

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.12.008

同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定 婴幼儿奶粉中水溶性维生素

Determination of water-soluble vitamins in infant milk powder
by isotope dilution coupled with ultra performance liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

黄水林 何明

HUANG Shui-lin HE Ming

(深圳市深业航天食品与环境检测科技有限公司, 广东 深圳 518040)

(Shenzhen Shum Yip Space Food & Environmental Testing Technology Co., Ltd.,
Shenzhen, Guangdong 518040, China)

摘要:目的:建立同时测定婴幼儿奶粉中的多种水溶性维生素的超高效液相色谱—串联质谱法。方法:样品经温水溶解后,超声提取,使用盐酸和氢氧化钠调节 pH 至 4.6,高速离心后供 UPLC-MS/MS 测定。在电喷雾电离源(ESI)的正离子模式下进行电离,多反应监测(MRM)模式对目标碎片离子进行采集。结果:10 种水溶性维生素的内标曲线在 2.0~500.0 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内线性良好,相关系数 R^2 大于 0.998 7,加标回收试验的回收率为 85.7%~102.0%,相对标准偏差(RSD)为 1.11%~5.69%。方法检出限(LOD)为 10~50 $\mu\text{g/kg}$,方法定量限(LOQ)为 30~150 $\mu\text{g/kg}$ 。结论:该方法操作简单、耗时短、回收率好、灵敏度高、结果稳定,可应用于婴幼儿奶粉中水溶性维生素含量的测定。

关键词:同位素稀释;超高效液相色谱—串联质谱法;婴幼儿奶粉;水溶性维生素

Abstract: **Objective:** An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was established for the simultaneous determination of multiple water-soluble vitamins in infant milk powder by isotope dilution coupled with ultrasonic extraction. **Methods:** Sample was dissolved in warm water, then extracted by ultrasonic and adjusted to pH 4.6 with hydrochloric acid and sodium hydroxide. After high-speed centrifugation, finally detected by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). The ionization was carried out in the positive ion mode of the

Electrospray Ionization Source (ESI), and the target fragment ions were collected in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. **Results:** The internal standard curve of 10 water-soluble vitamins exhibited a good linearity in the concentration range of 2.0~500.0 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficient r^2 were greater than 0.998 7. The recovery rates of the standard recovery experiment were in the range of 85.7%~102.0%, while the Relative Standard Deviation (RSD) ranged from 1.11% to 5.69%. The Limit of Detection (LOD) and Quantification (LOQ) of the method were 10~50 $\mu\text{g/kg}$ and 30~150 $\mu\text{g/kg}$, respectively. **Conclusion:** The method was simple to operate, short time consumed, good recovery rate, high sensitivity and stable results that could be applied to the determination of water-soluble vitamin content in infant milk powder.

Keywords: isotope dilution; UPLC-MS/MS; water-soluble vitamins; infant milk powder

B 族维生素是人体内一类重要的水溶性维生素,在人体代谢的甲基化、三羧酸循环等过程中,起着非常重要的作用,如果摄入不够或者过量均会导致机体内的代谢难以进行,从而产生疾病^[1-3]。有研究^[4]表明,高蛋氨酸、低叶酸和维生素 B₆、B₁₂ 的饮食可能与 netrin-1 的表观遗传沉默导致的记忆丧失有关。而 B 族维生素在婴儿的正常发育中至关重要^[5-6],如果摄入不足,可能会对机体造成不可逆转的伤害^[7]。

GB 10765—2010 和 GB 10767—2010 对婴幼儿奶粉中允许添加的 8 种 B 族维生素给出了明确的限量。目前关于婴幼儿奶粉及配方食品中 B 组维生素的分析方法主要集中在光谱分析法^[8-9]、色谱分析法^[10]、色谱质谱分析法^[11-13]和微生物法^[14-16]。光谱分析法无分离步骤,每

作者简介:黄水林(1992—),男,深圳市深业航天食品与环境检测科技有限公司助理工程师,学士。

E-mail: 694662712@qq.com

收稿日期:2021-09-14

次只能测定一种目标物且受杂质影响较大。色谱分析法可同时检测多种目标物,但目标物数量太多,分离难度较大。微生物法步骤便捷,检测快速,但检测成本较高。质谱法则具有目标物选择性高,检出限低和多种化合物准确定性定量的优点,科研工作者也进行了相关研究,如陈美君等^[12]建立了同时测定 11 种水溶性维生素的串联质谱法,但未使用内标物对结果进行校正;严华等^[13]所建立的方法,虽然使用了内标进行校正,但测定 10 种水溶性维生素,需要使用两种离子化模式,并要切换流动相组成,分析时间较长。研究拟使用直接超声提取,等电点沉淀蛋白的前处理方法,建立一次进样同时测定婴幼儿配方奶粉中的 10 种水溶性维生素 B 的方法,为婴幼儿食品中多种维生素的分析提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器设备

质谱仪:API4000Q TRAP 型,美国 AB SCIEX 公司;
液相色谱系统:LC-30AD 型,日本岛津公司;

超纯水系统:Milli-Q Advantage A10 型,法国 Merck Millipore 公司;

高速冷冻离心机:1-14K 型,德国 Sigma 公司;

涡旋混匀器:IKA MS3 型,德国 IKA 公司。

1.2 试剂

标准品:泛酸(纯度 $\geq 95.8\%$)、烟酸(纯度 $\geq 98.5\%$)、烟酰胺(纯度 $\geq 98.0\%$)、叶酸(纯度 $\geq 91.3\%$)、吡哆醛(纯度 $\geq 98.0\%$)、吡哆醇(纯度 $\geq 98.5\%$)、吡哆胺(纯度 $\geq 98.2\%$)、硫酸素(纯度 $\geq 98.0\%$)、核黄素(纯度 $\geq 98.5\%$)、生物素(纯度 $\geq 99\%$),德国 Dr 公司;

内标物:泛酸-D₄(纯度 $\geq 98.0\%$)、烟酸-D₄(纯度 $\geq 98.0\%$)、烟酰胺-D₄(纯度 $\geq 98.0\%$)、叶酸-D₄(纯度 $\geq 97.0\%$)、吡哆醛-D₃(纯度 $\geq 98.5\%$)、吡哆醇-D₃(纯度 $\geq 94.5\%$)、吡哆胺-D₃(纯度 $\geq 98.0\%$)、硫酸素-¹³C₃(纯度 $\geq 97.0\%$)、核黄素-¹³C₄-¹⁵N₂(纯度 $\geq 95.0\%$)、生物素-D₄(纯度 $\geq 95.0\%$),加拿大 Research Chemical 公司;

甲醇、乙酸铵:色谱纯,美国 Fisher 公司;

盐酸、氢氧化钠、氨水:分析纯,广州化学试剂厂;

实验用水:Milli-Q 超纯水;Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统。

1.3 色谱条件优化

在相同的色谱条件下,对比 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm,1.8 μ m)和 Waters ACQUITY HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm,1.8 μ m)对多种水溶性维生素的分离效果,有机流动相为甲醇,无机流动相为 10 mmol/L 乙酸铵,设定有机相为 A 相,无机相为 B 相,进样体积 10 μ L;流速 0.3 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;梯度洗脱程序:0~2 min,2% A;2~5 min,2%~35% A;5~7 min,35%~95% A;7~9 min,95% A;9~10 min,95%~2% A;10~

15 min,2% A。

1.4 标准溶液配制

1.4.1 标准储备液 分别称取适量的维生素标准品及其同位素内标,称取适量的标准品至容量瓶中,用 0.01 mol/L 盐酸定容,配制质量浓度为 1 000 mg/L(折算标准品纯度)。其中叶酸使用 0.5%氨水配制。

1.4.2 标准中间液 10 种维生素分别取 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶,用水定容,混成 50 mg/L 标准中间液。

1.4.3 内标中间液 取 0.25 mL 于 10 mL 容量瓶,用水定容,混成 25 mg/L 标准中间液。

1.4.4 标准工作曲线 分别准确移取 2.0,10,20,50,100,200,500 μ L 的标准中间液于 50 mL 容量瓶中,加入 100 μ L 的内标溶液,用水稀释中间液至各级质量浓度为 2.0,10,20,50,100,200,500 μ g/L,得到标准系列曲线,其中内标浓度均为 50 μ g/L。

1.5 质谱条件优化

在 ESI 离子源下,采用全扫描模式和 MRM 扫描模式,气帘气 207 kPa;毛细管电压 5 000 V;离子源温度 550 $^{\circ}$ C;雾化气(GAS1)345 kPa;加热辅助气(GAS2)345 kPa;碰撞气(CAD)中等;使用流动相混合的流动注射的方式将标准溶液直接注入质谱,通过全扫描确定[M+H]⁺准分子离子峰(m/z),MRM 扫描确定最优电压。于三重四极杆串联质谱中进行测定。对最佳超声时间和基质效应进行探讨,并通过不同水平进行加标回收试验,测定日内相对标准偏差。

1.6 样品前处理优化

称取 2.5 g 配方奶粉于 50 mL 塑料离心管,加入 50 μ L 质量浓度为 25 mg/L 混合内标溶液,加入 25 mL 40~50 $^{\circ}$ C 温水,使配方奶粉充分溶解,超声(5,10,15,20,25,30 min),待样品冷却至室温后,用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 1.8,静置 2 min,再用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.6。加盖后以 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μ m 水相滤膜,根据各个化合物含量差异再用水稀释一定的倍数,使含量在线性范围内,供 UPLC-MS/MS 测定。计算出水溶性维生素的回收率,确定最优超声时间。

1.7 基质效应探究

取空白原料基粉,按照优化后的前处理方法进行处理,得到基质液,用基质液配置标准系列曲线,同时配置相同浓度的溶剂曲线(曲线均不添加内标),供仪器测定后于 Excel 软件拟合曲线方程。基质效应由基质曲线方程和溶剂曲线方程的斜率之比表示。

1.8 方法学验证

用纯水配制质量浓度为 2.0~500.0 μ g/L 的标准曲线,其中含内标 50 μ g/L。在空白的基粉中添加低浓度的混合标准溶液,按优化后的前处理方法处理,并于仪器测

定结果。以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别测定方法检出限(LOD)和方法定量限(LOQ)。同时,对样品进行测定,并按照样品本底值附近的 1,2,5 倍水平进行加标回收试验($n=6$),测定所有水溶性维生素的含量,并计算出回收率和相对标准偏差。

1.9 样品测定

随机选取 20 个实验室的日常样品,用所建立的方法对多种水溶性维生素进行测定,判断结果与明示值之间的偏差。

1.10 数据处理

多种水溶性维生素按照 1.5 方法处理,使用三重四极杆串联质谱测定不同样品的峰面积,通过内标校正曲线进行定量计算,回收率及相对标准偏差数据于 Excel 2007 软件中计算分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

试验前期比较了 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm,

1.8 μm) 和 Waters ACOUTITY HSS T3 (2.1 mm×100 mm,1.8 μm) 色谱柱对多种目标物的峰型及分离度的效果。结果发现 BEH C₁₈ 柱分离度不及 T3 色谱柱,且 C₁₈ 柱分离硫胺素和核黄素容易峰展宽。因此选择 Waters ACOUTITY HSS T3 (2.1 mm×100 mm,1.8 μm) 作为分离柱。同时,考虑到目标物的极性较大,因此选择了洗脱能力相对较弱的甲醇作为有机相,并且在水相中添加乙酸铵以增大流动相整体的离子强度,从而改善峰型,在此色谱柱及流动相条件下进一步优化梯度洗脱程序。最终 10 种水溶性维生素的 MRM 色谱图见图 1。

2.2 质谱条件的确定

由于 10 种水溶性维生素均含有亲核基团,在电喷雾电离源的正离子模式下,可形成稳定的 $[M+H]^+$ 母离子,且响应较高。虽然部分化合物在负离子模式下也有响应,但为了方便测定,最终选择在正离子模式下测定。将标准溶液以流动注射的方式注入离子源,对准分子离子及其二级子离子进行扫描,每秒采集数最多的碎片作

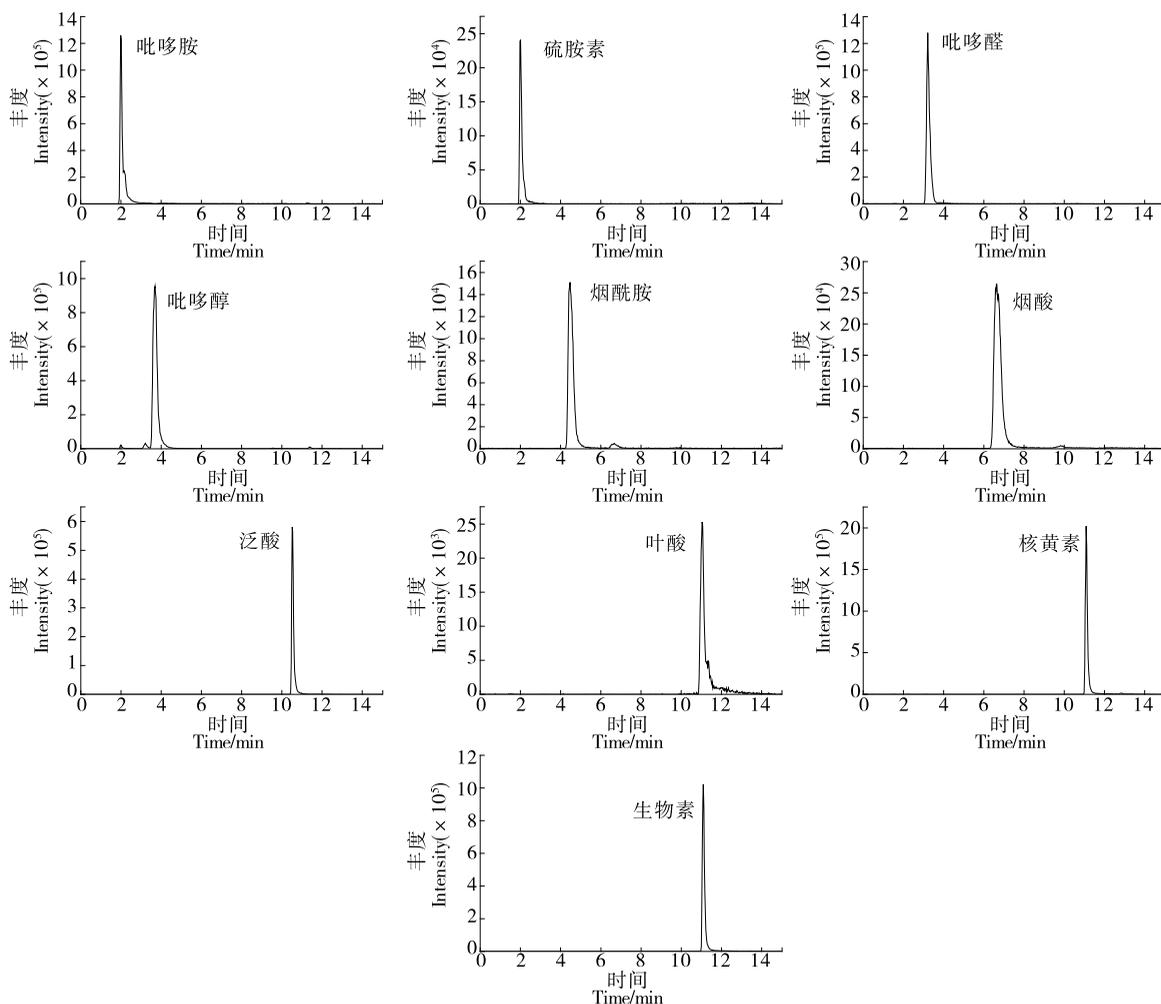


图 1 10 种水溶性维生素的 MRM 色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of ten water-soluble vitamins

为定量峰,响应次之的作为定性峰。同时,由于不同的化合物,在同一离子化模式下,会具有各自不同的最优去簇电压(DP),因此需要优化以获得较高的响应。另外不同的准分子离子在多反应监测下,进一步优化碰撞电压(CE),使最终采集方法的各个二级子离子都达到最佳响应。具体的离子参数见表1。

2.3 超声时间对外标回收率的影响

由于方法使用了内标物进行校正,所以最终回收率会较高。但为了保证较高的灵敏度,以及避免结果出现较大的偏差,需要针对外标物的实际回收率进行前处理条件的优化。为了避免基质效应带来的影响,试验前期先使用未添加10种维生素的乳粉基粉按1.4的前处理方式进行处理,同时测定本底值,所得基质液按照1.3的配制方法用以配制标准工作曲线,不添加内标。由于待测定维生素较多,因此,按照目标物的出峰时间,初步确认10种维生素的极性大小,选择不同极性的4种维生素(吡哆胺、烟酰胺、烟酸和核黄素)进行不同超声时间下的加标试验,对回收率进行考察。4种维生素在超声10 min时,回收率基本达到最大,此后变化不明显,可能是由于维生素极性均较大,在乳粉中添加后也未与基质形成稳定的结合态,但可能会在基质表面形成一定的物理吸附,当提取时间过短时,目标物未能与基质解离,并与水相形成氢键,所以回收率较低。最终,为了节省提取的时间,减少试验成本,选取10 min为最佳超声时间。详细结果见图2。虽然在不使用内标校正的情况下,10种维生素的回收率较高,但只是校正了基质效应的影响,而未对回收率进行校正,但使用内标定量,则可以在不配制基质曲线的情况下,同时校正基质效应和回收率,测定结果也更为准确。

2.4 基质效应

由于婴幼儿奶粉中含有较多的蛋白、氨基酸等水溶性杂质,在测定过程中,会对目标物的响应造成影响。一般可以通过净化或者色谱分离等手段进行除杂,但由于蛋白、氨基酸等物质含量要远大于目标物,因此一般的净化方法,基质剩余仍较多,而针对试验的前处理方法,由于维生素作为添加剂加入,为了简化试验,选用了直接超声提取,等电点沉淀蛋白的处理方法。这样导致了溶液中的杂质较多,因此试验也通过优化液相梯度洗脱程序,使目标物与基质尽可能分离,从而减少基质对目标物响应的影响。为进一步考察基质效应,使用乳粉基粉配制的标准曲线斜率 K_1 与纯水配制曲线的斜率 K_2 作比较,结果发现,10种维生素的曲线斜率比值ME(Matrix effect)为15.8%~184.0%,抑制和增强效果均超过20%,说明基质效应明显,但由于实际定量的标准曲线是含同位素内标曲线,可同时回收率和基质效应进行校正,因此尽管基质效应虽然明显,但对方法整体灵敏度影响不

表1 10种维生素的质谱分析参数[†]

Table 1 MS/MS parameters of ten water-soluble vitamins

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压 DP/V	碰撞电 压 CE/eV
泛酸	220	90*	60.0	19.0
泛酸-D ₄	220	202	60.0	5.00
烟酸	124	94*	50.0	19.0
烟酸-D ₄	124	80*	33.0	28.0
烟酰胺	128	78	33.0	26.0
烟酰胺-D ₄	123	84*	33.0	28.0
烟酰胺	123	80*	52.0	28.0
烟酰胺-D ₄	123	78	52.0	32.0
烟酰胺-D ₄	127	84*	52.0	28.0
叶酸	442	295*	51.0	20.0
叶酸-D ₄	442	176	51.0	55.0
叶酸-D ₄	446	299*	51.0	20.0
吡哆醛	168	150*	39.0	17.0
吡哆醛	168	122	39.0	26.0
吡哆醛-D ₃	171	153*	39.0	17.0
吡哆醇	170	152*	42.0	19.0
吡哆醇	170	134	42.0	25.0
吡哆醇-D ₃	172	154*	39.0	19.0
吡哆胺	169	152*	41.0	18.0
吡哆胺	169	134	41.0	22.0
吡哆胺-D ₃	172	155*	41.0	18.0
硫胺素	265	122*	40.0	18.0
硫胺素	265	144	40.0	22.0
硫胺素- ¹³ C ₃	268	122*	40.0	18.0
核黄素	377	243*	63.0	32.0
核黄素	377	198	63.0	47.0
核黄素- ¹³ C ₄ - ¹⁵ N ₂	383	249*	63.0	32.0
生物素	245	227*	55.0	19.0
生物素	245	166	55.0	31.0
生物素-D ₄	249	231*	55.0	19.0

† “*”为定量离子。

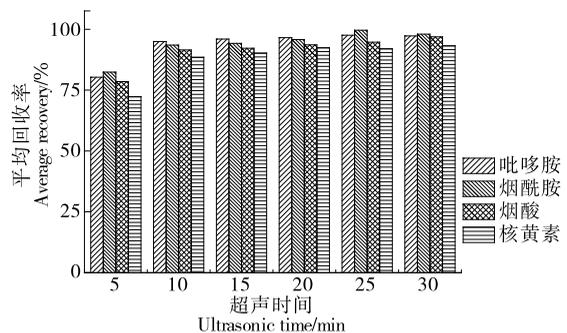


图2 超声时间对回收率的影响

Figure 2 Effect of ultrasonic time on recovery ($n=6$)

大的情况下,最终使用纯水配制的内标曲线进行定量。

2.5 线性关系、检出限和定量限

将标准系列曲线按优化后的UPLC-MS/MS条件进

行测定。10 种维生素均以外标物浓度与内标物浓度比值为横坐标,定量离子峰面积比值为纵坐标绘制校准曲线方程,见表 2。10 种维生素曲线方程的相关系数 R^2 均大于 0.998 7,相关系数较高,说明外标物在曲线浓度范围内呈良好的线性。通过对空白基粉的低浓度加标,以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别计算方法检出限为 $10 \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$,方法定量限为 $30 \sim 150 \mu\text{g}/\text{kg}$,详细结果见表 2。因为婴幼儿奶粉中,会额外添加水溶性维生素,而方法的定量限远低于一般的样品含量,同时使用内标校准的情况下,该标准曲线可准确定量。

2.6 精密度、回收率及重复性

为了验证方法的回收率,选择已添加维生素的阳性

婴幼儿配方奶粉为样品,日内平均测定 6 次,取平均值为本底值。以本底值的 3 个不同倍数水平进行标准添加回收,同一水平的样品于 24 h 内做 6 次平行试验,并根据回收率结果计算相对标准偏差。结果显示(表 3),平均回收率范围在 $85.7\% \sim 102.0\%$,回收率的相对标准偏差值 RSDs 在 $1.11\% \sim 5.69\%$ 。由于受到内标物的校正,大大降低了随机误差,所以结果的相对标准偏差值较低。同时,回收率结果中出现回收率偏差较大的情况,可能是由于样品中结合态维生素的提取存在一定的偏差,从而影响了回收率结果。综合考虑,回收率及相对标准偏差数据均能满足一般样品含量的分析测定要求,因此试验不对样品进行酶解处理。

表 2 10 种维生素的校准曲线参数、检出限及定量限

Table 2 The parameters of calibration curve and limits of detection and quantitation for ten water-soluble vitamins

名称	校正曲线	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
泛酸	$y=0.007\ 84x+0.012\ 3$	0.999 4	2.0~500.0	50	150
烟酸	$y=0.005\ 97x+0.016\ 6$	0.999 9	2.0~500.0	50	150
烟酰胺	$y=0.021\ 6x+0.026\ 6$	0.999 6	2.0~500.0	50	150
叶酸	$y=0.007\ 29x-0.048\ 4$	0.998 9	2.0~500.0	10	30
吡哆醛	$y=0.028\ 9x+0.066\ 7$	0.999 2	2.0~500.0	20	60
吡哆醇	$y=0.014\ 7x+0.012\ 5$	0.999 5	2.0~500.0	20	60
吡哆胺	$y=0.013\ 3x+0.035\ 6$	0.999 4	2.0~500.0	20	60
硫胺素	$y=0.008\ 97x-0.022\ 5$	0.999 9	2.0~500.0	10	30
核黄素	$y=0.008\ 21x+0.033\ 2$	0.999 1	2.0~500.0	10	30
生物素	$y=0.014\ 7x+0.121$	0.998 7	2.0~500.0	10	30

表 3 10 种维生素的方法学结果

Table 3 Methodological results of ten water-soluble vitamins ($n=6$)

化合物	本底/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	添加水平/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	相对标准偏差 RSD/%	化合物	本底/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	添加水平/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
泛酸	13.5	10.0	93.6	4.53	吡哆醇	4.5	5.0	89.4	3.33
		20.0	99.8	3.32			10.0	95.2	2.32
		50.0	101.0	1.11			25.0	96.6	1.59
烟酸	3.93	2.5	89.6	3.36	吡哆胺	0.5	1.0	85.7	2.96
		5.0	93.5	4.11			2.0	93.5	3.11
		12.5	99.4	2.21			5.0	93.6	2.53
烟酰胺	19.6	10.0	96.6	2.21	硫胺素	3.6	2.5	88.5	2.98
		20.0	99.9	1.53			5.0	99.3	2.59
		50.0	98.7	1.23			12.5	99.8	1.54
叶酸	0.5	1.0	89.5	4.66	核黄素	7.5	5.0	92.3	2.25
		2.0	93.5	3.32			10.0	96.5	2.05
		5.0	96.6	1.98			25.0	102.0	1.14
吡哆醛	1.0	1.0	87.5	4.52	生物素	0.15	1.0	85.7	5.69
		2.0	93.4	3.36			2.0	91.6	4.52
		5.0	98.9	2.25			5.0	96.6	3.01

2.7 方法的实际应用

为了验证方法的实用性,随机选取 20 个实验室的日常婴幼儿配方奶粉进行测定,测定结果显示,20 个样品中,10 种维生素的含量均在明示值的 85.6%~113.0%,最大偏差约为 15%。

3 结论

试验对婴幼儿配方奶粉中的 10 种水溶性维生素进行直接超声提取,优化了超声提取时间;调节 pH 至等电点,蛋白质沉淀效果良好;优化的色谱条件下,10 种维生素分离效果好,峰型对称,且通过与基质分离,一定程度上降低了基质效应;通过流动注射的方式,对 10 种维生素的各个离子对响应进行了优化,方法的检出限和定量限可满足婴幼儿奶粉中水溶性维生素的含量测定要求;回收率及其相对标准偏差结果表明,使用同位素内标校正后,方法的这两项数据都能满足测定要求。

参考文献

- [1] MAALMI H, SASSI F H, BERRAIES A, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in tunisian children: A case control study[J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(2): 234-240.
- [2] MUPPARIQOH N M, WAHYUNI W T, PUTRA B R. Detection of vitamin B₁ (thiamine) using modified carbon paste electrodes with polypyrrole[J]. *Iop Confer*, 2017, 58: 12050.
- [3] 苑凤琴. 维生素 B₆ 的药用价值探析[J]. *吉林医药学院学报*, 2013, 34(5): 362.
YUAN Feng-qin. Analysis on the medicinal value of vitamin B₆[J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2013, 34(5): 362.
- [4] KALANI A, CHATURVEDI P, KALANI K, et al. A high methionine, low folate and Vitamin B₆/B₁₂ containing diet can be associated with memory loss by epigenetic silencing of netrin-1[J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(7): 1 247-1 254.
- [5] 吴晖云, 林利平. 核黄素缺乏大鼠红细胞膜流动性与脂质过氧化关系的研究[J]. *营养学报*, 1993(4): 407-410.
WU Hui-yun, LIN Li-ping. The relationship of erythrocyte membrane fluidity with lipid peroxidation in riboflavin deficient rat[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1993(4): 407-410.
- [6] 沈思宇, 姜连阁, 侯典朋, 等. 影响婴幼儿配方奶粉中维生素 B₂ 稳定性因素[J]. *食品工业*, 2019, 40(4): 96-100.
SHEN Si-yu, JIANG Lian-ge, HOU Dian-peng, et al. Research on the factors influencing the stability of vitamin B₂ in infant formula[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(4): 96-100.
- [7] HAMPEL D, YORK E R, ALLEN L H. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk[J]. *J Chromatogr B: Analyst Technol Biomed Life Sci*, 2012, 903(16): 7-13.
- [8] 康文怀, 叶晓利, 李慧, 等. 食品中叶酸分析方法及稳定性研究进展[J]. *河北科技大学学报*, 2019, 40(5): 446-453.
- [9] KANG Wen-huai, YE Xiao-li, LI Hui, et al. Advances in research on analysis methods and stability of folic acid in food[J]. *Journal of Hebei University of Science and Technology*, 2019, 40(5): 446-453.
- [10] 江蔓, 杨智, 王凤怡, 等. 酸性双偶氮染料探针分光光度法测定奶粉中的维生素 B₁[J]. *理化检验: 化学分册*, 2016(4): 466-468.
JIANG Man, YANG Zhi, WANG Feng-yi, et al. Spectrophotometric determination of vitamin B₁ in milk powder with acid bisazo dye probe[J]. *PTCA(Part B: Chem Anal)*, 2016(4): 466-468.
- [11] 毕晓丽, 张书芬, 应璐, 等. 检测器串联法测定婴幼儿配方奶粉中多种 B 族维生素[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(2): 54-57.
BI Xiao-li, ZHANG Shu-fen, YING Lu, et al. Simultaneous determination of B Vitamins in infant formula by UPLC-DAD/FLD[J]. *China Dairy Industry*, 2019, 47(2): 54-57.
- [12] 卢兰香, 薛霞, 公丕学, 等. 婴幼儿配方乳粉和谷类辅助食品中生物素含量的测定[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(4): 45-50.
LU Lan-xiang, XUE Xia, GONG Pi-xue, et al. Determination of biotin in infant formula and cereal-based complementary foods for infants and young children[J]. *China Dairy Industry*, 2020, 48(4): 45-50.
- [13] 陈美君, 王旻, 亢美娟, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中 11 种 B 族维生素[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 144-153.
CHEN Mei-jun, WANG Min, KANG Mei-juan, et al. Simultaneous determination of 11 B vitamins in infant formula by UPLC-MS/MS[J]. *Food Science*, 2016, 37(4): 144-153.
- [14] 严华, 崔风云, 别玮, 等. 超高效液相色谱-同位素稀释质谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中 10 种水溶性维生素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 5 871-5 878.
YAN Hua, CUI Feng-yun, BIE Wei, et al. Simultaneous determination of 10 kinds of water soluble vitamins in infant formula by ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry[J]. *Food Safe Qual Detec Technol*, 2020, 11(17): 5 871-5 878.
- [15] 黄晓林, 王森, 张丽宏, 等. IFP 微孔板试剂盒检测配方乳粉中维生素 B₁₂ 方法探讨[J]. *中国乳品工业*, 2010(7): 50-51.
HUANG Xiao-lin, WANG Miao, ZHANG Li-hong, et al. Probe into assay of vitamin B₁₂ in formula milk powder by IFP microplate kit[J]. *China Dairy Industry*, 2010(7): 50-51.
- [16] 余文, 谢冠东, 陈怡文, 等. 试剂盒法快速检测婴幼儿乳粉中叶酸含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(18): 48-51.
YU Wen, XIE Guan-dong, CHEN Yi-wen, et al. Rapid determination of folic acid in infant formula by reagent kit method[J]. *Food Safe Qual Detec Technol*, 2018, 9(18): 48-51.
- [17] 王赢, 袁辰刚, 谢小珏, 等. 微孔板式微生物法快速测定婴幼儿奶粉中维生素 B₁₂ 的研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(6): 269-272.
WANG Ying, YUAN Chen-gang, XIE Xiao-yu, et al. Research on the rapid determination of vitamin B₁₂ in foods for infants by the microbiological microtiter plate test[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(6): 269-272.