

嬰兒配方乳品中維生素K₃之檢驗方法

Method of Test for Vitamin K₃ in Milk-Based Infant Formula

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於嬰幼兒乳品及營養品中維生素K₃ (vitamin K₃/menadione)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：大氣壓力化學游離(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 水浴槽(Water bath)：附有控溫裝置。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達8000 ×g以上者。
 - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.6. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、異丙醇及正己烷均採用液相層析級；乙醇採用分析級；甲酸、氫氧化鉀、碳酸鉀、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)及二丁基羥基甲苯(dibutyl hydroxy-toluene, BHT)均採試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ · cm以上)；脂解酶(lipase，≥ 700 unit/mg)；維生素K₃對照用標準品；維生素K₃-d₈ (vitamin K₃-d₈) 同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具與材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：1 mL及10 mL。
 - 2.3.2. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。
 - 2.3.3. 濃縮瓶：125 mL。
 - 2.3.4. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 10 M氫氧化鉀溶液：
取氫氧化鉀14 g，以去離子水溶解使成25 mL。
 - 2.4.2. 磷酸緩衝溶液：
取磷酸二氫鉀5.4 g，加入去離子水約35 mL溶解，以10 M氫氧化鉀

溶液調整pH值至 7.9 ± 0.1 ，再加去離子水使成50 mL。

2.4.3. 乙醇：甲醇(95:5, v/v)溶液：

取乙醇與甲醇以95：5 (v/v)比例混勻。

2.4.4. 含0.025% BHT之正己烷溶液：

稱取BHT 250 mg，以正己烷溶解使成1000 mL。

2.4.5. 含0.025% BHT之乙醇溶液：

稱取BHT 25 mg，以乙醇溶解使成100 mL。

2.4.6. 含0.025% BHT之甲醇溶液：

稱取BHT 25 mg，以甲醇溶解使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸0.5 mL，加入去離子水使成500 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸0.5 mL，加入異丙醇250 mL及甲醇250 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取維生素K₃-d₈同位素內部標準品約1 mg，精確稱定，以含0.025% BHT之乙醇溶液溶解並定容至1 mL，作為內部標準原液，避光冷凍儲存。臨用時取適量內部標準原液，以含0.025% BHT之甲醇溶液稀釋至10 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取維生素K₃對照用標準品約10 mg，精確稱定，以含0.025% BHT之乙醇溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，避光冷凍儲存。臨用時取適量標準溶液與內部標準溶液混合，以含0.025% BHT之甲醇溶液稀釋至0.05~2 µg/mL (含內部標準品濃度0.2 µg/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製^(註)：

將檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準品20 µL及40°C去離子水10 mL溶解，加入磷酸緩衝溶液5 mL，旋渦混合，再加入脂解酶1 g，旋渦混合2分鐘，於37°C水浴中水解2小時(每20分鐘取出旋渦混合)。取出，冷卻至室溫，加入乙醇：甲醇(95：5, v/v)溶液10 mL及碳酸鉀1 g，旋渦混合，加入含0.025% BHT之正己烷溶液15 mL，振盪10分鐘，於8000 ×g離心5分鐘，收集上層液，下層液再加入含0.025% BHT之正己烷溶液15 mL，重複上述步驟萃取3次，合

併上清液，於45°C減壓濃縮至乾後，以含0.025% BHT之甲醇溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

註：檢液調製過程需全程避光。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就維生素K₃與內部標準品之波峰面積比，與對應之維生素K₃濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜儀分析測定條件^(註)：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 µm，內徑2.1 mm × 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

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 10.0	70 → 0	30 → 100
10.0 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12.0 → 12.1	0 → 70	100 → 30
12.1 → 15.0	70 → 70	30 → 30

移動相流速：0.20 mL/min。

注入量：10 µL。

離子化模式：APCI正離子。

離子噴灑電壓(Capillary voltage)：4 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

加熱溫度(Temperature)：350°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：700 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	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)		
維生素K ₃	173> 105*	30	16
	173> 77	30	28
維生素K ₃ -d ₈ (I.S.)	181> 109	36	18

*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。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液與標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中維生素K₃之含量：

$$\text{檢體中維生素K}_3\text{含量}(\mu\text{g}/100\text{ g}) = \frac{C \times V}{M} \times 100$$

C：由標準曲線求得檢液中維生素K₃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比而得(≤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

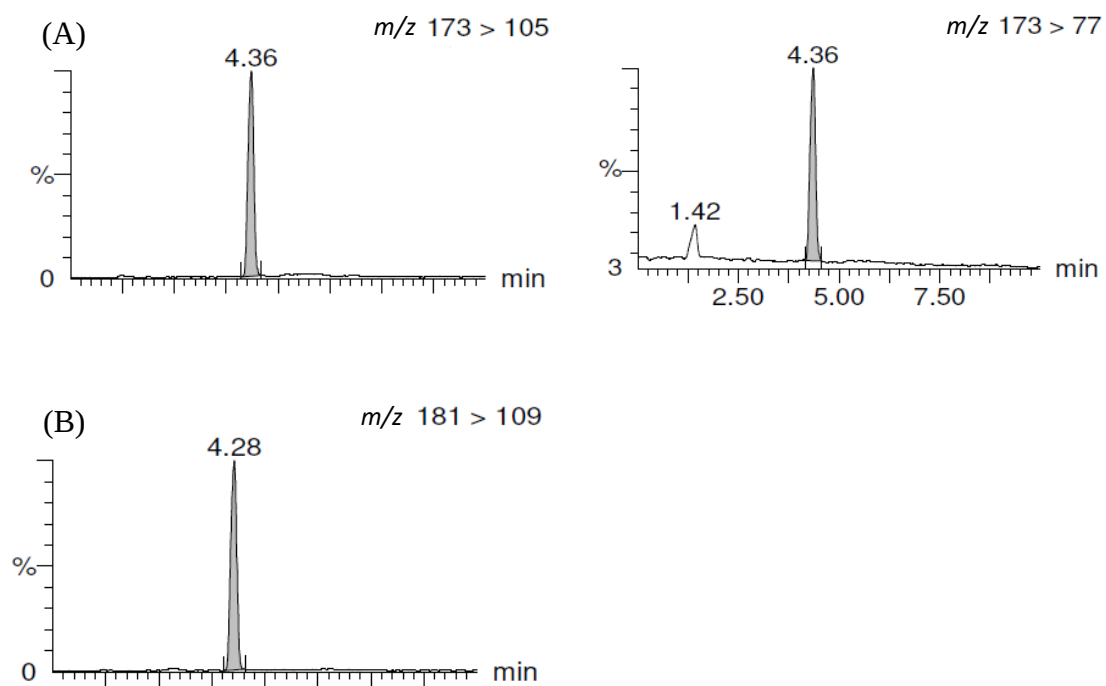
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為5 µg/100 g。

2. 檢體中若有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. European Committee for Standardization. 2003. Foodstuffs –Determination of vitamin K1 by HPLC. BS EN 14148:2003.
2. Doyle, R. M. and Cherkassky, A. 2017. LC-MS/MS quantitative analysis of the vitamin K's and their metabolites in serum for research use. Thermo Scientific Inc., Somerset, NJ, USA.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析維生素K₃標準品(A)及維生素K₃-d₈同位素內部標準品(B)之MRM圖譜