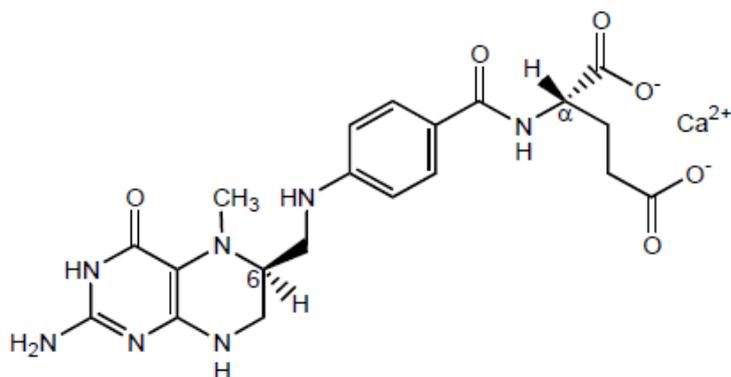


112 年 2 月 3 日衛授食字第 1121900066 號公告訂定  
並自即日生效

§ 08323

## L-5-甲基四氫葉酸鈣

### Calcium L-5-Methyltetrahydrofolate



分子式： $C_{20}H_{23}CaN_7O_6$  (無水型態)

分子量：497.5 (無水物)

1. 含量：本品所含 $C_{20}H_{23}CaN_7O_6$ 以無水物計，應為95.0~102.0%。
2. 外觀：本品為白色至淺黃色，幾乎無味，結晶狀粉末。
3. 鑑別：
  - (1)溶解度：本品微溶於水，微溶或不溶於大多數有機溶劑；可溶於鹼性溶液。
  - (2)紅外線吸收：本品按照紅外線吸收光譜測定法(1)溴化鉀錠劑法(附錄A-29)測定之，其所測得之紅外線吸收光譜應與標準品相符。
  - (3)鈣：取醋酸溶液(冰醋酸30 g加水使成100 mL) 5 mL，加入本品20 mg，再加入亞鐵氰化鉀 $[K_4Fe(CN)_6]$ 溶液(亞鐵氰化鉀5.3 g加水溶解使成100 mL) 0.5 mL，混合後加入氯化銨50 mg，形成白色結晶沉澱。
  - (4)液相層析：本品依7. D-5-甲基葉酸進行液相層析之滯留時間應與L-5-甲基四氫葉酸(L-5-methyltetrahydrofolate, L-5-MTHF)相符。
4. 水：本品按照費氏水分測定法(附錄A-14)測定之<sup>(註)</sup>，其水分含量應在17.0%以下。  
註：於測定時允許足夠時間(15分鐘)釋放結合水。
5. 鈣：取本品約250 mg，精確稱定，以去離子水150 mL溶解，加入氫氧化鈉試液(1 N) 15 mL及羥基萘酚藍(hydroxy naphthol blue) 300 mg，混合均勻，用0.05 M 乙烯二胺四醋酸二鈉液滴定至液

色呈深藍色為止，另作一空白試驗校正之，並以下列計算式求得檢品中鈣之含量(%),其所含鈣(Ca)應在7.0~8.5%(無水物)。

$$\text{檢品中鈣之含量(\%)} = [(V_S - V_B) \times M \times 40.08/W] \times 100$$

$V_S$ : 檢品溶液中0.05 M 乙烯二胺四醋酸二鈉液之消耗量(mL)

$V_B$ : 空白試驗中0.05 M 乙烯二胺四醋酸二鈉液之消耗量(mL)

$M$ : 0.05 M 乙烯二胺四醋酸二鈉液之實際莫耳濃度(mmol/mL)

$W$ : 檢品之採取量(mg)

6. 其他葉酸及相關物質: 依「12.含量測定」求得檢品中表內所列除D,L-5-甲基四氫葉酸(D,L-5-MTHF)外各成分之波峰面積，並依下列計算式求出檢品中其他葉酸及相關物質之個別含量( $X_i$ , %)<sup>(註)</sup>，將所有 $X_i$ 加總即得檢品中其他葉酸及相關物質之總含量，應在2.5%以下。

$$X_i(\%) = \frac{A_i \times W_{st} \times 459.5}{A_{st} \times W_s \times 497.5} \times F_i \times 100$$

$A_i$ : 檢品溶液中其他葉酸及相關物質之個別波峰面積

$A_{st}$ : 標準溶液中D,L-5-MTHF之波峰面積

$W_{st}$ : D,L-5-MTHF-Ca標準品之稱重量(mg)

$W_s$ : 檢品之稱取量(mg)

$F_i$ : 第*i*物質之相對感應因子(如表內所示)

459.5: L-5-MTHF之分子量

497.5: L-5-MTHF-Ca之分子量

註: 檢品中其他葉酸及相關物質之個別含量，以游離酸計。

7. D-5-甲基葉酸: 以高效液相層析法測定檢品中D-5-甲基葉酸(D-5-methyltetrahydrofolic acid, D-5-MTHF)之含量，應在1.0%以下。

- (1) 檢品溶液之調製:

取本品約50 mg，精確稱定，以去離子水定容至100 mL，供作檢品溶液。

- (2) 系統適用性測試溶液之配製:

a. 標準溶液: 取D,L-5-甲基四氫葉酸鈣(calcium D,L-5-methyltetrahydrofolate, D,L-5-MTHF-Ca)標準品(USP RS級) 50 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至100 mL，供作標準溶液。

b. 系統適用性測試溶液: 取標準溶液1.0 mL，以(1)調製之檢品溶液定容至50 mL。

- (3) 移動相溶液之調製:

取磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 4.68 g，以去離子水溶解使成1000 mL。取此溶液970 mL及乙腈(層析級) 30 mL，混合均勻，以32%氫氧化鈉溶液調整pH值至6.8，經濾膜過濾，供作移動相溶液。

(4)測定法：

精確量取檢品溶液及系統適用性測試溶液各10  $\mu\text{L}$ ，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D-5-MTHF及L-5-MTHF波峰之滯留時間與系統適用性測試溶液比較鑑別之<sup>(註1)</sup>，並依下列計算式求出檢品中D-5-MTHF之含量(%)：

$$\text{檢品中D-5-MTHF之含量(\%)} = \frac{A_D}{A_D + A_L} \times 100$$

$A_D$ ：檢品溶液中D-5-MTHF之波峰面積

$A_L$ ：檢品溶液中L-5-MTHF之波峰面積

高效液相層析條件<sup>(註2)</sup>：

紫外光或光二極體陣列檢出器：定量波長280 nm。

層析管：Chiral Protein HSA，5  $\mu\text{m}$ ，內徑4 mm  $\times$  15 cm，  
或同級品。

層析管溫度：40°C。

注入量：10  $\mu\text{L}$ 。

移動相溶液：依(3)所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

註：1. L-5-MTHF及D-5-MTHF之滯留時間約為11及15分鐘，  
二者之解析度至少應為2以上。

2. 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。

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1 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0.5 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1.0 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1.5 mg/kg以下。
12. 含量測定：以高效液相層析法測定檢品中L-5-甲基四氫葉酸鈣(calcium L-

5-methyltetrahydrofolic acid, L-5-MTHF-Ca)之含量。

(1)標準溶液之配製<sup>(註1)</sup>：

取 D,L-5- 甲 基 四 氫 葉 酸 鈣 (calcium D,L-5-methyltetrahydrofolate, D,L-5-MTHF-Ca)標準品(USP RS級)約50 mg，精確稱定，以去離子水定容至100 mL，供作標準溶液。

(2)系統適用性測試溶液之配製：

a.葉酸混合溶液：分別取葉酸(folic acid, FA)標準品(USP RS級)及4-aminobenzoylglutamic acid (ABGA)標準品(USP RS級)各25 mg，精確稱定，加入碳酸氫鈉及碳酸鈉各約15 mg，再加入適量去離子水，超音波振盪溶解，以去離子水定容至100 mL。

b.系統適用性測試溶液：取D,L-5-MTHF-Ca標準品(USP RS級)50.0 mg，置於100 mL容量瓶中，加入葉酸混合溶液1.0 mL，以去離子水溶解並定容至100 mL。

(3)檢品溶液之調製<sup>(註1)</sup>：

取本品約50 mg，精確稱定，以去離子水定容至100 mL，供作檢品溶液。

(4)移動相溶液之調製：

移動相溶液A：取磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7.80 g，溶於去離子水1000 mL，以32%氫氧化鈉溶液調整pH值至6.5，經濾膜過濾，供作移動相溶液A。

移動相溶液B：取磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 5.07 g，溶於去離子水650 mL，加入甲醇(層析級)350 mL，混合均勻，以32%氫氧化鈉溶液調整pH值至8.0，經濾膜過濾，供作移動相溶液B。

(5)系統適用性測試：

a.精確量取系統適用性測試溶液及標準溶液各10  $\mu\text{L}$ ，分別注入液相層析儀中，依下列條件進行分析。系統適用性溶液中各成分波峰之參考滯留時間、相對滯留時間及相對感應因子如下表，其中L-5-MTHF及D-5-MTHF共沖提而呈單一波峰；4 $\alpha$ -hydroxy-5-methyltetrahydrofolic acid (HOMeTHFA)、5-methyltetrahydroptericoic acid (MeTHPA)及dimethyltetrahydrofolic acid (DiMeTHFA)為D,L-5-MTHF-

Ca標準品所含之微量成分。

葉酸及相關物質	參考滯留時間 (min)	相對滯留時間	相對感應因子 (F)
4-Aminobenzoylglutamic acid (ABGA)	4.4	0.29	0.91
4 $\alpha$ -Hydroxy-5-methyltetrahydrofolic acid (HOMeTHFA)	5.6	0.37	1.09
(6 <i>R</i> )-Mefox	-	0.49	1.05
(6 <i>S</i> )-Mefox	-	0.50	1.05
Tetrahydrofolic acid (THFA)	-	0.65	1.00
7,8-Dihydrofolic acid (DHFA)	-	0.83	0.95
Folic acid (FA)	12.8	0.85	0.83
5,10-Methylenetetrahydrofolic acid (CH <sub>2</sub> THFA)	-	0.88	1.00
D,L-5-Methyltetrahydrofolic acid (D,L-5-MTHF)	15.1	1.00	1.00
5-Methyltetrahydroptericoic acid (MeTHPA)	-	1.10	0.67
Dimethyltetrahydrofolic acid (DiMeTHFA)	18.8	1.25	1.00

b.適用性要求：

- (a)系統適用性測試溶液中ABGA與HOMeTHFA之解析度(resolution)應為6以上。
- (b)系統適用性測試溶液中FA與MeTHPA之解析度應為8以上。
- (c)系統適用性測試溶液中MeTHPA與DiMeTHFA之解析度應為15以上。
- (d)3個分別配製之標準溶液所得滯留時間之相對標準偏差(relative standard deviation, RSD)應為2.0%以下。

(6)測定法：

精確量取檢品溶液及標準溶液各10  $\mu$ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢品溶液所得主要波峰之滯留時間(約15.1 min)與標準溶液比較鑑別之，並依下列計算式求出檢品中L-5-MTHF-Ca之含量(%)。

$$\text{L-5-MTHF-Ca之含量(\%)} = \frac{A_s \times W_{st}}{A_{st} \times W_s} \times \frac{(100 - D)}{(100 - M)} \times 100$$

As：檢品溶液中D,L-5-MTHF之波峰面積

Ast：標準溶液中D,L-5-MTHF之波峰面積

Wst：D,L-5-MTHF-Ca標準品之稱重量(mg)

Ws：檢品之稱取量(mg)

D：檢品中D-5-MTHF之含量(%)

M：檢品之水分含量(%)

高效液相層析條件<sup>(註2、3)</sup>：

紫外光或光二極體陣列檢出器：定量波長280 nm。

層析管：Purospher STAR RP-18e，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。

層析管溫度：32°C。

注入量：10 μL。

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 → 14	100 → 45	0 → 55
14 → 17	45 → 0	55 → 100
17 → 24	0 → 0	100 → 100
24 → 24.01	0 → 100	100 → 0
24.01 → 33	100 → 100	0 → 0

移動相流速：1.1 mL/min。

- 註：1. 標準溶液及檢品溶液配製或調製完成後應立即分析，且只能注入一次。
2. 分析後，層析管以甲醇與去離子水(85:15, v/v)混合溶液沖洗及保存。
3. 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。

參考文獻：

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2006. Monograph 1. Calcium L-5-methyltetrahydrofolate. Compendium of Food Additive Specifications.  
[[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/Monograph1/Additive-090.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-090.pdf)]
2. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2015. Calcium L-5-methyltetrahydrofolate. Food Chemical Codex 9. pp. 203-207. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD, USA.