



(21)申請案號：102120354 (22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl. : G01N30/02 (2006.01) G01N30/06 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：呂濟宇 LU, CHI YU (TW)；李怡萱 LEE, YI HSUAN (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

Yu Y. et al. "Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Anal Bioanal Chem. 2011, 399(2):891-902. 摘要、第 893 頁左欄第 2 段、右欄第 4 段、第 895 頁左欄第 2 段、右欄全、表 2-3

苗楠等，3,4-二氨基苯基苯甲酮在基质輔助激光解析離子化質譜分析磷脂中的應用，分析化學研究報告，2011 年，第 39 卷第 5 期，第 605-610 頁 摘要、第 606 頁第 2、5 段、第 609 頁第 1 段

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：4 共 23 頁

(54)名稱

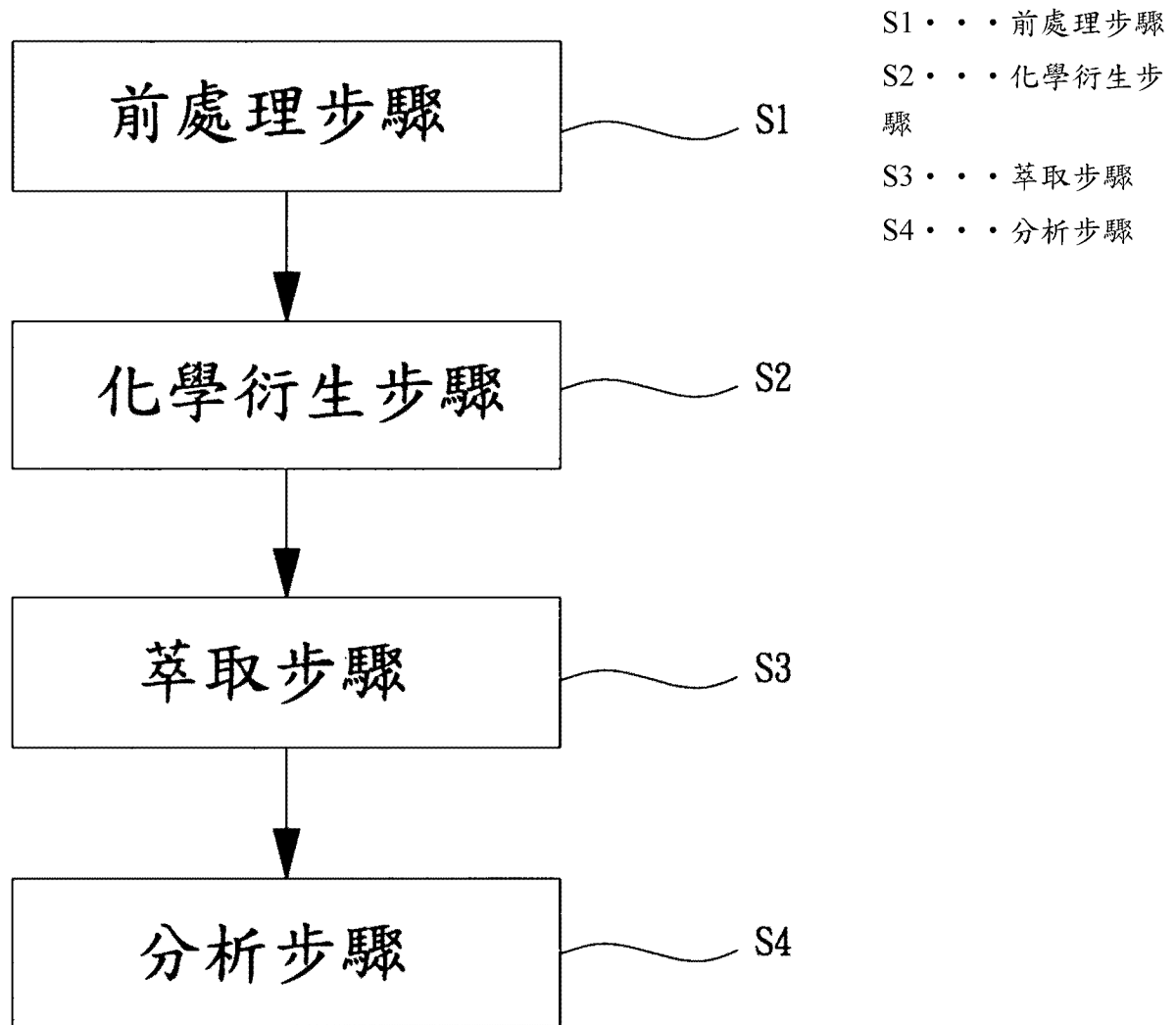
對羥基苯甲酸酯之檢測方法

A METHOD OF DETECTING PARABEN

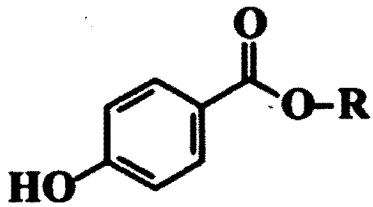
(57)摘要

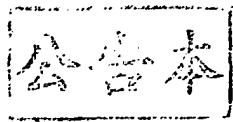
一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係適用於少量之待測樣品，其包含：一前處理步驟，係將一待測樣品溶解於一溶媒，其中，該待測樣品為化妝品或藥品，經由超音波震盪及高速離心，以獲得一上清液，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯；一化學衍生步驟，係將一衍生試劑加入該上清液，使該衍生試劑與對羥基苯甲酸酯進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之對羥基苯甲酸酯；一萃取步驟，係以一萃取溶劑萃取該衍生溶液，以獲得一萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；及一分析步驟，係以一雷射光束使接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成一氣相離子，並以一質量分析器偵測該氣相離子之質荷比，以獲得該氣相離子之分子量。

A method of detecting paraben, which is suitable for small amount of sample, is disclosed. The method of detecting paraben comprises: dissolving a sample by a solvent, wherein the sample is cosmetics or drugs, followed by sonication and centrifugation to obtain a supernatant with paraben; adding a derivatizing agent to the supernatant and triggering a derivatization reaction between the supernatant and the derivatizing agent to obtain a derivatizing solution with tagged paraben; irradiating the tagged paraben by a laser beam to generate a gas ion, followed by detecting the mass-to-charge ratio of the gas ion, to obtain the molecular weight of the gas ion.



第 2 圖





## 發明摘要

※ 申請案號：102120354

※ 申請日：102.6.7

※IPC 分類：

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

### 【發明名稱】(中文/英文)

對羥基苯甲酸酯之檢測方法 / A method of detecting paraben

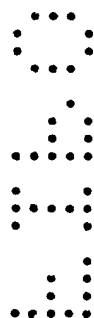
### 【中文】

一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係適用於少量之待測樣品，其包含：  
 一前處理步驟，係將一待測樣品溶解於一溶媒，其中，該待測樣品為化妝品或藥品，經由超音波震盪及高速離心，以獲得一上清液，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯；一化學衍生步驟，係將一衍生試劑加入該上清液，使該衍生試劑與對羥基苯甲酸酯進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之對羥基苯甲酸酯；一萃取步驟，係以一萃取溶劑萃取該衍生溶液，以獲得一萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；及一分析步驟，係以一雷射光束使接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成一氣相離子，並以一質量分析器偵測該氣相離子之質荷比，以獲得該氣相離子之分子量。

### 【英文】

A method of detecting paraben, which is suitable for small amount of sample, is disclosed. The method of detecting paraben comprises: dissolving a sample by a solvent, wherein the sample is cosmetics or drugs, followed by sonication and centrifugation to obtain a supernatant with paraben; adding a derivatizing agent to the supernatant and triggering a derivatization reaction between the supernatant and the derivatizing agent to obtain a derivatizing solution with tagged paraben; irradiating the tagged paraben by a laser beam to

generate a gas ion, followed by detecting the mass-to-charge ratio of the gas ion, to obtain the molecular weight of the gas ion.



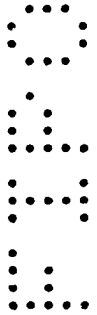
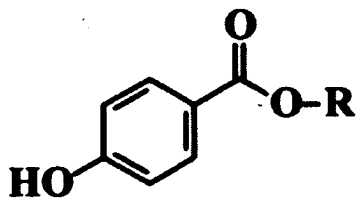
**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 2 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

- S1 前處理步驟
- S2 化學衍生步驟
- S3 萃取步驟
- S4 分析步驟

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

對羥基苯甲酸酯之檢測方法 / A method of detecting paraben

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種檢測方法，特別是一種檢測對羥基苯甲酸酯之含量的檢測方法。

## 【先前技術】

【0002】 請參照第 1 圖所示，對羥基苯甲酸酯 (para-hydroxybenzoic acid，簡稱 paraben)，包含甲酯 (methyparaben，簡稱 MP)、乙酯 (ethylparaben，簡稱 EP)、丙酯 (propylparaben，簡稱 PP)、丁酯 (butylparaben，簡稱 BP)、異丙酯 (isopropylparaben，簡稱 IPP)、異丁酯 (isobutylparaben，簡稱 IBP) 及第二丁酯 (secbutylparaben，簡稱 SBP) 等，常被添加於化妝品及藥品等產品中，作為防腐劑，可以防止黴菌、細菌生長，並且可以延長產品之使用期限。然而，對羥基苯甲酸酯類防腐劑被認為具有雌激素之活性，會影響男性生殖系統，被歸類為仿雌激素 (xenoestrogen，簡稱 XE) 及內分泌干擾物 (endocrine-disrupting compound，簡稱 EDC，又稱為環境荷爾蒙)，會對人體造成危害；並且，對於容易引發過敏性體質之個體而言，更可能促進產生過敏性反應及光敏感性，因此，必須對對羥基苯甲酸酯類防腐劑之添加與否及其使用量作嚴格的監測。

【0003】 習知對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係先將一待測樣品以固相萃取法 (solid phase extraction，簡稱 SPE) 之萃取膜或萃取管柱進行萃取，再以逆相高壓液相層析法 (reversed-phase high performance liquid chromatography，簡稱 RP-HPLC) 搭配紫外光偵測器 (ultraviolet detector，

簡稱 UV) 或二極體陣列偵測器 (diode array detector, 簡稱 DAD) 進行分析。

【0004】 然而，習知對羥基苯甲酸酯之檢測方法中，受限於固相萃取法需先將待測樣品進行分離、萃取，因此需要大量的待測樣品(0.2-20 克)，不適用於檢測較為難以取得，或較為高價之產品。

【0005】 並且，習知對羥基苯甲酸酯之檢測方法中，逆相高壓液相層析法不僅分析的時間較長，在每個樣品分析之後，又需要額外的時間沖洗層析管柱，並且需待該層析管柱回復平衡狀態後，才可以進行下一個待測樣品之分析，相當耗費時間，因此不適用於大規模之待測樣品篩檢。

【0006】 再者，習知對羥基苯甲酸酯之檢測方法中，逆相高壓液相層析法係需要以大量之有機溶媒沖洗層析管柱，因此，分析過程中係會產生大量有機廢液，會對環境造成危害。

#### 【發明內容】

【0007】 本發明之主要目的係提供一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係具有較高之精密度，可以減低待測樣品之使用量者。

【0008】 本發明之再一目的係提供一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係可以大幅縮短檢測時間，以利於大規模之待測樣品篩檢者。

【0009】 本發明之又一目的係提供一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係可以減少排出有機廢液，以避免造成環境污染者。

【0010】 為達到前述發明目的，本發明所運用之技術手段及藉由該技術手段所能達到之功效包含有：

【0011】 一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係包含：一前處理步驟，係將一待測樣品溶解於一溶媒，其中，該待測樣品為化妝品或藥品，經由超音波震盪及高速離心，以獲得一上清液，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯；一化學衍生步驟，係將一衍生試劑加入該上清液，使該衍生試劑與對

羥基苯甲酸酯進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之對羥基苯甲酸酯；一萃取步驟，係以一萃取溶劑萃取該衍生溶液，以獲得一萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；及一分析步驟，係以一雷射光束使接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成一氣相離子，並以一質量分析器偵測該氣相離子之質荷比，以獲得該氣相離子之分子量。

【0012】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，於該前處理步驟之後，該化學衍生步驟之前，更包含一溫度調整步驟，係使該上清液之溫度調整至 30-80°C。

【0013】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該衍生試劑具有氯磺酰苯基，且該氯磺酰苯基係與對羥基苯甲酸酯之羥基進行該衍生反應。

【0014】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該衍生試劑係為 1,3-苯并噻唑-6-磺酰氯、4-二甲胺基苯基偶氮苯-4'-磺酰氯或丹磺酰氯。

【0015】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該分析步驟中，係以波長為 330-360 nm 之一雷射光束，使該接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成該氣相離子。

【0016】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該前處理步驟中，該待測樣品係為液狀、乳液狀、乳霜狀或膠狀。

【0017】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，更於該上清液中添加一內部標準品，使該內部標準品與該衍生試劑進行該衍生反應。

【0018】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該內部標準品係為對羥基苯甲酸酯之同位素。



【0019】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，經由該化學衍生步驟中，該衍生試劑之氯磺酰苯基與對羥基苯甲酸酯之羥基進行衍生反應，提升對羥基苯甲酸酯被辨識之辨識效率及專一性，因而僅以少量之待測樣品，即可以精確地被檢測，適用於難以取得、或較為高價之待測樣品，為本發明之功效。

【0020】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，經由該分析步驟，係可以使該接合該標記之對羥基苯甲酸酯經雷射光束激發形成該氣相離子，並且根據該氣相離子之質荷比，進而計算出該待測樣品中是否含有對羥基苯甲酸酯，可以大幅減少檢測及分析之時間，達到快速待測樣品篩檢之功效。

【0021】 本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，僅於該前處理步驟及該萃取步驟使用少量之有機溶媒，可以減少檢測過程中產生之大量有機廢液，進而達到減少環境污染之功效。

#### 【圖式簡單說明】

#### 【0022】

第 1 圖係對羥基苯甲酸酯之結構式。

第 2 圖係本發明第一較佳實施例之流程圖。

第 3 圖係本發明衍生反應之反應化學式。

第 4 圖係本發明第二較佳實施例之流程圖。

#### 【實施方式】

【0023】 為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【0024】 請參照第 1 圖所示，本發明之一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係包含：一前處理步驟 S1，係將一待測樣品溶解於一溶媒，經由超音

波震盪及高速離心，以獲得一上清液，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯；一化學衍生步驟 S2，係將一衍生試劑加入該上清液，使該衍生試劑與對羥基苯甲酸酯進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之對羥基苯甲酸酯；一萃取步驟 S3，係以一萃取溶劑萃取該衍生溶液，以獲得一萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；及一分析步驟 S4，係經一雷射光束使接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成一氣相離子，並分析該氣相離子之質荷比，以獲得該氣相離子之分子量。

【0025】 詳而言之，該前處理步驟 S1 中，該待測樣品係可以選自日常生活較容易接觸之化妝品或藥品，其中，化妝品之劑型係可以選擇為液狀 (solution)、乳液狀 (lotion 或 emulsion)、乳霜狀 (cream) 或膠狀 (gel)，且藥品則可以為口服溶劑、口服錠劑、注射性溶劑、吸入性溶劑、膠狀塗抹性藥劑或乳霜狀塗抹性藥劑等；該待測樣品之用量係選擇介於 0.1-100 毫克。將該待測樣品溶解於該溶媒，該溶媒係可以選自乙腈、丙酮、甲醇等有機溶劑，亦可以選擇由上述有機溶劑與水經由特定比例調配而成之溶媒，於本較佳實施例中，係選擇以 100 毫克之該待測樣品溶於 1 毫升之乙腈。

【0026】 該待測樣品溶解於該溶媒之後，係可以透過超音波震盪，使該待測樣品中之對羥基苯甲酸酯可以完全溶出於該溶媒，超音波震盪之時間可以為 1-30 分鐘；接著，以高速離心去除該待測樣品之雜質，高速離心較佳係以 10000-13000 rpm 之轉速離心 1-30 分鐘。於本較佳實施例中，係以超音波震盪 10 分鐘，使該待測樣品中之對羥基苯甲酸酯可以完全溶出於乙腈，並且以 13000 rpm 之轉速高速離心 10 分鐘，以獲得該上清液，並且，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯。

【0027】 該化學衍生步驟 S2 中，係於該上清液中加入該衍生試劑，使該衍生試劑與對羥基苯甲酸酯進行該衍生反應，較佳地，該衍生試劑具

有波長為 330-360 nm 之吸光值，並且具有氯磺酰苯基 (-SO<sub>2</sub>Cl 官能基)，該氯磺酰苯基可以與對羥基苯甲酸酯之羥基 (-OH 官能基) 進行該衍生反應，以獲得該衍生溶液，該衍生溶液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯 (請參照第 3 圖所示之反應化學式)。該衍生試劑係可以為 1,3-苯并噻唑-6-磺酰氯 (1,3-benzothiazole-6-sulfonyl chloride)、4-二甲胺基苯基偶氮苯-4'-磺酰氯 (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride, 又稱 dabsyl chloride) 或丹磺酰氯 (dansyl chloride)，但不以此為限。

【0028】 並且，依據選用之該衍生試劑不同，係可以調整該上清液之 pH 值，以利於該衍生反應之進行。於本較佳實施例中，該衍生試劑係選擇為丹磺酰氯，且係以鹼性溶液 (如碳酸鈉或碳酸氫鈉) 將該上清液之 pH 值調整至 pH 8-10；此外，請參照第 4 圖所示，於該前處理步驟 S1 之後，該化學衍生步驟 S2 之前，更可以進行一溫度調整步驟 S5，係可以使該上清液之溫度調整至 30-80°C，以加速該衍生反應之進行。

【0029】 於本較佳實施例中，係取 5 μl 之上清液，以 10-500 mM 之碳酸氫鈉 10 μl 將 pH 調整至 pH 8-10 之間，加入 10 μl 丹磺酰氯 (溶於丙酮，濃度為 0.25-2 mg/ml)，以獲得一混合溶液，將該混合溶液加熱至 30-80°C，以加速該衍生反應之進行，使氯磺酰苯基 (-SO<sub>2</sub>Cl 官能基) 與對羥基苯甲酸酯之羥基 (-OH 官能基) 進行該衍生反應 5 至 30 分鐘，使對羥基苯甲酸酯可以接合該標記 (如第 3 圖所示)，以獲得該衍生溶液。

【0030】 該萃取步驟 S3 中，係可以利用該萃取溶劑對該衍生溶液進行萃取，以獲得該萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；較佳地，該萃取溶劑係可以為乙酸己酯、正己烷、甲苯或乙酸乙酯等有機溶劑，該萃取溶劑之用量約 10-50 μl；於本較佳實施例中，係以 20 μl 之乙酸乙酯進行萃取，使具有該標記之對羥基苯甲酸酯可以溶出於乙酸乙酯，以獲得該萃取液。

【0031】 該分析步驟中，較佳係可以選擇以基質輔助雷射脫附離子化—飛行時間質譜儀 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer, 簡稱 MALDI-TOF MS) 進行分析，但不以此為限。詳而言之，該萃取液係可以置於該基質輔助雷射脫附離子化—飛行時間質譜儀之一樣品托盤 (target plate)，覆蓋上一基質 (matrix)，使該基質與該萃取液形成一結晶狀固態物；較佳地，該基質係選擇可以吸收波長為 330-360 nm 雷射光束之  $\alpha$ -氰基-4-羥基桂皮酸 ( $\alpha$ -cyanol-4-hydroxycinnamic acid, 簡稱 CHCA)、3,5-二甲氧基-4-羥基桂皮酸基桂皮酸 (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, 又稱為 sinapinic acid, 簡稱 SA) 或二羥基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, 簡稱 2,5-DHB)，於本較佳實施例中，該基質係選擇為 0.5  $\mu$ l 之  $\alpha$ -氰基-4-羥基桂皮酸(濃度為 10 mg/ml)。

【0032】 接著，以波長為 330-360 nm 之雷射光束照射該結晶狀固態物，使該結晶狀固態物可以被激發，以形成該氣相離子，該氣相離子經由電場加速後，可以進入一質量分析器係，以偵測該氣相離子之質荷比 (mass-to-charge ratio, 簡稱 m/z)，以獲得該待測樣品之分子量；該質量分析器係可以選自飛行式時間質量分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer)、四極棒質量分析器 (quadrupole analyzer)、離子阱質量分析器 (ion trap analyzer, 簡稱 IT analyzer) 及傅立葉轉換質量分析器 (Fourier transform-ion cyclotron resonance, 簡稱 FT-ICR)。於本較佳實施例中，該質量分析器係選擇為飛行式時間質量分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer)，其分析速度快，結合基質輔助雷射脫附游離法，係可以有效節省樣品分析之時間。

【0033】 較佳地，更可以於該化學衍生步驟 S2 中，於上清液中添加一內部標準品 (internal standard)，該內部標準品係可以選擇為對羥基苯甲酸酯之同位素，於本較佳實施例中，係選用濃度為 16  $\mu$ g/ml 之 d5-對羥基

苯甲酸乙酯，該內部標準品同樣經由該衍生反應，與該基質形成該結晶狀固態物，並且被雷射光束激發形成該氣相離子。根據質量分析器分析該內部標準品之波峰面積，與該待測樣品所得之波峰面積相比，將數值帶入對羥基苯甲酸酯之檢量線，即可以計算出該待測樣品中的對羥基苯甲酸酯的含量。

【0034】 為證實本發明較佳實施例係能夠用以檢測待測樣品中所含之對羥基苯甲酸酯含量，係取數種市售化妝水、膠狀化妝品、乳液狀化妝品、乳霜狀化妝品、面膜及臨床液狀藥品，以本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法進行檢測及分析，結果係如第 1-6 表所示：

【0035】 第 1 表、市售化妝水中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (μl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
1	36.53± 0.001	-	-	-	2.43	-	-	-	0.04	-	-	-	0.04
2	53.19± 0.03	12.78± 0.002	-	-	3.40	9.85	-	-	0.05	0.01	-	-	0.07
3	113.25 ±0.04	33.41± 0.002	-	-	2.15	2.62	-	-	0.11	0.03	-	-	0.15
4	67.19± 0.07	27.77± 0.004	-	-	6.40	10.24	-	-	0.07	0.03	-	-	0.09
5	63.11± 0.03	-	2.27± 0.001	-	2.86	-	5.23	-	0.06	-	0.002	-	0.07

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0036】請參照第 1 表所示，待測樣品編號 1-5 分別為市售之化妝水，各取 100 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.04-0.15%之對羥基苯甲酸酯；據此，本發明較佳實施例之對羥基苯甲酸酯之檢測方法係適用於檢測極少量（100 毫克）之待測樣品。

【0037】第 2 表、市售膠狀化妝品中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (μl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
6	119.79 ±1.210	-	-	-	6.4	-	-	-	0.12	-	-	-	0.12
7	49.27± 0.320	1.14± 0.010	-	-	4.05	7.22	-	-	0.049	0.0011	-	-	0.05

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0038】請參照第 2 表所示，待測樣品編號 6-7 分別為市售之膠狀化妝品，各取 100 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.05-0.12%之對羥基苯甲酸酯。

【0039】第 3 表、市售乳液狀化妝品中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (μl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和

8	44.96±	6.51±	32.32±	0.12±	3.53	3.16	7.91	7.72	0.04	0.01	0.03	0.00	0.08
	0.002	0.0002	0.003	0.0004									
9	87.7±	11.99±	5.24±	17.76±	2.06	3.57	2.12	2.41	0.09	0.01	0.01	0.02	0.12
	0.003	0.010	0.001	0.005									
10	36.51±	1.63±	32.84±	-	1.32	5.63	4.13	-	0.04	0.002	0.03	-	0.07
	0.010	0.001	0.020										
11	17.84±	5.32±	2.46±	8.44±	1.24	5.39	8.13	10.15	0.02	0.01	0.00	0.01	0.03
	0.003	0.005	0.002	0.010									
12	96.83±	1.39±	1.13±	-	2.29	11.97	12.41	-	0.10	0.001	0.001	-	0.10
	0.050	0.002	0.001										

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0040】請參照第 3 表所示，待測樣品編號 8-12 分別為市售之乳液狀化妝品，各取 100 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.03-0.12% 之對羥基苯甲酸酯。

【0041】第 4 表、市售乳霜狀化妝品中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (µl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
13	1.02±	99.95±	55.49±	-	8.4	1.95	2.56	-	0.001	0.10	0.06	-	0.16
	0.001	0.03	0.02										
14	64.28±	7.76±	14.39±	37.62±	3.62	7.61	9.62	3.09	0.06	0.01	0.01	0.04	0.12
	0.003	0.004	0.001	0.001									

15	42.61±	11.11±	4.97±	30.21±									
	0.02	0.01	0.004	0.02	2.67	5.32	7.67	6.70	0.04	0.01	0.005	0.03	0.09
16	87.7±	11.99±	5.24±	17.76±									
	0.003	0.01	0.001	0.005	2.06	3.57	2.12	2.41	0.09	0.01	0.01	0.02	0.12
17	36.51±	1.63±	32.84±										
	0.01	0.001	0.02	-	1.32	5.63	4.13	-	0.04	0.002	0.03	-	0.07

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0042】請參照第 4 表所示，待測樣品編號 13-17 分別為市售之乳霜狀化妝品，各取 100 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.07-0.16% 之對羥基苯甲酸酯。

【0043】第 5 表、市售面膜中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (µl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
18	51.90±	2.15±	1.11±	-									
	0.02	0.001	0.001	-	2.08	3.63	13.24	-	0.05	0.002	0.001	-	0.06
19	43.58±	4.49±											
	0.04	0.001	-	-	5.90	1.13	-	-	0.04	0.004	-	-	0.05
20	33.61±	1.61±											
	0.02	0.002	-	-	4.55	9.67	-	-	0.03	0.002	-	-	0.04
21	61.52±												
	0.03	-	-	-	2.96	-	-	-	0.06	-	-	-	0.06



22	14.63±	-	-	-	8.46	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01
	0.02												

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0044】請參照第 5 表所示，待測樣品編號 18-22 分別為市售之面膜產品，各取 100 毫克添加於面膜紙上的精華液經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.01-0.06%之對羥基苯甲酸酯。

【0045】第 6 表、市售臨床液狀藥品中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (μl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
23	39.76± 0.02	-	-	-	3.00	-	-	-	0.04	-	-	-	0.04
24	225.55 ±0.03	-	-	-	7.60	-	-	-	0.23	-	-	-	0.23
25	39.69± 0.01	-	-	-	1.54	-	-	-	0.04	-	-	-	0.04
26	48.69± 0.01	-	-	-	1.33	-	-	-	0.05	-	-	-	0.05
27	10.07± 0.01	-	3.30± 0.002	-	3.82	-	4.34	-	0.01	-	0.003	-	0.01

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0046】請參照第 6 表所示，待測樣品編號 23-27 分別為市售之臨床

液狀藥品，各取 100 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，得知其中分別含有 0.01-0.23% 之對羥基苯甲酸酯。

【0047】此外，另取市售化妝水、膠狀化妝品、乳液狀化妝品、乳霜狀化妝品、面膜及臨床液狀藥品各一種，各取 0.1 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯（分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測）含量，結果如第 7 表所示。

【0048】第 7 表、市售樣品中對羥基苯甲酸酯含量測定。

樣品	濃度 (μl/ml)				相對標準差(%)				所占百分比(%)				
	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	MP	EP	PP	BP	總和
28	12.86± 0.260	-	-	-	12.93	-	-	-	0.13	-	-	-	0.13
29	60.38± 0.720	-	-	-	7.55	-	-	-	0.60	-	-	-	0.60
30	25.82± 0.490	-	-	-	11.98	-	-	-	0.26	-	-	-	0.26
31	27.44± 0.220	-	-	-	4.97	-	-	-	0.27	-	-	-	0.27
32	143.6± 2.220	35.68± 0.360	11.06± 0.220	29.87± 1.180	9.77	6.43	12.60	25.04	1.44	0.36	0.11	0.30	2.20
33	16.27±	-	-	-	3.45	-	-	-	0.16	-	-	-	0.16

0.09													
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

MP：對羥基苯甲酸甲酯、EP：對羥基苯甲酸乙酯、PP：對羥基苯甲酸丙酯、BP：對羥基苯甲酸丁酯

【0049】請參照第 7 表所示，待測樣品編號 28-33 分別為市售之化妝水、膠狀化妝品、乳液狀化妝品、乳霜狀化妝品、面膜及臨床液狀藥品，各取 0.1 毫克經由本發明較佳實施例檢測其中所含有之對羥基苯甲酸酯(分別針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯進行檢測)含量，得知其中分別含有 0.13-2.20%之對羥基苯甲酸酯，並且，其分析結果與以 100 毫克待測樣品進行測試結果相符，表示本發明較佳實施例之對羥基苯甲酸酯之檢測方法亦適用於檢測極少量(0.1 毫克)之樣品。

【0050】根據第 1-7 表之檢測結果，本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，針對對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯及對羥基苯甲酸丁酯均具有良好的線性關係，其定量範圍為 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ ，決定係數 (coefficient of determination, 簡稱  $R^2$ )  $\geq 0.9995$ ，相對標準偏差  $< 9.86\%$ 。並且，本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法更可以適用以檢測液狀、膠狀、乳液狀或乳霜狀等不同質地之待測樣品。

【0051】綜合上述，本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，經由該化學衍生步驟中，該衍生試劑之氯磺酰苯基與對羥基苯甲酸酯之羥基進行衍生反應，提升對羥基苯甲酸酯被辨識之辨識效率及專一性，因而僅以少量之待測樣品 (0.1-100 毫克)，即可以精確地被檢測，適用於難以取得、或較為高價之待測樣品，為本發明之功效。

【0052】再者，本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，經由該分析步驟，係可以使該接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成該氣相離子，並且根據質量分析器偵測該氣相離子之質荷比，進而計算出該待測樣品中是否含有對羥基苯甲酸酯，可以大幅減少檢測及分析之時間，達到快速待測樣品篩

檢之功效。

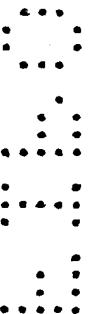
【0053】 並且，本發明之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，僅於該前處理步驟及該萃取步驟使用少量之有機溶媒，可以減少檢測過程中產生之大量有機廢液，進而達到減少環境污染之功效。

【0054】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 【符號說明】

##### 【0055】

- S1 前處理步驟
- S2 化學衍生步驟
- S3 萃取步驟
- S4 分析步驟
- S5 溫度調整步驟



#### 【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

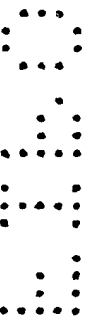
(無)

#### 【序列表】(請換頁單獨記載)

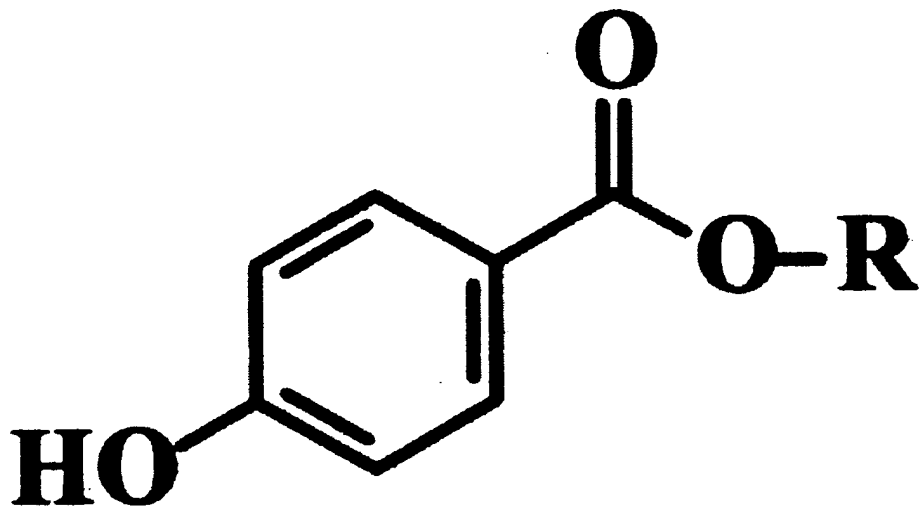
## 申請專利範圍

1. 一種對羥基苯甲酸酯之檢測方法，係包含：
  - 一前處理步驟，係將一待測樣品溶解於一溶媒，其中，該待測樣品為化妝品或藥品，經由超音波震盪及高速離心，以獲得一上清液，該上清液係含有對羥基苯甲酸酯；
  - 一化學衍生步驟，係將一衍生試劑加入該上清液，使該衍生試劑與對羥基苯甲酸酯進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之對羥基苯甲酸酯；
  - 一萃取步驟，係以一萃取溶劑萃取該衍生溶液，以獲得一萃取液，該萃取液係含有接合該標記之對羥基苯甲酸酯；及
  - 一分析步驟，係一雷射光束使接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成一氣相離子，並以一質量分析器偵測該氣相離子之質荷比，以獲得該氣相離子之分子量。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，於該前處理步驟之後，該化學衍生步驟之前，更包含一溫度調整步驟，係使該上清液之溫度調整至 30-80°C。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該衍生試劑具有氯磺酰苯基，且該氯磺酰苯基係與對羥基苯甲酸酯之羥基進行該衍生反應。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該衍生試劑係為 1,3-苯并噻唑-6-磺酰氯、4-二甲胺基苯基偶氮苯-4'-磺酰氯或丹磺酰氯。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該分析步驟中，係以波長為 330-360 nm 之一雷射光束使該接合該標記之對羥基苯甲酸酯形成該氣相離子。

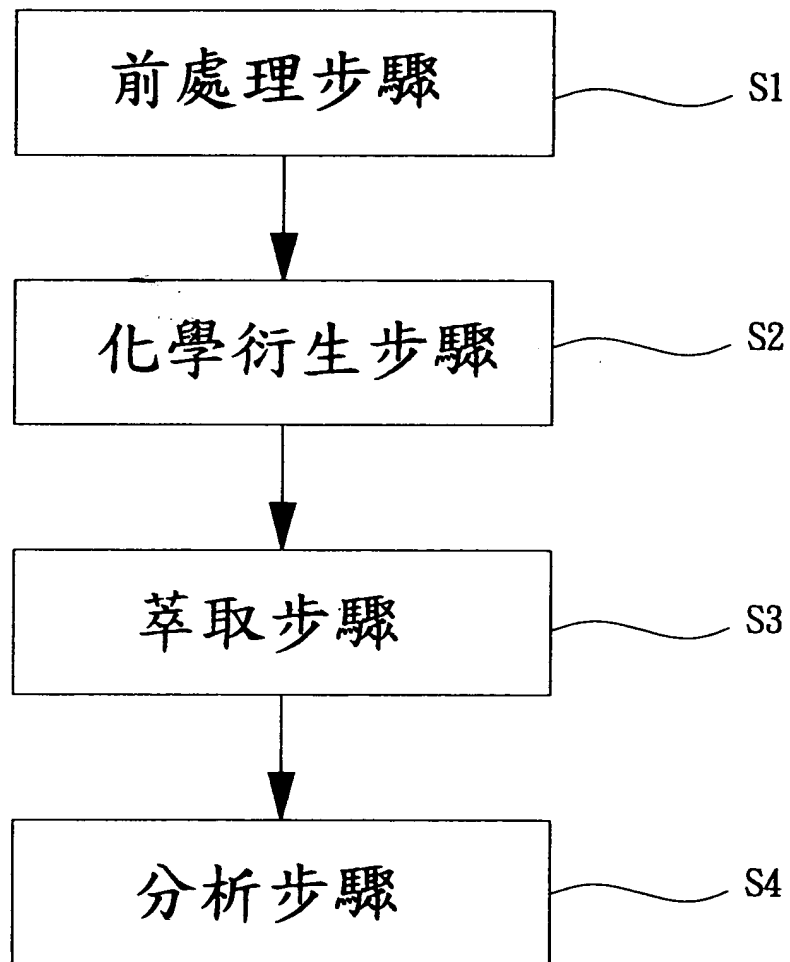
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該前處理步驟中，該待測樣品係為液狀、乳液狀、乳霜狀或膠狀。
7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，更於該上清液中添加一內部標準品，使該內部標準品與該衍生試劑進行該衍生反應。
8. 如申請專利範圍第 8 項所述之對羥基苯甲酸酯之檢測方法，其中，該化學衍生步驟中，該內部標準品係為對羥基苯甲酸酯之同位素。



圖式

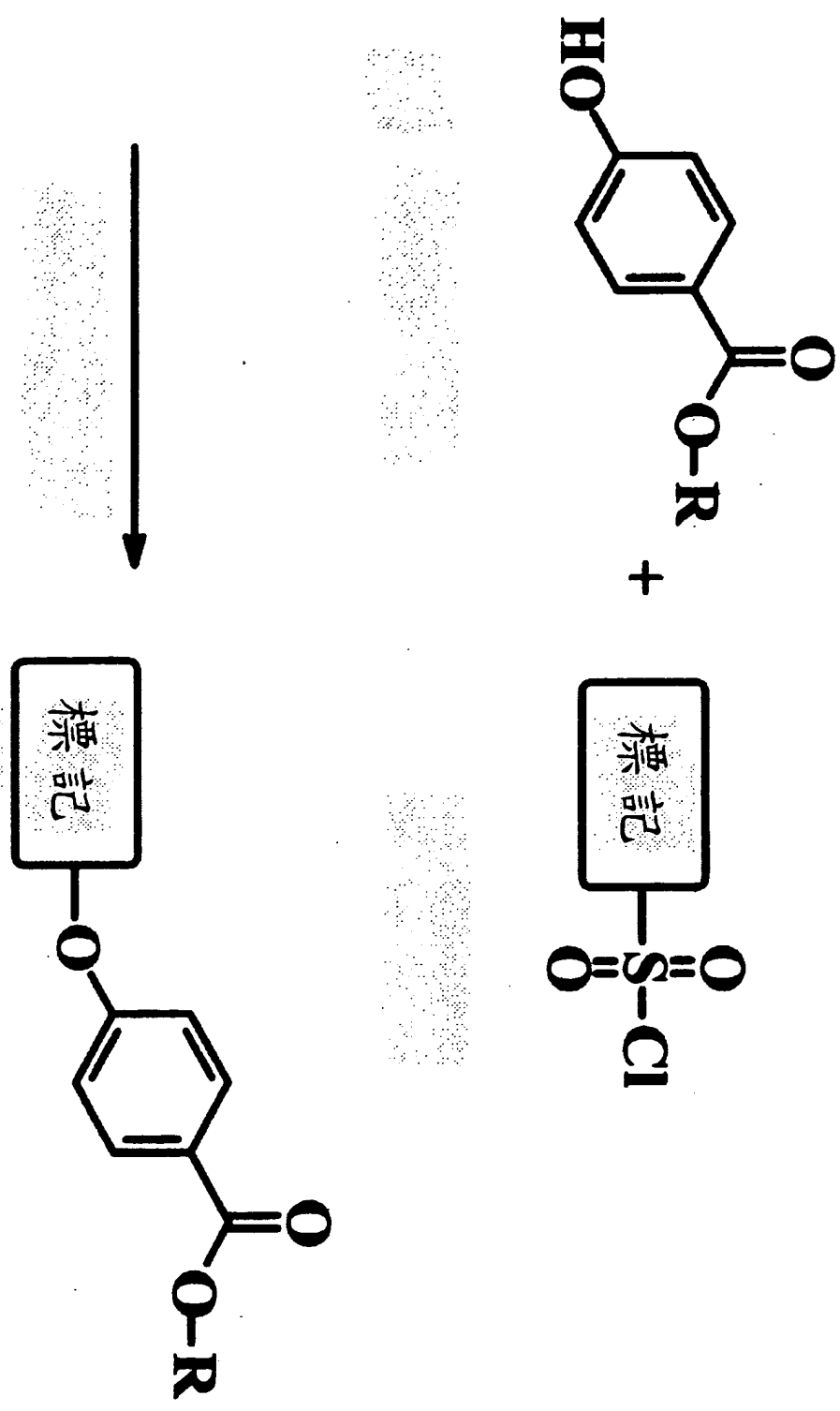


第 1 圖

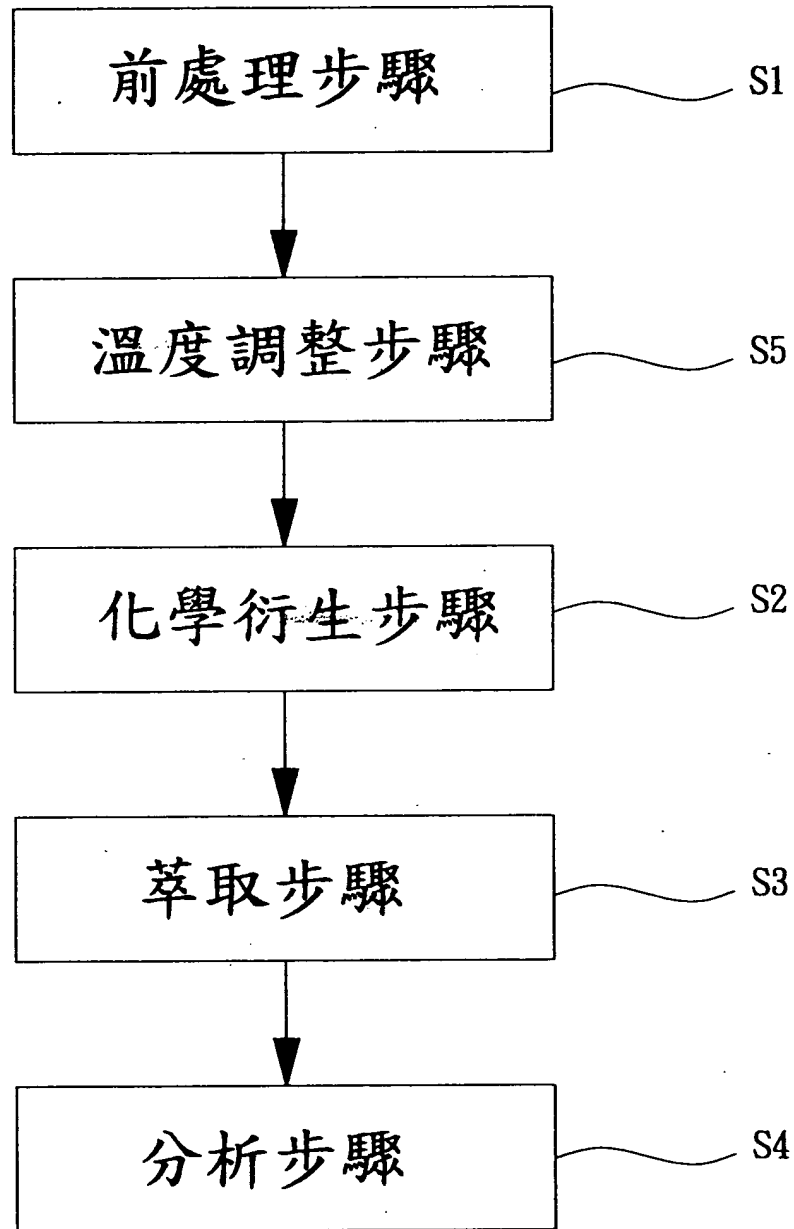


第 2 圖





第 3 圖



第 4 圖