

高效液相色谱法检测婴幼儿配方食品中 维生素 B₁₂ 的含量

李 贻^{1,2}, 王晓洁^{1*}, 卞菲菲¹, 贺 君², 张德殿³, 孙 萌³, 王伟宇³

(1. 鲁东大学特医食品研究院, 烟台 264025; 2. 烟台大学生命科学学院, 烟台 264005;
3. 威海鲁东特殊医学用途配方食品研究院有限公司, 威海 264309)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法快速检测婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的分析方法。**方法** 选择 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 作为色谱柱, 流动相为水+甲醇, 流速 0.5 mL/min 等度洗脱, 进样量 35 μL, 柱温 40 °C, 波长 361 nm, 样品经超声提取 15 min, 后在 8000 r/min 下冷冻离心 10 min, 离心结束后取上清液过 0.22 μm 滤膜, 上机测试。**结果** 维生素 B₁₂ 标准品在浓度 0.05~2.0 μg/mL 范围内线性良好; 相关系数 *r* 为 0.9998; 平均回收率为 91.3%; 检出限为 2 ng/mL。**结论** 该方法重复性好、简单、快速、结果准确, 可应用于婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 含量的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 婴幼儿配方食品; 维生素 B₁₂

Determination of vitamin B₁₂ in infant formula food by high performance liquid chromatography

LI Yi^{1,2}, WANG Xiao-Jie^{1*}, BIAN Fei-Fei¹, HE Jun², ZHANG De-Dian³, SUN Meng³, WANG Wei-Yu³

(1. Institute of Special Medicine and Food, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China; 3. Weihai Ludong Formula Food Research Institute Limited, Weihai 264309 China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of vitamin B₁₂ in infant formula foods by high performance liquid chromatography. **Methods** C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) was selected as the chromatographic column, the mobile phase was water+methanol (25%), the flow rate was 0.5 mL/min using isocratic elution, the injection volume was 35 μL, the column temperature was 40 °C, and the wavelength was 361 nm. The sample was extracted by ultrasonic for 15 min, and then centrifuged at 8000 r/min for 10 min. After centrifugation, the supernatant was taken through a 0.22 μm filter membrane and tested on the machine. **Results** The standard vitamin B₁₂ had good linearity within the concentration range of 0.05–2.0 μg/mL. The correlation coefficient *r* was 0.9998. The average recoveries was 91.3%, and the limit of detection was 2 ng/mL. **Conclusion** This method is repeatable, simple, rapid and accurate, which can be applied to the determination of vitamin B₁₂ in infant formula foods.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; infant formula foods; vitamin B₁₂

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2018YYSP004)

Fund: Supported by Shandong Province Key R&D Project (2018YYSP004)

*通信作者: 王晓洁, 博士, 教授, 主要研究方向为特医食品研究与开发。E-mail: wxj10304@126.com

*Corresponding author: WANG Xiao-Jie, Ph.D, Professor, School of Life Sciences, Yantai University, No. 186, Hongqi Middle Road, Zhifu District, Yantai 264025, China. E-mail: wxj10304@126.com

0 引言

婴幼儿配方食品属于特殊膳食品, 通过在基础食物中添加多种营养素而得, 对婴儿的生长发育起着重要作用^[1-2]。维生素 B₁₂(vitamin B₁₂), 又称为钴胺素, 是一类含钴的咕啉类化合物的总称^[3-4], 也是唯一含金属元素的水溶性维生素, 且人体自身不能合成^[5]。维生素 B₁₂ 是衡量婴幼儿配方食品营养的重要指标, 检测要求也更要准确^[6]。维生素 B₁₂ 的测定从最开始的微生物法, 逐渐发展为多种快速检测方法^[7-9], 例如光谱法^[10]、色谱法^[11-12]、化学电泳法^[13-14]、色谱联用质谱法^[15]以及酶联免疫法等^[16-18]。婴幼儿食品中维生素 B₁₂ 检测方法主要有微生物法、酶联免疫法、原子吸收光谱法以及液相色谱法, 但微生物法步骤烦琐、工作量大, 酶联免疫法所需试剂盒价格昂贵且不能重复使用, 原子吸收光谱法中高温难以将钴原子蒸发完全, 从而造成检测结果不准确。与上述方法相比, 液相色谱法具有高效、环保、快速、重复性好以及检测准确等特点, 已广泛应用于食品检测行业, 因此高效液相色谱法成为检测食品中维生素 B₁₂ 的首选^[19]。何文等^[19]采用液相色谱法测定奶粉中维生素 B₁₂ 的含量并探究其影响因素; 贺习文等^[20]以磷酸盐缓冲液(70%)+甲醇(30%)为流动相, 在 361 nm 波长下对饲料中维生素 B₁₂ 进行检测, 结果均较为准确。

液相色谱法检测婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的实验方法没有统一, 色谱条件各有差别, 缺少国家统一标准方法^[21-22]。本研究建立了高效液相色谱法检测婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 含量, 为婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的检测提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

婴幼儿配方食品(市售); 维生素 B₁₂ 标准品(浓度 89.1%, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司); 乙醇、硫酸锌、乙酸钠、磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(分析纯, 烟台远东精细化工有限公司); 去离子水(Mini-Q 超纯水系统制备)。

1.2 仪器设备

1260 II 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、自动进样系统、柱温箱、DAD 紫外检测器、氮吹仪)、Agilent EC-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 4.0 μm)反向色谱柱(美国安捷伦公司); Athena C₁₈-120A(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)反向色谱柱(上海安谱实验科技股份有限公司); Mini-Q 超纯水系统(法国 Mini-Q 公司); SB-5200 DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); HH 数显恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司); SHK-III 循环水式多用真空泵(郑州科泰试验设备有

限公司); TGL-20 M 台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司); ME-204 分析天平、201-K 酸度计(pH 计)[瑞士梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液的配制

硫酸锌溶液(0.5 mol/L): 称取 7.2 g 硫酸锌, 加水溶解后定容至 50 mL 容量瓶。

维生素 B₁₂ 标准储备液: 准确称取维生素 B₁₂ 标准品 10.05 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶, 用去离子水溶解后定容, 混匀, 此时浓度为 100 μg/mL, 4 °C 冰箱保存。

维生素 B₁₂ 标准工作液: 分别取适量维生素 B₁₂ 标准储备液用去离子水稀释, 配制成浓度梯度为 0.01、0.20、0.50、1.0、2.0 μg/mL 系列标准工作液。

1.3.2 样品前处理

准确称取 13.0 g 样品, 置于 100 mL 烧杯中, 加入 30 mL 去离子水充分溶解混匀, 在 45 °C 水浴锅中加热 10 min 后, 超声提取 15 min, 用 5 mol/L 盐酸溶液调节样品溶液 pH 至 4.0~4.5 之间, 后加入 5 mL 硫酸锌溶液, 最后转移至 50 mL 棕色容量瓶中, 加水至刻度线后混匀。从上述 50 mL 棕色容量瓶中吸取适量样品溶液至 10 mL 离心管中, 于 8000 r/min 4 °C 冷冻离心机中离心 10 min, 冷冻离心结束后, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到所测试溶液, 上机待测。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: Athena C₁₈-120A(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)反向色谱柱; 流动相及比值: 流动相 A(水 75%)+流动相 B(甲醇 25%); 流速(等度): 0.50 mL/min; 进样量: 35 μL; 每针运行时间: 0~22 min; 柱温: (40±0.11) °C; 检测波长: 361 nm。

2 结果与分析

2.1 线性关系分析

以维生素 B₁₂ 浓度为横坐标, 其对应的峰面积为纵坐标, 用系列标准工作液分析维生素 B₁₂ 浓度线性关系, 结果如图 1 所示。

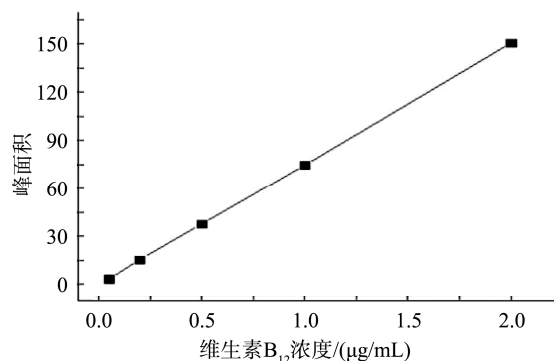


图 1 维生素 B₁₂ 标准曲线图

Fig.1 Vitamin B₁₂ standard curve

如图 1 所示, 维生素 B₁₂ 标准曲线方程为 $Y=76.769X-0.2880$, r 为 0.9998, 表明维生素 B₁₂ 溶液在浓度 0.05~2 μg/mL 范围内线性良好。

2.2 样品前处理优化

婴幼儿配方食品属于营养强化食品, 该类配方食品原料中具有多种营养物质且含量较高, 其中主要成分为蛋白质, 而蛋白质在液相色谱实验中对维生素 B₁₂ 的分离有很大的影响, 因此样品中去除蛋白质尤为重要。酸性溶液可使蛋白质发生沉淀, 如果婴幼儿配方食品原料中含有淀粉, 需先用淀粉酶对样品进行酶解。实验中分别选择乙酸钠、乙酸锌、磷酸二氢钾以及乙醇 4 种溶液分别对样品溶液进行蛋白质沉淀, 4 种溶液添加量均为 5 mL。表 1 为 4 种不同溶液对样品蛋白质沉淀的效果以及色谱峰出现情况, 结果显示, 乙酸锌溶液对样品蛋白质沉淀效果较好, 因此选择其作为蛋白质沉淀剂。

表 1 不同溶液对样品蛋白质沉淀的效果
Table 1 Effects of different solutions on protein precipitation of samples

溶液	浓度	蛋白质沉淀效果	维生素 B ₁₂ 色谱峰
乙酸钠	0.5 mol/L	一般	出峰
乙酸锌	0.5 mol/L	良好	出峰
磷酸二氢钾	0.5 mol/L	较差	未出峰
乙醇	90%	不沉淀	未出峰

2.3 液相色谱条件选择

2.3.1 色谱柱的选择

实验中选择 Athena C₁₈-120 A(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)、Agilent EC-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 4.0 μm) 2 种规格型号的 C₁₈ 反向色谱柱, 通过反复实验确定最佳液相色谱条件, 在相同的色谱条件下使用上述 2 种规格的色谱柱对样品中物质进行萃取分离, 在使用 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱时, 维生素 B₁₂ 出峰时间为(7.506±0.05) min, 使用 Athena C₁₈-120A 色谱柱时, 维生素 B₁₂ 出峰时间则为(17.996±0.15) min。Agilent EC-C₁₈ 色谱柱出峰时间早, 实验过程较短, 婴幼儿配方食品中各类营养物质含量较高, 杂峰比较多, 色谱柱不容易分离, 因此选择 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm) 柱作为萃取色谱柱, 其对样品中维生素 B₁₂ 分离效果较好, 色谱图出峰清晰, 适合样品中维生素 B₁₂ 的萃取分离。

2.3.2 流动相及比例的选择

流动相对所测样品中的物质有分离作用, 实验过程中选择不同流动相以及洗脱方式分离标准溶液以及样品溶液中维生素 B₁₂, 在其他色谱条件不变的情况下, 使用相应的流动相对标准溶液以及样品溶液进行梯度洗脱时, 未出现维生素 B₁₂ 色谱峰; 使用水(75%)+甲醇(25%)体积比的流

动相对标准溶液以及样品溶液等度洗脱时, 出现维生素 B₁₂ 色谱峰, 出峰时间为 18.105 min; 同样用水(75%)+乙腈(25%)作为流动相对标准溶液以及样品溶液等度洗脱时, 出现维生素 B₁₂ 色谱峰, 出峰时间为 18.501 min; 其他流动相在 75:25 比例对标准溶液以及样品溶液等度洗脱时, 均未发现维生素 B₁₂ 色谱峰。因此流动相选择水+甲醇且体积比为 75:25, 见表 2。

表 2 不同流动相以及洗脱方式对维生素 B₁₂ 色谱峰的影响
Table 2 Effects of different mobile phases and elution methods on the peak of vitamin B₁₂

流动相	洗脱方式	维生素 B ₁₂ 色谱峰
水-甲醇	梯度洗脱	未出峰
	75:25 比例等度洗脱	出峰
水-乙腈	梯度洗脱	未出峰
	75:25 比例等度洗脱	出峰
磷酸二氢钾-乙醇	梯度洗脱	未出峰
	75:25 比例等度洗脱	未出峰
水-乙醇	梯度洗脱	未出峰
	75:25 比例等度洗脱	未出峰

2.3.3 流速的选择

实验过程中选择 0.25 mL/min 和 0.50 mL/min 流速作为对比, 其他色谱条件不变, 结果显示(图 2、3), 0.25 mL/min 流速下, 标准溶液中维生素 B₁₂ 出峰时间为 36.296 min、峰面积为 302.399; 0.5 mL/min 流速下, 维生素 B₁₂ 出峰时间为 17.967 min、峰面积为 148.899, 与 0.25 mL/min 流速相比较, 0.5 mL/min 流速下的维生素 B₁₂ 出峰时间缩短一半, 因此选择 0.5 mL/min 流速。

2.3.4 柱温的选择

液相色谱柱温对实验结果有一定影响, 其他色谱条件不变的情况下, 选择常温 25 °C 和 40 °C 2 种温度作比较。实验中发现当柱温在 25 °C 时, 标准溶液中维生素 B₁₂ 色谱峰出峰时间为 22.989 min, 四元泵压力为 96.25 bar; 40 °C 条件下时, 维生素 B₁₂ 色谱峰出峰时间为 17.553 min, 四元泵压力为 81.05 bar。实验结果表明, 40 °C 下的维生素 B₁₂ 色谱峰出峰时间早, 四元泵压力相对较小, 而维生素 B₁₂ 化学性质稳定, 熔点高, 因此柱温选择 40 °C。

2.4 重复性实验

选择 2.0 μg/mL 浓度的维生素 B₁₂ 标准溶液, 使用 1.3.3 色谱条件, 后用高效液相色谱自动进样器连续进样 5 针, 进行重复性分析实验, 结果如表 3 所示, 维生素 B₁₂ 标准溶液平均峰面积为 148.702, RSD 为 0.48%, 检测实际浓度平均值为 2.002 μg/mL, RSD 为 1.63%, 表明仪器检测重

复性较好, 精密的和准确度较高。

2.5 加标回收率实验

从样品 A 中取 5 个平行样, 通过在样品中添加 0~350 ng 范围内不同剂量的维生素 B₁₂ 标准品, 计算检测值、回收率以及相对标准偏差, 实验结果如表 4 所示。加标回收率在 88.26%~93.25% 之间, 平均回收率为

91.3%, RSD 为 1.83%, 表明该样品加标回收效果好, 回收率高。

2.6 检出限

液相色谱检出限按照 3 倍基线噪音计算, 当信噪比(S/N) 为 3 时, 基线噪音为 0.005 mAU, 样品峰高为 0.015 mAU, 对应样品浓度为 0.002 μg/mL, 因此检出限为 2 ng/mL。

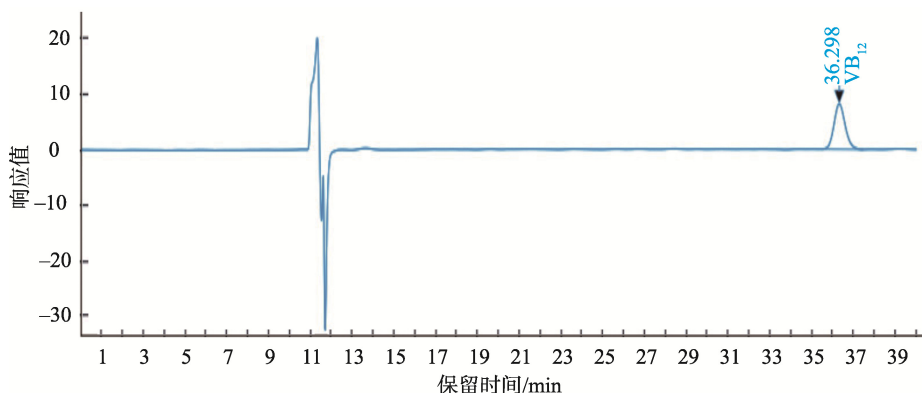


图 2 0.25 mL/min 流速下维生素 B₁₂ 标准色谱图

Fig.2 Vitamin B₁₂ standard chromatogram at a flow rate of 0.25 mL/min

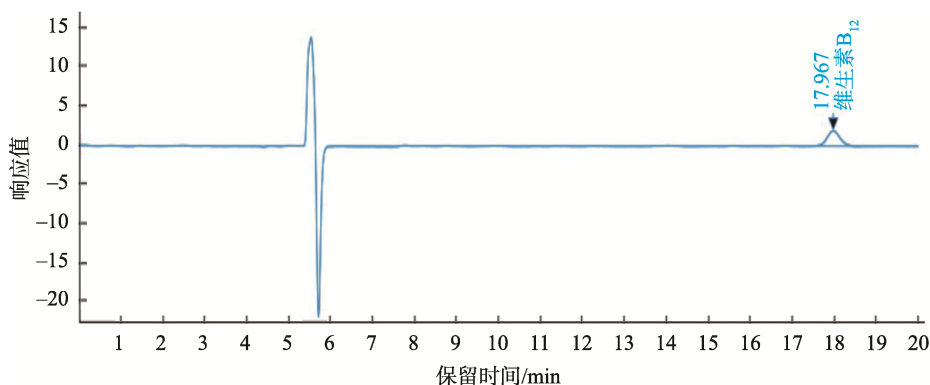


图 3 0.5 mL/min 流速下维生素 B₁₂ 标准色谱图

Fig.3 Vitamin B₁₂ standard chromatogram at a flow rate of 0.5 mL/min

表 3 重复性实验结果

Table 3 Experiment results of repeatability

编号	峰面积	结果分析	实际浓度/(μg/mL)	结果分析
1	148.996		2.011	
2	147.503	\bar{x} (平均值)=148.702	1.978	\bar{x} (平均值)=2.002 μg/mL
3	148.889	RSD=0.48%	2.008	RSD=1.63%
4	148.106		2.000	
5	150.007		2.015	

表 4 样品加标回收率实验结果
Table 4 Experiment results of sample spiked recovery

序号	VB ₁₂ 添加量/ng(重复 2 次)	检测平均值/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0	0			
2	150	132.4	88.26		
3	200	186.5	93.25	91.3	1.83
4	250	231.8	92.72		
5	300	273.0	91.00		

2.7 实际样品检测

实验中选择 3 种婴幼儿配方食品进行检测, 每种样品取 5 个平行样实验, 检测后计算维生素 B₁₂ 含量、平均值以及相对标准偏差。如表 5 所示, 样品 A、B、C 的维生素 B₁₂ 平均含量分别为 2.106、11.962、1.556 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 与样品标签值接近, RSD 分别为 0.066%、0.046%、0.054%, 婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 色谱图见图 4。标准溶液维生素 B₁₂ 色谱峰形状较好, 清晰完整, 样品的维生素 B₁₂ 色谱峰也在对应的时间出现, 样品杂峰基本集中在前面, 有利于样品中维生素 B₁₂ 的分离。

3 结论

GB 5413.14-2010^[9]标准方法中通过利用莱士曼氏乳酸杆菌对维生素 B₁₂ 的特异性和灵敏性, 对试样中维生素 B₁₂ 含量进行定量检测, 但实验步骤复杂, 菌种培养周期长、检测结果容易受微生物室环境的影响。本研究建立了高效液相色谱快速检测婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的方法, 该方法与国标微生物法相比, 不仅提高了检测效率, 也减少了烦琐的实验步骤且检测结果准确。另外通过蛋白质沉淀对比实验, 最终选择沉淀效果良好的硫酸锌溶液作

为蛋白质沉淀剂。

表 5 样品检测结果
Table 5 Results of sample test

编号	维生素 B ₁₂ 含量/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	平均值/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	RSD/%
A1	1.95		
A2	2.33		
A3	2.06	2.106	0.066
A4	2.08		
A5	2.11		
B1	12.43		
B2	12.64		
B3	11.39	11.962	0.046
B4	11.50		
B5	11.85		
C1	1.43		
C2	1.64		
C3	1.58	1.556	0.054
C4	1.52		
C5	1.61		

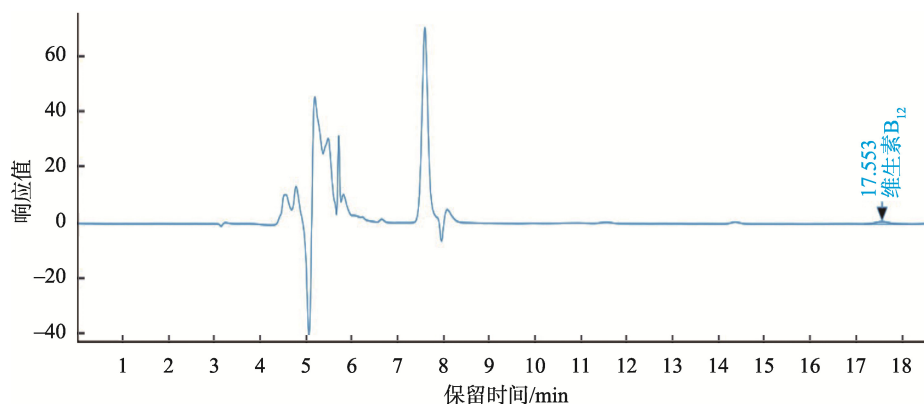


图 4 婴幼儿配方食品 A 中维生素 B₁₂ 色谱图
Fig.4 Vitamin B₁₂ chromatogram in infant formula A

本研究以婴幼儿配方食品为样品, 对样品进行前处理后, 通过建立高效液相色谱法对样品中维生素 B₁₂ 含量进行测定, 实验结果得出维生素 B₁₂ 色谱峰出峰时间为 17.553 min, 维生素 B₁₂ 标准溶液在 0.05~2.0 μg/mL 范围内线性良好, 相关系数 r 为 0.9998, 检出限为 2 ng/mL, 检测结果与样品实际值接近。表明该方法具有高效、快速、重复性好以及结果准确等特点, 不仅适用于婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的测定, 也为液相色谱检测食品中维生素 B₁₂ 提供方法借鉴。

参考文献

- [1] 台一鸿. 婴幼儿食品研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019, (6): 146-147.
TAI YH. Research progress of infant food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2019, (6): 146-147.
- [2] 王颂萍, 任发政, 罗洁, 等. 婴幼儿配方奶粉研究进展[J]. 农业机械学报, 2015, 46(4): 200-210.
WANG SP, REN FZ, LUO J, *et al.* Research progress of infant formula milk powder [J]. Trans Chin Soc AgricMach, 2015, 46(4): 200-210.
- [3] 黄力, 葛永纯. 慢性肾脏病患者补充叶酸和维生素 B₁₂ 的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(12): 1340-1344.
HUANG L, GE YC. Research progress of folic acid and vitamin B₁₂ supplementation in patients with chronic kidney disease [J]. J Med Postgrad, 2020, 33(12): 1340-1344.
- [4] SHAN SH, FAN PF, XING Y, *et al.* Experimental research of decoloring treatment on vitamin B₁₂ wastewater [J]. Appl Mech Materials, 2013, (298): 1209-1214.
- [5] 黄进丽, 杨祖伟, 陈叶兰, 等. 微生物法检测叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 接种液制备方法的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 99-105.
HUANG JL, YANG ZW, CHEN YL, *et al.* Optimization of preparation method for microbiological detection of folic acid, biotin and vitamin B₁₂ inoculum [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(1): 99-105.
- [6] 崔力航, 郭睿. 特殊医学用途婴幼儿配方食品营养成分调查分析[J]. 中国乳业, 2020, (6): 45-49.
CUI LH, GUO R. Investigation and analysis of nutritional components of infant formula food for special medical purposes [J]. China Dairy Ind, 2020, (6): 45-49.
- [7] 徐琼, 钟江, 王志伟, 等. 维生素 B₁₂ 生物合成及检测技术研究进展[J]. 食品工业, 2019, (2): 271-276.
XU Q, ZHONG J, WANG ZW, *et al.* Research progress of vitamin B₁₂ biosynthesis and detection technology [J]. Food Ind, 2019, (2): 271-276.
- [8] 何嘉明. 食品中维生素 B₁₂ 的检测方法分析[J]. 现代食品, 2019, (5): 169-171.
HE JM. Analysis of detection methods of vitamin B₁₂ in foods [J]. Mod Food, 2019, (5): 169-171.
- [9] GB 5413.14—2010 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
GB 5413.14—2010 Determination of vitamin B₁₂ in foods for infants and dairy products [S].
- [10] 李海涛, 汤盛, 于村, 等. 浊点萃取-原子吸收法间接检测食品中维生素 B₁₂ 方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 821-822.
LI HT, TANG Y, YU C, *et al.* Cloud point extraction-atomic absorption method for indirect detection of vitamin B₁₂ in food [J]. Chin J Health Inspect, 2005, 15(7): 821-822.
- [11] 李海燕. 高效液相色谱法测定饲料及饲料添加剂中的维生素 B₁₂[J]. 质量安全与检验检测, 2020, 30(5): 38-40.
LI HY. Determination of vitamin B₁₂ in feed and feed additives by high performance liquid chromatography [J]. Qual Saf Test, 2020, 30(5): 38-40.
- [12] 杨芝红, 张毓洪, 白永泽. Axsym 仪快速检测血清叶酸、维生素 B₁₂ 的临床意义[J]. 宁夏医学院学报, 2004, 26(5): 362-363.
YANG ZH, ZHANG YH, BAI YZ. The clinical significance of rapid detection of serum folic acid and vitamin B₁₂ by Axsym instrument [J]. J Ningxia Med Coll, 2004, 26(5): 362-363.
- [13] 刘淑华, 郑琰, 孙素杰. RP-HPLC 法测定维生素 B₁₂ 片的含量[J]. 中国药事, 2007, 21(10): 825-826.
LIU SH, ZHENG Y, SUN SJ. Determination of vitamin B₁₂ tablets by RP-HPLC [J]. Chin Pharm Affairs, 2007, 21(10): 825-826.
- [14] 励炯, 林伟杰, 曹青文, 等. 免疫亲和和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中的维生素 B₁₂ 总量[J]. 营养学报, 2020, 42(1): 72-77.
LI J, LIN WJ, CAO QW, *et al.* Determination of total vitamin B₁₂ in milk powder by immunoaffinity column cleanup-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acta Nutr Sin, 2020, 42(1): 72-77.
- [15] 蒋孟虹, 许萃, 秦峰, 等. 微生物法测定肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂ 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 893-897.
JIANG MH, XU P, QIN F, *et al.* Determination of trace vitamin B₁₂ in enteral nutrition powder by microbiological method [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(3): 893-897.
- [16] 刘惠, 张颖, 薛稚明, 等. 食品中维生素 B₁₂ 的测定方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, (11): 162-164.
LIU H, ZHAN Y, XUE ZM, *et al.* Research progress in the determination of vitamin B₁₂ in foods [J]. Chin J Health Inspect, 2013, (11): 162-164.
- [17] 祖新, 李潇玲, 焦成瑾. 维生素 B₁₂ 检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, (17): 200-206.
ZU X, LI XL, JIAO CJ. Research progress of vitamin B₁₂ detection methods [J]. Food Res Dev, 2019, (17): 200-206.
- [18] VERKLEIJHAGOORT A, VRIES JD, STEGERS MPG, *et al.* Validation of the assessment of folate and vitamin B₁₂ intake in women of reproductive age: The method of triads [M]. New York: New York University Press, 2007.
- [19] 何文, 李非非, 马业菲, 等. 液相色谱法测定奶粉中维生素 B₁₂ 的研究[J]. 山东化工, 2019, 48(23): 97-100.
HE W, LI FF, MA YF, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in milk powder by liquid chromatography [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(23): 97-100.
- [20] 贺习文, 李宏, 赵彩会, 等. 高效液相色谱法测定饲料及饲料添加剂中

维生素 B₁₂ 新方法的研究[J]. 饲料工业, 2019, 40(12): 32-35.

HE XW, LI H, ZHAO CH, *et al.* Study on a new method for the determination of vitamin b₁₂ in feed and feed additives by high performance liquid chromatography [J]. Feed Ind, 2019, 40(12): 32-35.

- [21] 徐琼, 王志伟, 刘洋, 等. 维生素 B₁₂ 生物合成及检测技术研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 278-283.

XU Q, WANG ZW, LIU Y, *et al.* Research progress of vitamin B₁₂ biosynthesis and detection technology [J]. Food Ind, 2019, 40(2): 278-283.

- [22] 农云军, 王飞, 窦文渊, 等. 高效液相色谱法测定婴儿奶粉中维生素 B₁₂[J]. 中国酿造, 2013, 32(9): 142-144.

NONG YJ, WANG F, DOU WY, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in infant formula powder milk by high performance liquid chromatography [J]. China Brew, 2013, 32(9): 142-144.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



李 贻, 硕士研究生, 主要研究方向为食品营养与检测。

E-mail: 1024733774@qq.com



王晓洁, 博士, 教授, 主要研究方向为特医食品研究与开发。

E-mail: wxj10304@126.com