

食品中維生素D₂、D₃及K₁之檢驗方法

Method of Test for Vitamin D₂, D₃ and K₁ in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於嬰幼兒乳品及營養飲品中維生素D₂ (calciferol)、維生素D₃ (cholecalciferol)及維生素K₁ (phylloquinone)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經皂化及萃取後，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：大氣壓力化學游離正離子(positive ion 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. 磁石攪拌器(Magnetic stirrer)。
 - 2.1.3. 減壓濃縮裝置(Rotary Evaporator)。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 水浴(Water bath)。
 - 2.2. 試藥：維生素C、甲酸、乙醇(95%)、氫氧化鉀及二丁基羥基甲苯(dibutyl hydroxyl toluene, BHT)均採用試藥級；甲醇、無水乙醇、正戊烷、乙腈及異丙醇均為液相層析級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；維生素D₂、維生素D₃及維生素K₁對照用標準品；維生素D₂-d₃、維生素D₃-d₃及維生素K₁-d₇同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：5、20、25及100 mL。
 - 2.3.2. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
 - 2.3.3. 攪拌磁石：Teflon被覆。
 - 2.3.4. 皂化瓶：250 mL。
 - 2.3.5. 分液漏斗：500 mL。
 - 2.3.6. 濃縮瓶：200 mL。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 50%氫氧化鉀溶液：

稱取氫氧化鉀50 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.2. 含12.5 mg/L BHT之正戊烷溶液：

稱取BHT 12.5 mg，以正戊烷溶解使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加入去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸1 mL，加入異丙醇500 mL及乙腈500 mL，以濾膜過濾，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D₂-d₃、維生素D₃-d₃及維生素K₁-d₇同位素內部標準品各約5 mg，精確稱定，分別以乙醇溶解並定容至5 mL，作為內部標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以乙醇稀釋至2 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取維生素D₂、維生素D₃及維生素K₁對照用標準品各約5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至5 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液及內部標準溶液混合，以甲醇稀釋至維生素D₂ 0.02~1 µg/mL，維生素D₃及維生素K₁ 0.01~1 µg/mL（含內部標準品濃度0.4 µg/mL），供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

將檢體混勻後，取約5 g，精確稱定，置於皂化瓶中，加入維生素C 0.5 g及去離子水10 mL，經磁石攪拌溶解，再加入內部標準溶液1 mL、50%氫氧化鉀溶液10 mL及乙醇60 mL，於95°C水浴中迴流皂化30分鐘。加入去離子水50 mL，以流水冷卻至室溫。移入分液漏斗中，加入含12.5 mg/L BHT之正戊烷溶液100 mL，振盪萃取3分鐘，靜置分層，取上層液，以去離子水洗至中性。移入濃縮瓶中，減壓濃縮至乾。以甲醇溶解並定容至5 mL，經濾膜過濾後，作為檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

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

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：ACQUITY UPLC® BEH C18，1.7 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 1.0	50 $\rightarrow$ 70	50 $\rightarrow$ 30
1.0 $\rightarrow$ 3.0	70 $\rightarrow$ 30	30 $\rightarrow$ 70
3.0 $\rightarrow$ 10.0	30 $\rightarrow$ 0	70 $\rightarrow$ 100
10.0 $\rightarrow$ 15.0	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
15.0 $\rightarrow$ 15.1	0 $\rightarrow$ 50	100 $\rightarrow$ 50
15.1 $\rightarrow$ 19.1	50 $\rightarrow$ 50	50 $\rightarrow$ 50

移動相流速：0.2 mL/min。

管柱溫度：30°C。

注入量：10 μL 。

離子化模式：APCI⁺。

離子噴灑電壓(Capillary voltage)：4.0 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

加熱溫度(Temperature)：400°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：10 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：800 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D ₂	397 > 379*	30	10
	397 > 271	30	12
維生素D ₃	385 > 367*	43	10
	385 > 259	43	14
維生素K ₁	451 > 187*	45	22
	451 > 227	45	24
維生素D ₂ -d ₃ (I.S.)	400 > 382*	40	12
維生素D ₃ -d ₃ (I.S.)	388 > 370*	40	8
維生素K ₁ -d ₇ (I.S.)	458 > 194*	50	20

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

3.0. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各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D₂、維生素D₃或維生素K₁之含量(µg/100 g)：

$$\text{檢體中維生素D}_2\text{、維生素D}_3\text{或維生素K}_1\text{之含量(}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times V \times 100}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中維生素D₂、維生素D₃或維生素K₁之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(5 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子與定量離子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，維生素D₂為2 µg/100 g，維生素D₃及維生素K₁均為1 µg/100 g。

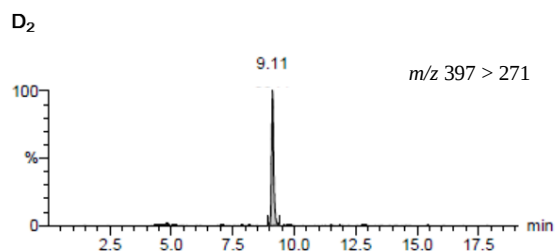
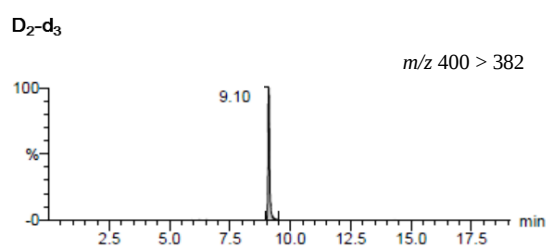
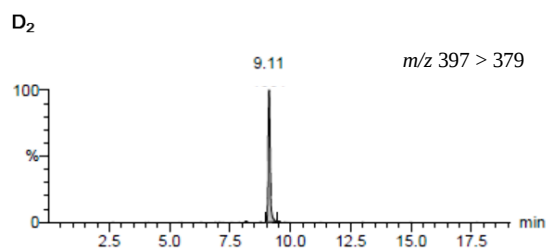
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

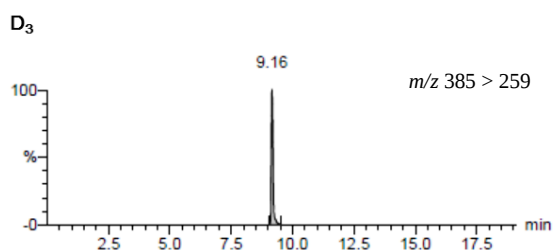
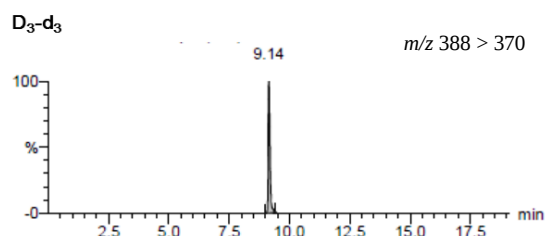
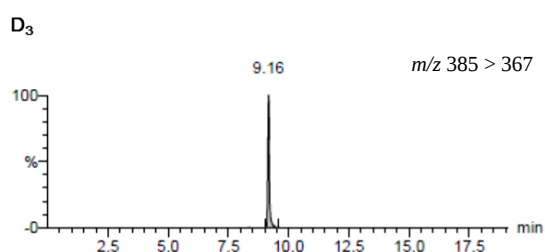
1. AOAC. 2002. Cholecalciferol (vitamin D₃) in selected foods. J. AOAC Int. 86: 400-406.
2. AOAC. 2012. Application of ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the measurement of vitamin D in infant formula and adult/pediatric nutritional formula: first action 2011.11. J. AOAC Int. 95: 319-321.

參考層析圖譜

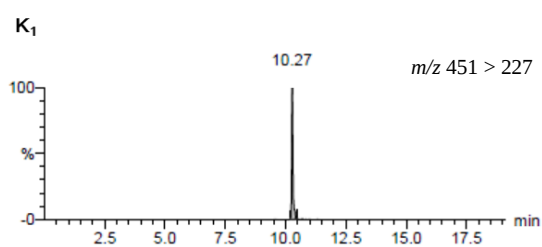
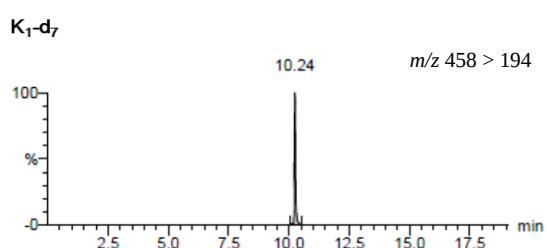
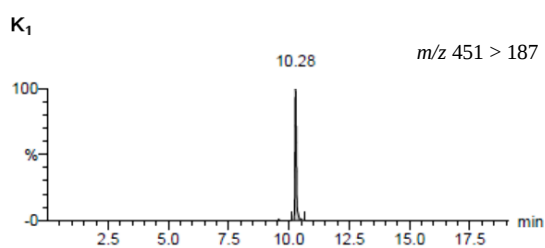
(A)



(B)



(C)



圖、以LC/MS/MS分析各維生素標準品及其內部標準品之MRM圖譜
(A)維生素 D_2 ；(B)維生素 D_3 ；(C)維生素 K_1