004), *Analytica Chimica Acta*. 522:241-246.
- [33] Y. Zuo, K. Zhang, Y. Lin (2007), *Journal of Chromatography. A* 1148:211-218.
- [34] S. N. Atapattu, J. M. Rosenfeld (2011), *Journal of Chromatography. A* 1218:9135-9141.

- [35] O. Majid, F. Akhlaghi, T. Lee, D. W. Holt, T. Andrew (2001), Therapeutic Drug Monitoring. 23:163-168.
- [36] M. J. Mycek, A. H. R (2002), Pharmacology (Lippincott's Illustrated Reviews Series) 106:263-278.
- [37] 陳榮新 (民 58 年), 中華民國眼科醫學會會刊, 8:83-89.
- [38] 嚴淑芳 (民 95 年), 國立成功大學化學研究所碩士論文.
- [39] A. K. Jonas, B. Erland, H. Martin (2013), Journal of Chromatography. B, 928:58-77.
- [40] E. Dési, Á. Kovács, Z. Palotai, A. Kende (2008), Microchemical Journal. 89:77-81.
- [41] Q. Chen, D. Zielinski, J. Chen, A. Koski, D. Werst, S. Nowak (2008), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 48:732-738.
- [42] R. B. Friedrich, A. Ravanello, L. C. Cichota, R. C. Be (2009), Química Nova. 32:1052-1054.
- [43] W. Thogchai, B. Liawruangrath (2013), International Journal of Cosmetic Science. 35:257-263.
- [44] A. P. Boichenko, L. P. Loginova, A. U. Kulikov (2007), Methods and Objects of

Chemical Analysis. 2:92-116.

[45] S. M. Wu, H. L. Wu, S. H. Chen (1995), *Analytica Chimica Acta*.

307:103-107.

[46] E. T. Mallinson, J. S. Dreas, R. T. Wilson, H. AC (1995), *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry. 43:140-141.

[47] A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos (1999), *Journal of Chromatography*.

B 724:53-63.

[48] Y. K. Song, J. S. Park, J. K. Kim, C. K. Kim (2004), *Journal of Liquid*

Chromatography & Related Technologies. 27:2293-2306.

[49] M. E. Capella, M. A. Llorenc, G. A. Mayte, E. R. Josep (2002), *Analytica*

Chimica Acta. 454:125-135.

[50] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski (2006), *Analytica Chimica Acta*.

570:46-58.

[51] P. G. Brioles, R. G. Lumbreras, R. I. Hornillos, A. S. Montes (2004), *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 36:65-71.

[52] Y. S. Nam, I. K. Kwon, Y. Lee, K. B. Lee (2012), *Forensic Science*

International. 220:23-28.

- [53] M. Fidani, M. C. Gamberini, G. Pompa, F. Mungiguerra, A. Casati, F. Arioli (2013), *Steroids*. 78:121-126.
- [54] R. Izquierdohornillos, R. Gonzalolumbreras (2003), *Journal of Chromatography. B* 798:69-77.
- [55] M. J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, C. G. Coque (2013), *Separation & Purification Reviews*. 42:1-27.
- [56] T. Mehling, L. Kloss, H. Mushardt, T. Ingram, I. Smirnova (2013), *Journal of Chromatography. A* 1273:66-72.
- [57] F. J. DeLuccia, M. Arunyanart, L. L. Cline (1985), *Journal of Analytical Chemistry*. 57:1564.
- [58] G. Morteza, J. K. Khaledi, H. R. Andrew, E. D. Breyer (1990), *Analytical Chemistry*. 62:130-136.
- [59] J. M. Ruiz, M. C. Coque, A. Berthod (2009), *Separation and Purification Reviews*. 38:45.
- [60] R. A. MJ, G. A. MC (2011), *Journal of Separation Science*. 34:623-630.
- [61] C. H. Tan, Z. J. Huang, X. G. Huang (2010), *Analytical Biochemistry*. 401:144.

- [62] B. K. Lavine, S. Hendayana, W. T. Cooper, Y. He (1997), Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 20:377-402.
- [63] L. L. Cline, J. G. Habarta, J. G. Dorsey (1984), Analytical Chemistry. 56:1132.
- [64] A. Chattopadhyay, K. G. Harikumar (1996), Federation of European Biochemical Societies. 391:199.

