

膠囊錠狀食品中L-5-甲基四氫葉酸鈣之檢驗方法建立

蔡沁玟 吳白玟 張淑涵 高雅敏 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

L-5-甲基四氫葉酸鈣為一種具有生物活性的維生素B₉ (葉酸)，孕期補充足夠的葉酸可降低新生兒神經管缺陷的風險，其在DNA的合成、半胱胺酸循環及同型半胱胺酸代謝的調節中扮演重要的角色。衛生福利部111年3月10日公告修正之「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」中，增訂營養添加劑「L-5-甲基四氫葉酸鈣」(Calcium L-5-methyltetrahydrofolate, L-5-MTHF-Ca)之使用範圍及限量標準：膠囊錠狀每日食用限量葉酸之總含量不得高於800 µg；其他一般食品每日食用限量葉酸之總含量不得高於600 µg；嬰兒(輔助)食品每日食用限量葉酸之總含量不得高於225 µg。本研究以衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)建議方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」擴充品項方式，以高效能液相層析法進行膠囊與錠狀食品中L-5-MTHF-Ca檢驗方法之建立。L-5-MTHF-Ca在層析圖譜中解析度良好且可與其他水溶性維生素分離度佳，確效試驗中添加低、高濃度分別為0.5及1.0 mg/g，在同日間之回收率為100.2及102.7%，變異係數為1.3及0.7%，異日間之變異係數為0.3及0.2%，定量極限為0.05 mg/g，符合食品化學檢驗方法之確效規範。以本方法驗證市售產品之適用性，結果顯示2件市售膠囊與錠狀食品中，L-5-甲基四氫葉酸鈣之含量分別為420.0及511.3 µg/粒，相當於標示值之93.2及113.4%，符合標示規範。

關鍵詞：L-5-甲基四氫葉酸鈣、高效能液相層析法

前言

一、葉酸及其相關衍生物之物理特性比較

一般英文folate常見之中文稱為葉酸或葉酸鹽⁽¹⁾，包含葉酸(Folic acid, Pteroylglutamate)及含葉酸基之麩胺酸結合物(Poly-γ-glutamyl conjugates)⁽²⁾。葉酸(Folic acid)、L-5-甲基四氫葉酸(L-5-methyltetrahydrofolate, L-5-MTHF)、L-5-甲基四氫葉酸鈣(Calcium L-5-methyltetrahydrofolate, L-5-MTHF-Ca)及(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽((6S)-

methyl-tetrahydrofolic acid, glucosamine salt, (6S)-5MTHF-GlcN)此4種化合物之化學結構皆以葉酸為主體，含有一個蝶啶(Pteridine)、對胺基苯甲酸芳香環(4-Aminobenzoic acid)及麩胺酸(Glutamic acid)⁽²⁾；L-5-甲基四氫葉酸之化學結構在蝶啶上多了一個甲基⁽²⁾；L-5-甲基四氫葉酸鈣之化學結構為L-5-甲基四氫葉酸結合鈣離子；(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽之化學結構為L-5-甲基四氫葉酸結合2個葡萄糖胺鹽。L-5-甲基四氫葉酸鈣亦稱作(6S)-5-甲基四氫葉酸鈣鹽(縮寫：(6S)-5-MTHF-Ca)⁽³⁾。葉酸、L-5-甲基四氫葉酸、L-5-甲基四氫葉酸鈣

6月旦知識庫

及(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽皆可溶解於鹼性水溶液，較不易溶於有機溶劑。

二、L-5-甲基四氫葉酸鈣對人體之重要性

葉酸缺乏症是世界各地最常見的維生素缺乏症之一，缺乏原因是由於攝取量不足、吸收不足、新陳代謝異常或藥物治療等因素，葉酸缺乏症狀包括疲勞、易怒及食慾下降，嚴重缺乏時會導致巨球性貧血或產生大量未成熟的紅血球，其他症狀包括腹痛、腹瀉、口腔潰瘍、落髮、痴呆症及抑鬱症等神經系統疾病⁽²⁾。許多研究發現，孕期補充足夠的葉酸可降低新生兒神經管缺陷的風險，因此，建議在備孕期及懷孕初期多攝取富含葉酸的營養補充劑⁽⁴⁾。此外，葉酸對於其他疾病的預防亦發揮作用，包括心血管疾病、癡呆症、部分的癌症，並可應用於維生素B₁₂缺乏症狀的患者^(5,6)。葉酸非天然存在⁽⁵⁾，是維生素的合成形式，僅存在於強化食品、營養補充劑及藥品，它缺乏輔酶活性，經攝取後在人體細胞內需再還原為具有代謝活性的四氫葉酸型式(Tetrahydrofolate Form)⁽⁶⁾。L-5-甲基四氫葉酸是葉酸於天然膳食及人體代謝循環中的主要形式⁽⁶⁾。L-5-甲基四氫葉酸鈣是L-5-甲基四氫葉酸的鈣鹽形式，使其添加於營養補充劑具穩定性⁽⁶⁾。L-5-甲基四氫葉酸在DNA的合成、半胱氨酸循環及同型半胱氨酸代謝的調節中扮演重要的角色⁽⁵⁾，比較L-5-甲基四氫葉酸和葉酸在相同濃度劑量下的生物利用率，透過葉酸在血液中的濃度和測量血漿中同型半胱氨酸作為葉酸狀態的功能指標，發現L-5-甲基四氫葉酸在改善葉酸狀態的功能指標方面與葉酸一樣有效⁽⁶⁾。

三、L-5-甲基四氫葉酸鈣與葉酸之限量標準

衛生福利部111年3月10日公告修正之「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」中，新增營養添加劑「L-5-甲基四氫葉酸鈣」使用範

圍及限量標準與現行「葉酸」一致：(一)形態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日食用限量之食品，在每日食用量中，其葉酸之總含量不得高於800 µg；(二)其他一般食品，在每日食用量或300 g食品(未標示每日食用量者)中，其葉酸之總含量不得高於600 µg；(三)嬰兒(輔助)食品，在每日食用量或300 g食品(未標示每日食用量者)中，其葉酸之總含量不得高於225 µg⁽⁷⁾。

四、L-5-甲基四氫葉酸鈣之相關檢驗方法

經查文獻，L-5-甲基四氫葉酸鈣之相關檢驗方法皆以C18為填充材料之管柱分析⁽⁸⁻¹²⁾，其中食藥署公開之建議檢驗方法「食品中游離態葉酸之檢驗方法」⁽⁸⁾應用於嬰幼兒乳品及營養飲品中，檢測成分為游離態葉酸，使用儀器為LC-MS/MS，因其基質為嬰幼兒乳品及營養飲品，故其前處理較為複雜；其他方法則應用於膠囊錠狀或食品原料，檢測成分為葉酸、L-5-甲基四氫葉酸及L-5-甲基四氫葉酸鈣，皆使用高效能液相層析儀/光二極體陣列檢出器(HPLC/DAD)進行檢測，前處理以溶劑經超音波振盪萃取、定容、過濾後上機，此外，除Chandran等人以波長245 nm檢測L-5-甲基四氫葉酸⁽⁹⁾外，其他方法則使用波長280或290 nm⁽¹⁰⁻¹²⁾。

評估前述膠囊錠狀基質中葉酸⁽¹¹⁾、L-5-甲基四氫葉酸⁽⁹⁾及L-5-甲基四氫葉酸鈣⁽¹⁰⁾檢測方法之層析及萃取條件與食藥署建議方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」⁽¹¹⁾相近，且L-5-甲基四氫葉酸鈣為水溶性維生素中葉酸之衍生物，故以食藥署公開之建議檢驗方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」⁽¹¹⁾擴增品項方式，進行L-5-MTHF-Ca之檢驗方法開發。

材料與方法

一、試驗檢體



2件膠囊狀食品檢體，1件購自網路商城、1件購自網路海外代購。自行配製確效試驗之空白樣品(含玉米澱粉32%、乳糖32%、澱粉32%、硬脂酸鎂2%及二氧化矽2%)。

二、試藥及試劑

磷酸、磷酸二氫鉀、L-半胱胺酸及乙腈皆購自Merck (Darmstadt, Germany)，磷酸三鈉購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)，均採用試藥特級。

三、標準品

對照用標準品L-5-甲基四氫葉酸(L-5-methyltetrahydrofolate)，其純度為95%及L-5-甲基四氫葉酸鈣(Calcium L-5-methyltetrahydrofolate)，其純度為94%，皆購自Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada)。對照用標準品葉酸(Folic acid)，其純度為99%，購自United States Pharmacopeia (North Bethesda, MD, USA)。

四、器具及材料

- (一)容量瓶：10 mL、50 mL及100 mL，褐色。
- (二)濾膜：孔徑0.45 μm ，Nylon材質。

五、儀器及設備

- (一)旋渦混合器(VORTEX GENIE-2, Scientific Industries, USA)
- (二)超音波振盪器(Delta Sonicator DC300H，力明儀器有限公司，臺灣)
- (三)高效能液相層析儀(Shimadzu LC-40，臺灣島津科學儀器股份有限公司，臺灣)

六、試劑之調製

- (一)pH 9.0磷酸緩衝溶液：取磷酸三鈉3.8 g，加去離子水950 mL溶解，以磷酸調整pH值至9.0，再加去離子水使成1,000 mL。

(二)10% L-半胱胺酸溶液：取L-半胱胺酸10 g，以去離子水溶解使成100 mL，臨用時調製。

(三)0.4% L-半胱胺酸緩衝溶液：取10% L-半胱胺酸溶液4 mL，加pH 9.0磷酸緩衝溶液使成100 mL，臨用時調製。

七、移動相溶液之調製

(一)移動相溶液A：取磷酸二氫鉀2.72 g，加去離子水1,990 mL溶解，以磷酸調整pH值至3.5，再加去離子水使成2,000 mL。

(二)移動相溶液B：取磷酸二氫鉀2.72 g，加去離子水1,990 mL溶解，以磷酸調整pH值至3.8，再加去離子水使成2,000 mL。

(三)移動相溶液C：乙腈。

八、標準溶液之配製

取L-5-甲基四氫葉酸鈣對照用標準品約10 mg，精確稱定，置於10 mL容量瓶中，以pH 9.0磷酸緩衝溶液溶解並定容，作為標準原液。臨用時取標準原液50 μL 置於10 mL容量瓶中，以0.4% L-半胱胺酸緩衝溶液定容，再取適量以0.4% L-半胱胺酸緩衝溶液稀釋至0.2 - 10 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

九、檢液之調製

將檢體均質混合後，取約0.2 g，精確稱定，加入10% L-半胱胺酸溶液2 mL及pH 9.0磷酸緩衝溶液45 mL，超音波振盪20分鐘，以去離子水定容至50 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

十、高效能液相層析儀分析條件

檢出器：光二極體陣列檢出器。

波長：280 nm。

層析管：Agilent Eclipse XDB-C18，5 μm ，內徑4.6 mm \times 25 cm。

移動相流速：1 mL/min。

月旦知識庫

移動相梯度：

時間(min)	A (%)	B (%)	C (%)
0 → 2	0 → 0	100 → 100	0 → 0
2 → 3	0 → 100	100 → 0	0 → 0
3 → 15	100 → 90	0 → 0	0 → 10
15 → 20	90 → 80	0 → 0	10 → 20
20 → 20.1	80 → 20	0 → 0	20 → 80
20.1 → 25	20 → 20	0 → 0	80 → 80
25 → 25.1	20 → 0	0 → 100	80 → 0
25.1 → 30	0 → 0	100 → 100	0 → 0

十一、標準曲線之製作

標準溶液依上述條件進行高效能液相層析儀分析，就L-5-甲基四氫葉酸鈣之波峰面積，與對應之L-5-甲基四氫葉酸鈣濃度，分別製作0.2 - 10 µg/mL標準曲線。

十二、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入高效能液相層析儀中，依第十節條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中L-5-甲基四氫葉酸鈣之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中L-5-甲基四氫葉酸鈣含量(mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中L-5-甲基四氫葉酸鈣之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

十三、方法確效

依據食藥署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範⁽¹³⁾」進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)。

(一)標準曲線

標準曲線部分包括6種不同濃度，線性迴歸方程式之相關係數不應低於0.99，檢液中待測物濃度應在標準曲線之線性範圍內。

(二)準確度-添加回收試驗

1. 執行方式

分別添加0.5及1.0 mg/g L-5-甲基四氫葉酸鈣標準溶液至空白樣品中，同日間及異日間皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其回收率以評估是否符合規範(85 - 110%)要求。

2. 回收率計算方式：

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{測試值}}{\text{添加值}} \times 100$$

(三)精密度-重複性及中間精密度試驗

1. 執行方式

分別添加0.5及1.0 mg/g L-5-甲基四氫葉酸鈣標準溶液至空白樣品中，同日間及異日間皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其變異係數以評估是否符合規範(重複性10%，中間精密度14%)要求。

2. 變異係數計算方式：

$$\text{變異係數(CV, \%)} = \frac{\text{標準偏差(STDEV)}}{\text{添加值}} \times 100$$

標準偏差(Standard deviation, STDEV)

(四)定量極限之評估

分別將適當濃度之L-5-甲基四氫葉酸鈣標準溶液至空白樣品中，經前處理後層析圖譜中待測物波峰之訊號/雜訊比 ≥ 10，並評估其回收率及重複性是否符合規範要求。

八、統計分析

平均值(MEAN)、標準差(STDEV)及CV%等數值以Microsoft Excel 2010軟體進行計算。



結果與討論

一、使用方法

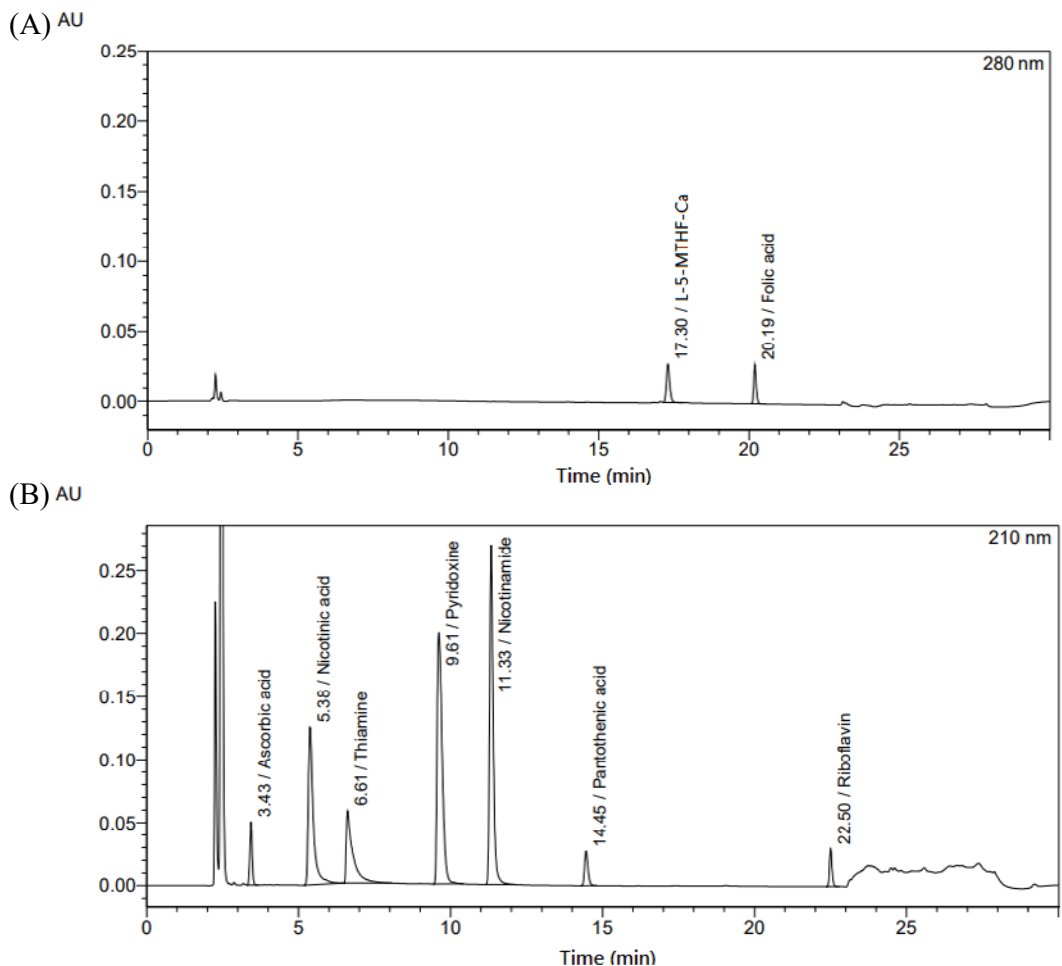
本研究經評估，以食藥署建議方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」擴增品項方式，進行L-5-甲基四氫葉酸鈣之檢驗方法開發，實驗條件與葉酸檢測方法相同，使用之萃取溶劑為含0.4%半胱胺酸之pH 9.0磷酸緩

衝溶液，偵測波長為280 nm，適用於膠囊與錠狀基質之樣品。

二、確效試驗

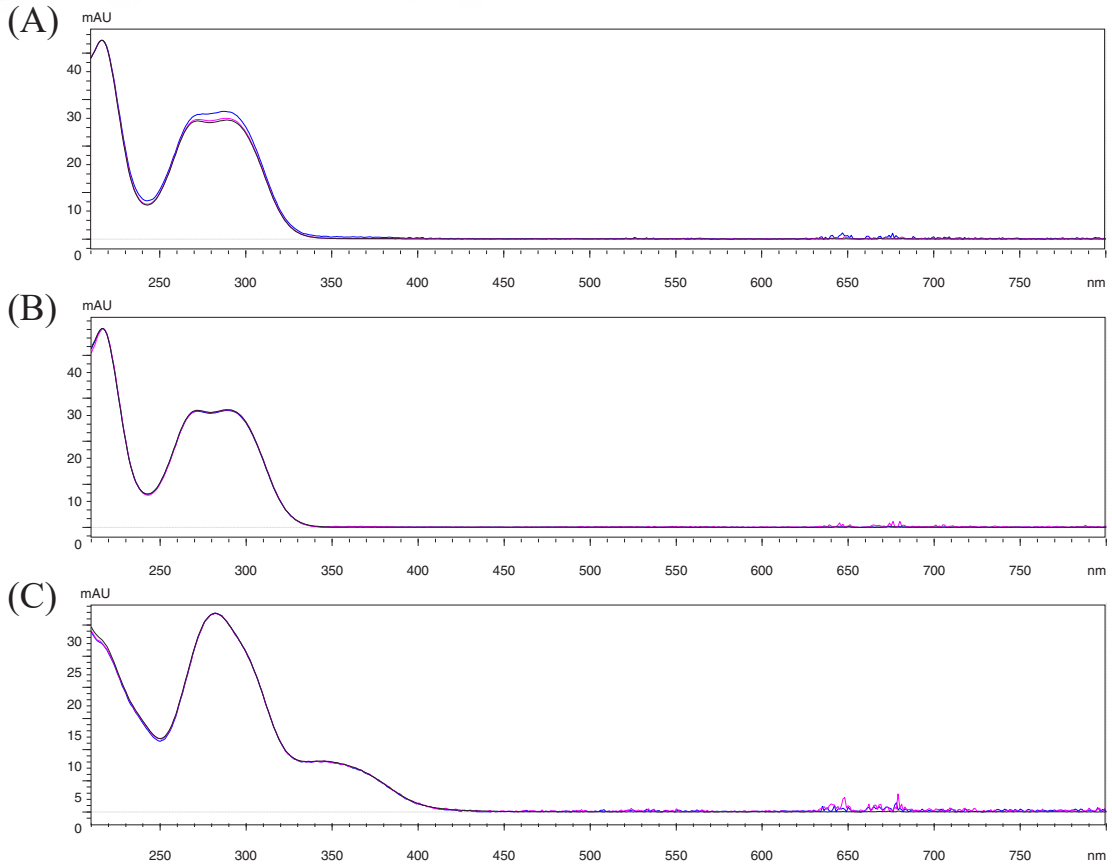
(-)專一性

L-5-甲基四氫葉酸、L-5-甲基四氫葉酸鈣及葉酸標準品之高效液相層析圖譜如圖一及圖二，由於L-5-甲基四氫葉酸鈣在水



圖一、各水溶性維生素標準品之HPLC圖譜

(A) L-5-甲基四氫葉酸(L-5-MTHF)、L-5-甲基四氫葉酸鈣(L-5-MTHF-Ca)及葉酸(Folic acid) (濃度為5 µg/mL)；(B)維生素C (Ascorbic acid)、菸鹼酸(Nicotinic acid)、維生素B₁ (Thiamine)、維生素B₆ (Pyridoxine)、菸鹼醯胺(Nicotinamide)、泛酸(Pantothenic acid) (濃度為50 µg/mL)及維生素B₂ (Riboflavin) (濃度為10 µg/mL)



圖二、L-5-甲基四氫葉酸(A)、L-5-甲基四氫葉酸鈣(B)及葉酸(C)標準品(10 $\mu\text{g/mL}$)以HPLC/DAD分析之吸收圖譜

溶液中會解離為L-5-甲基四氫葉酸與鈣離子⁽³⁾，故層析圖譜中L-5-甲基四氫葉酸與L-5-甲基四氫葉酸鈣滯留時間相同。比對食藥署建議方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」中各水溶性維生素標準品之HPLC圖譜滯留時間如圖一，L-5-甲基四氫葉酸與L-5-甲基四氫葉酸鈣及其他水溶性維生素標準品可良好分離。

(二)標準曲線

L-5-甲基四氫葉酸鈣之線性範圍為0.2 - 10 $\mu\text{g/mL}$ ， R^2 均可達0.995以上，顯示線性良好。

(三)準確度-添加回收試驗

於空白樣品中添加低、高濃度分別為0.5及1.0 mg/g 之L-5-甲基四氫葉酸鈣，同日間平均回收率分別為100.2及102.7%，異日間平均回收率分別為100.5及100.2% (表一)，顯示方法準確度符合確效規範。

(四)精密度-重複性及中間精密度試驗

於空白樣品中添加0.5及1.0 mg/g 之L-5-甲基四氫葉酸鈣，同日間變異係數分別為1.3及0.7%；異日間之變異係數分別0.3及0.2% (表一)，顯示方法之精密度符合確效規範。



(五) 定量極限之評估

添加0.05 mg/g之L-5-甲基四氫葉酸鈣於空白樣品中進行分析並計算回收率與變異係數，以評估方法之定量極限。結果如表一，同日間L-5-甲基四氫葉酸鈣之平均回收率為116.5%，變異係數為1.1%，S/N比為20.9；異日間平均回收率117.5%，變異係數為0.8%，S/N比為23.2，皆符合確效規範之要求，並符合AOAC SMPR[®] 2022.002對膠囊錠狀基質中葉酸與L-5-甲基四氫葉酸之定量極限濃度均為50 µg/g之要求⁽¹⁴⁾。

三、L-5-甲基四氫葉酸鈣檢驗方法之產品適用性驗證

以所建立之方法分析2件市售含葉酸衍生物之膠囊錠狀產品，其葉酸含量標示符合情形如表二，S1產品之葉酸型式為L-5-甲基四氫葉酸鈣，S2產品之葉酸型式為(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽，由於(6S)-5-甲基四氫葉

酸葡萄糖胺鹽於萃取溶液中會解離為L-5-甲基四氫葉酸與葡萄糖胺，其含量測定適用於本方法，即可以L-5-甲基四氫葉酸鈣為標準品進行定量^(15,16)。S1與S2產品皆以葉酸含量標示，且皆為680 mcg DFE/粒，其中DFE為Dietary Folate Equivalent (膳食葉酸當量)，可依下列公式換算成葉酸含量： $\mu\text{g DFE} = \mu\text{g food folate} + 1.7 \times \mu\text{g folic acid}$ ，公式中food folate為食物來源的葉酸，folic acid為來自補充劑或強化劑的葉酸⁽²⁾，因此：營養補充劑產品之葉酸標示(680 mcg DFE/粒)，相當於含葉酸400 µg/粒。檢測結果，S1與S2產品之L-5-甲基四氫葉酸鈣含量分別為420.0及511.3 µg/粒，乘上轉換係數： $441.4 (\text{葉酸分子量}) / 497.5 (\text{L-5-甲基四氫葉酸鈣分子量}) = 0.89$ ，換算為葉酸含量分別為372.6及453.6 µg/粒，其檢測值與標示值之百分比分別為93.2及113.4%，CV值分別為3.3及2.1%，與包裝食品營養標示應遵行事項之營養標示值誤差允許範圍 \geq 標示值之80%相符⁽¹⁷⁾，S1與S2產品之層析圖譜如圖三。S1產品標示

表一、L-5-甲基四氫葉酸鈣同日間與異日間之添加回收試驗及定量極限評估結果

添加濃度 (mg/g)	同日間(n=5)			異日間(n=10)		
	平均回收率(%)	變異係數(%)	S/N	平均回收率(%)	變異係數(%)	S/N
0.05	116.5	1.1	20.9	117.5	0.8	23.2
0.5	100.2	1.3	—	100.5	0.3	—
1.0	102.7	0.7	—	100.2	0.2	—

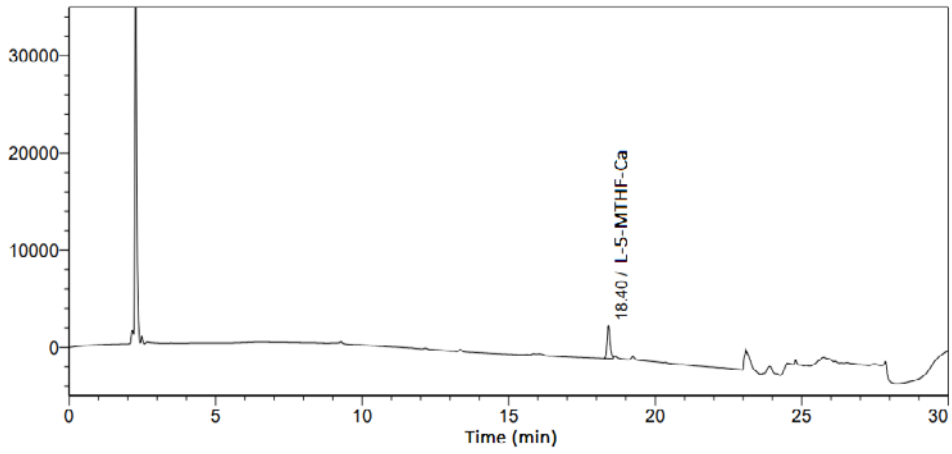
表二、L-5-甲基四氫葉酸鈣檢驗方法之產品適用性驗證

編號	標示值	標示添加型態	每日建議 食用量	檢測值(µg/粒)		檢測值/標示 值(以葉酸 計)(%)	CV (%)
				L-5-MTHF-Ca 含量	葉酸 含量 ^a		
S1	葉酸計680 mcg DFE/粒 (葉酸計400 µg/粒)	L-5-甲基四氫葉酸鈣 (L-5-MTHF-Ca)	每日1粒	420.0	372.6	93.2	3.3
S2	葉酸計680 mcg DFE/粒 (葉酸計400 µg/粒)	(6S)-5-甲基四氫葉 酸葡萄糖胺鹽((6S)- 5MTHF-GlcN)	每日1-2粒	511.3	453.6	113.4	2.1

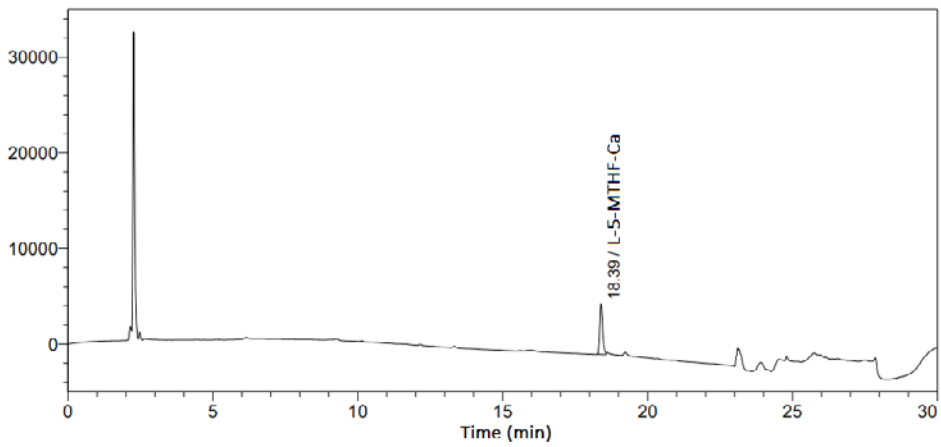
^a 葉酸含量 = L-5-MTHF-Ca含量 × 441.4 (葉酸分子量) / 497.5 (L-5-MTHF-Ca分子量)

月旦知識庫

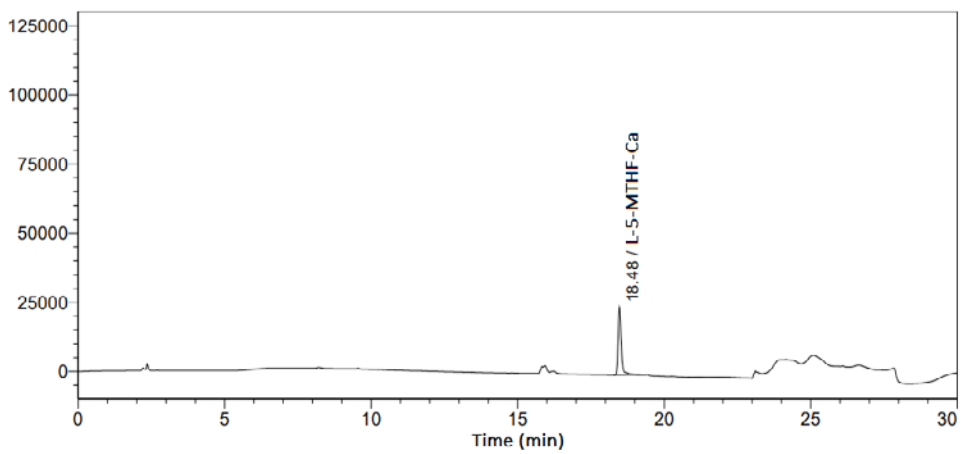
(A) uAU



(B) uAU



(C) uAU



圖三、市售產品S1 (A)、S2 (B)及標準品(C)中L-5-甲基四氫葉酸鈣之HPLC圖



每日建議食用量為1粒，因此每日食用量換算成葉酸含量為374.6 μg ，與使用限量相符，而S2產品之標示每日建議食用量1 - 2粒，倘食用2粒，換算成葉酸含量為907.2 μg ，則超過每日食用限量800 μg 。

結 論

本研究以食藥署建議檢驗方法「膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法」擴充品項方式，進行膠囊與錠狀食品中L-5-甲基四氫葉酸鈣檢驗方法之建立。L-5-甲基四氫葉酸鈣在層析圖譜中解析度良好且可與其他水溶性維生素標準品分離度佳。確效結果符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，並符合AOAC SMPR[®] 2022.002中之葉酸及L-5-甲基四氫葉酸定量極限濃度，顯示該方法適用於膠囊與錠狀食品中L-5-甲基四氫葉酸鈣之檢驗。

參考文獻

1. 國家教育研究院。2021。樂詞網。[<https://terms.naer.edu.tw/>]
2. Eitenmiller, R.R., Ye, L. and Landen, W.O. 2008. Vitamin analysis for the health and food science. 2nd ed, pp. 443. CRC Press. London, UK.
3. Turck, D., Castenmiller, J., Henauw, S.D., Hirsch-Ernst, K.I. and *et al.* 2020. Calcium L-methylfolate as a source of folate added for nutritional purposes to infant and follow-on formula, baby food and processed cereal-based food. EFSA J. 18(1): 5947.
4. Czeizel, A.E., Dudás, I., Vereczkey, A. and Bánhid, F. 2013. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. Nutrients 5: 4760-4775.
5. Miraglia, N., Agostinetti, M., Bianchi, D. and Valoti, E. 2016. Enhanced oral bioavailability of a novel folate salt: comparison with folic acid and a calcium folate salt in a pharmacokinetic study in rats. Minerva Ginecol. 68: 99-105.
6. Pietrzik, K., Bailey, L. and Shane, B. 2010. Folic acid and L-5-methyltetra-hydrofolate. Clin. Pharmacokinet. 49: 535-548.
7. 衛生福利部。2022。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。111年3月10日衛授食字第1101360128號公告修正。
8. 衛生福利部食品藥物管理署。2016。食品中游離態葉酸之檢驗方法(TFDAA0056.00)。[<https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f636694185703995790>]
9. Chandran, S., Rajarathinam, S.R.X. and Kalaiselvan, A. 2018. Simultaneous quantification of drospirenone, ethinyl estradiol and levomefolate by stability indicating RP-HPLC method. J. Anal. Bioanal. Tech. 9(4): 408.
10. Vijayalakshmi, R., Naveena, V.S.H., Rajasekhar, K. and Maithili, A.A. 2019. Method development and validation of Prevpac combination therapy drugs in spiked human plasma, Deplin and Spasmonal in pharmaceutical dosage forms by Rp-hplc methods. J. Pharm. Innov. 8(7): 61-67.
11. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。膠囊與錠狀食品中水溶性維生素之檢驗方法(TFDAA0012.03)。[<https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f636694185702925782>]
12. 衛生福利部。2019。食品原料(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽規格之檢驗方法(MOHWO0016.01)。108年5月9日衛授食字第1081900669號公告修正。



13. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。[<https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637713826789525112&type=2&cid=38868>]
14. AOAC International. 2022. Standard Method Performance Requirements (SMPRs[®]) for determination of folic acid in dietary supplements. [https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2022/09/SMPR-2022_002.pdf]
15. Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Galtier, P. and *et al.* 2013. Scientific opinion on (6S)-5-methyltetrahydrofolic acid, glucosamine salt as a source of folate added for nutritional purposes to food supplements. EFSA J. 11(10): 3358.
16. 衛生福利部。2018。食品原料(6S)-5-甲基四氫葉酸葡萄糖胺鹽之使用限制。107年3月21日衛授食字第1071300010號公告。
17. 衛生福利部。2022。包裝維生素礦物質類之錠狀膠囊狀食品營養標示應遵行事項。111年6月23日衛授食字第111130126號公告修正。



Method of Test for Calcium L-5-methyltetrahydrofolate in Foods in Tablet and Capsule Form

CHING-HSUAN TSAI, PAI-WEN WU, SHU-HAN CHANG, YA-MIN KAO,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Calcium L-5-methyltetrahydrofolate (L-5-MTHF-Ca) is the bioactive form of vitamin B₉ (folic acid), which can be used to improve periconceptional folate status to reduce the risk of neonatal neural tube defects. L-5-Methyltetrahydrofolate plays important roles in the synthesis of DNA, cysteine cycle and metabolism regulation of homocysteine. According to the “Standards for Specification, Scope, Application and Limitation of Food Additives” amended by the Ministry of Health and Welfare of March 10, 2022, L-5-MTHF-Ca is a nutritional additive as “Foods in capsule or tablet form and labeled with daily dosage: not more than 800 µg of total folic acid in daily intake». In this study, we validated and expanded the scope of the «Method of Test for Water-Soluble Vitamins in Foods in Capsule or Tablet Forms» published by the Taiwan Food and Drug Administration for L-5-MTHF-Ca by high performance liquid chromatography. The validation test was conducted by spiking 0.5 mg/g and 1.0 mg/g L-5-MTHF-Ca into blank samples. The average recoveries for inter-day analysis were 100.2 and 102.7%. The coefficients of variation for inter-day analysis were 1.3 and 0.7%, and those for intra-day analysis were 0.3 and 0.2%, respectively. The limit of quantification was 0.05 mg/g. This method was used to verify the applicability of 2 marketed products, the results showed that 2 samples were found to contain 420.0 and 511.3 µg/capsule of L-5-MTHF-Ca, which were 93.2 and 113.4% of the labeled value as folate, respectively, and were in accordance with the labeling regulation.

Key words: calcium L-5-methyltetrahydrofolate, high performance liquid