

食品原料(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽規格之檢驗方法
Methods of Test for Specifications of (6S)-5-Methyl-tetrahydrofolic acid,
Glucosamine Salt as Food Raw Material

1. 外觀：奶油色至淺褐色粉末。
2. 5-甲基四：利用高效液相層析法測定檢品中5-甲基四氫葉酸之含量，應為
氫葉酸 54~59% (以乾重計)。

(1)移動相溶液之調製：

- a. 移動相溶液 A：取磷酸二氫鉀 6.8 g 溶於去離子水使成 1000 mL，以 20%氫氧化鉀溶液調整 pH 值至 6.5，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作移動相溶液 A。
- b. 移動相溶液 B：取磷酸二氫鉀 4.08 g 溶於去離子水 650 mL，加入乙腈 350 mL，混合均勻，並以 20%氫氧化鉀溶液調整 pH 值至 6.5，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作移動相溶液 B。

(2)標準溶液之配製：取相當於(6S)-5-甲基四氫葉酸 40 mg 之 (6S)-5-甲基四氫葉酸鈣標準品，精確稱定，以移動相溶液 A 溶解並定容至 100 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作標準溶液。

(3)檢品溶液之調製：取本品 70 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至 100 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作檢品溶液。

(4)測定法：

精確量取檢品溶液及標準溶液各 10 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析，就檢品溶液所得波峰滯留時間及層析圖譜與標準溶液比較鑑別之，並依下列計算式求得檢品中 5-甲基四氫葉酸之含量(%)：

檢品中 5-甲基四氫葉酸之含量(%)

$$= (Ac / Astd) \times (Pstd / Pc) \times (100 / 100-m) \times 0.924$$

Ac：檢品溶液中 5-甲基四氫葉酸之波峰面積

Astd：標準溶液中 5-甲基四氫葉酸之波峰面積

Pstd：標準品取樣量(mg)

Pc：檢品取樣量(mg)

m：檢品水分含量(%)

0.924：無水 5-甲基四氫葉酸之換算因子

高效液相層析條件：

光二極體陣列檢出器：定量波長 280 nm。

層析管：C18，5 μ m，內徑 4.6 mm $\times$ 25 cm。

層析管溫度：25°C。

移動相：依(1)所調製之溶液。

移動相流速：1 mL/min。

3. 葡萄糖胺：利用高效液相層析法測定檢品中葡萄糖胺之含量，應為 34～46% (以乾重計)。

(1)稀釋液之調製：取去離子水及乙腈以 1：1 (v/v)比例混勻。

(2)移動相溶液之調製：

a. 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液：取磷酸二氫鉀 2.72 g 溶於去離子水，以 20% 氫氧化鉀溶液調整 pH 值至 7.5，加入去離子水使成 1000 mL。

b. 取乙腈及 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液以 75：25 (v/v)比例混勻，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作移動相溶液。

(3)標準溶液之配製：取葡萄糖胺鹽酸鹽標準品 180 mg，精確稱定，以稀釋液 50 mL 溶解並振盪 5 分鐘，以稀釋液定容至 100 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作標準溶液。

(4)檢品溶液之調製：取本品 350 mg，精確稱定，以稀釋液 50 mL 溶解並振盪 5 分鐘，以稀釋液定容至 100 mL，經 0.45 μ m 濾膜過濾，供作檢品溶液。

(5)測定法：

精確量取檢品溶液及標準溶液各 10 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析，就檢品溶液所得波峰滯留時間及層析圖譜與標準溶液比較鑑別之，並依下列計算式求得檢品中葡萄糖胺之含量(%)：

檢品中葡萄糖胺之含量(以乾重計)

$$= (Ac / Astd) \times (Pstd / Pc) \times (100 / 100-m) \times 0.831$$

Ac：檢品溶液中葡萄糖胺之波峰面積

Astd：標準溶液中葡萄糖胺之波峰面積

Pstd：標準品取樣量(mg)

Pc：檢品取樣量(mg)

m：檢品水分含量(%)

0.831：葡萄糖胺之換算因子

高效液相層析條件：

光二極體陣列檢出器：定量波長 195 nm。

層析管：C18-NH₂ 80A，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。

層析管溫度：35°C。

移動相溶液：依(2)所調製之溶液。

移動相流速：1.5 mL/min。

4. 非鏡像異構物純度 (Diastereoisomeric purity)：利用高效液相層析法測定檢品中(6S)-5-甲基四氫葉酸之非鏡像異構物純度，應為99%以上。

(1)磷酸緩衝溶液之調製：取磷酸二氫鈉 12 g 溶於去離子水，以 10% 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.0，加入去離子水使成 1000 mL。

(2)移動相溶液之調製：取異丙醇 60 mL 與磷酸緩衝溶液 940 mL 混勻，經 0.45 μm 濾膜過濾，供作移動相溶液。

(3)檢品溶液之調製：取本品 35 mg，精確稱定，以去離子水溶解，於 20°C 下超音波振盪 1 分鐘，以去離子水定容至 100 mL。取 5 mL，以移動相溶液稀釋至 10 mL，經 0.45 μm 濾膜過濾，供作檢品溶液。

(4)標準溶液之配製：取相當於含(6R,S)-5-甲基四氫葉酸 20 mg 之(6R,S)-5-甲基四氫葉酸鈣標準品約 25 mg，以去離子水溶解並定容至 100 mL，取 5 mL 以去離子水定容至 10 mL，供作標準溶液。

(5)測定法：

a. 系統穩定性測試：精確量取標準溶液 5 μL，注入高效液相層析儀中，並依下列條件進行分析，並依下列公式計算(6S)-5-甲基四氫葉酸與(6R)-5-甲基四氫葉酸之 Rs 值 (Resolution Factor)，應大於 2：

$$Rs \text{ 值} = 2 \times (t_2 - t_1) / (w_2 + w_1)$$

t₁：標準溶液中(6S)-5-甲基四氫葉酸之滯留時間

t_2 ：標準溶液中(6R)-5-甲基四氫葉酸之滯留時間

w_1 ：標準溶液中(6S)-5-甲基四氫葉酸之波峰半高之寬度時間

w_2 ：標準溶液中(6R)-5-甲基四氫葉酸之波峰半高之寬度時間

- b. 純度測定：精確量取檢品溶液 5 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析，並就檢品溶液所得之波峰面積，依下列計算式求得檢品中(6S)-5-甲基四氫葉酸之非鏡像異構物純度(%)：

$$\text{非鏡像異構物純度} = A_S \times 100 / (A_S + A_R)$$

A_S ：檢品溶液中(6S)-5-甲基四氫葉酸之波峰面積

A_R ：檢品溶液中(6R)-5-甲基四氫葉酸之波峰面積

高效液相層析條件：

光二極體陣列檢出器：定量波長 225 nm。

層析管：Chiral HSA (Chromtech)，5 μ m，內徑 4.0 mm
× 10 cm，或同級品。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：依(2)所調製之溶液。

移動相流速：0.7 mL/min。(調整流速使(6R)-5 甲基四氫葉酸之滯留時間約為 8.5 min)。

層析時間：20 min。

滯留時間：(6S)-5 甲基四氫葉酸約為 4.7 min；(6R)-5 甲基四氫葉酸約為 8.7 min。

5. 水分：取本品約 100 mg，精確稱定，按照費式水分測定直接滴定法測定之，其所含水分應為 8.0% 以下。

6. 氯化物：取本品 1 g，以去離子水定容至 100 mL，振搖數分鐘後過濾，作為檢品溶液。取檢品溶液 10 mL 及對照溶液(0.01 N HCl) 1.4 mL，分別置於鈉氏比色管中，加入 10% 硝酸 6 mL 及去離子水使成 50 mL，再各加入 0.1 N 硝酸銀溶液 1 mL，充分搖混，避光下反應 5 分鐘。自鈉氏比色管上方及側面觀察比較之，檢品溶液如起混濁，不得較對照溶液所呈者為濃(以 Cl 計，0.5% 以下)。

7. 乙醇：利用氣相層析-頂空進樣法，並以乙醇內部標準品測定檢品中乙醇之含量，應在5%以下。

(1)內部標準溶液之配製：取乙醇 0.5 mL，以去離子水定容至 100 mL，作為內部標準原液。臨用時取適量內部標準原液以去離子水稀釋至 250 µg/mL，供作內部標準溶液。

(2)標準溶液之配製：取乙醇對照標準品 1.0 g，精確稱定，以去離子水定容至 100 mL，作為標準原液。臨用時取適量標準原液，以去離子水稀釋至 125~10000 µg/mL，供作標準溶液。

(3)標準曲線之製作：精確量取標準溶液各 2 mL，置於頂空分析瓶中，加入內部標準溶液 2 mL，迅速以瓶蓋封瓶後，混合均勻，以配置頂空進樣器之氣相層析儀，依下列條件進行分析，就乙醇與內部標準品之波峰面積比，與對應之乙醇含量製作 0.25~20 mg 標準曲線。

頂空進樣測定條件：

檢品加熱溫度：90°C。

檢品加熱時間：30 min。

取樣針溫度：90°C。

取樣體積：1 mL。

氣相層析測定條件：

檢出器：火燄離子檢出器 (flame ionization detector, FID)。

層析管：ZB-624 毛細管，膜厚 1.8 µm，內徑 0.32 mm × 30 m，或同級品。

層析管溫度：初溫：35°C，10 min；

溫度上升速率：15°C/min；

終溫：240°C，2 min。

注入器溫度：90°C。

檢出器溫度：250°C。

移動相氣體氮氣流速：1.5 mL/min。

(4)檢液之調製：取本品 200 mg，置於頂空分析瓶中，加入去離子水 2 mL 及內部標準溶液 2 mL，迅速以瓶蓋封瓶後，

混合均勻，供作檢液。

(5)測定法：將檢液及標準溶液之頂空分析瓶置於頂空進樣器上，於 90°C 加熱 30 分鐘後，依上述條件進行氣相層析，就檢液所得波峰之滯留時間與標準溶液比較鑑別之，並由下列計算式求得檢品中乙醇之含量(%)：

$$\text{檢品中乙醇之含量(\%)} = W_{\text{EtOH}} / W_{\text{S}} \times 100$$

W_{EtOH} ：由標準曲線求得檢液中乙醇之含量(mg)

W_{S} ：檢品之採取量(mg)

8. 鉛：取本品 0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含鉛(Pb)應在 2 mg/kg 以下。
9. 鎘：取本品 0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含鎘(Cd)應在 1 mg/kg 以下。
10. 汞：取本品 0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含汞(Hg)應在 0.1 mg/kg 以下。
11. 砷：取本品 0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含砷(As)應在 2 mg/kg 以下。
12. 硼：取本品 0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含硼(B)應在 10 mg/kg 以下。

參考文獻：

1. Gnosis. 2010. Premarket notification for new dietary ingredient (6S)-5-Methyltetrahydrofolic acid, Glucosamine Salt.
2. EFSA. 2013. Scientific opinion on (6S)-5-methyltetrahydrofolic acid, glucosamine salt as a source of folate added for nutritional purposes to food supplements. EFSA Journal 2013. 11: 3358.
[<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3358>]