

维生素A酯类的稳定性 及热降解动力学研究

颜景超¹, 任国谱¹, 赖鸣宇², 舒 森²

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004;

2. 湖南亚华乳业有限公司技术中心, 湖南长沙 410200)

摘 要:研究了光、温度、氧化剂、金属离子、酸碱、抗氧化剂、防腐剂、溶剂类型等因素对维生素 A 醋酸酯(RA)和维生素 A 棕榈酸酯(RP)稳定性的影响。结果表明,其均对光和高温敏感; H_2O_2 存在时 RA 不稳定; Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 引起的损失较大, Al^{3+} 引起的 RA 的损失较大;盐酸存在时都不稳定;在碱、抗氧化剂、防腐剂存在时都较稳定;维生素 A 酯类在正己烷中比在乙醇中稳定。多数情况下,RP 的稳定性高于 RA。维生素 A 酯类的热降解符合一级反应,RA 和 RP 热降解反应的活化能分别为 80.59 kJ/mol 和 100.41 kJ/mol。

关键词:维生素 A 酯类,稳定性,吸光度,残留率

Study on stabilities of retinol esters and their thermal degradation kinetics

YAN Jing-chao¹, REN Guo-pu¹, LAI Ming-yu², SHU Sen²

(1. Faculty of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2. Hunan AVA Dairy Corp. Ltd., Changsha 410200, China)

Abstract: The effects of light, temperature, oxidant, metal ions, acid, alkali, anti-oxidant, preservatives and solution type on stabilities of retinol acetate (RA) and retinol palmitate (RP) were studied. Results showed that they were sensitive to sunlight and high temperature and unstable when hydrochloric acid was existed, RA was unstable when H_2O_2 was existed. Presence of Fe^{3+} and Cu^{2+} could lead to relative more loss of retinol esters than other ions, but Al^{3+} only caused relative large loss of RA. However, they were stable when alkali, anti-oxidants or preservatives were existed. The stability of retinol esters in hexane was higher than that in ethanol. And RP usually had better stability than RA under some conditions. The thermal degradation of retinol esters obeyed first order kinetics, activity energy of RA and RP were 80.59 kJ/mol and 100.41 kJ/mol, respectively.

Key words: retinol esters; stability; absorbency; retention rate

中图分类号: Q569

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)09-0073-05

维生素 A 是大多数生命形式不可缺少的重要物质,其在维持视觉健康和上皮细胞完整、参与生长生殖及维持免疫系统的完整性等方面发挥着重要作用^[1]。全球近 1.27 亿儿童存在维生素 A 缺乏现象(血清视黄醇含量低于 $0.7 \mu\text{mol/L}$),其中近 440 万学龄前儿童因缺乏维生素 A 出现干眼病^[2]。我国属于轻度缺乏国家,部分地区为重度亚临床及中度临床缺乏^[3]。在发达国家,食品强化已成为一种有效防止维生素 A 缺乏的方式,通过食品强化来防止维生素 A 缺乏具有广泛的社会认同性,并且可以最低程度

地改变原有饮食习惯^[4]。在我国,维生素 A 类营养强化剂在婴儿食品、乳制品和乳饮料等食品中应用广泛,其允许添加的种类包括 RA 和 RP^[5]。国内外都曾研究过光照、溶剂类型等因素对化妆品或药品中维生素 A 酯类稳定性的影响,并报道维生素 A 酯类可降解产生多种环氧化物并可诱导脂肪过氧化^[6-11]。但目前尚未见有系统研究维生素 A 酯类营养强化剂稳定性的报道。本文较为系统地研究了以上两种营养强化剂在不同条件下的稳定性,对于更好地利用维生素 A 酯类营养强化剂和避免因降解带来的潜在风险有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

RA、RP(食品级) 德国 BASF 公司;无水乙醇,正己烷,双氧水(30 %),氯化钠,氯化钾,氯化镁,氯

收稿日期: 2009-07-27

作者简介: 颜景超(1987-),男,在读硕士研究生,研究方向:农产品贮藏与加工。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAD04A15)。

化铜,无水氯化铝,氯化铁,盐酸,氢氧化钠,抗坏血酸(V_c),维生素 E(V_E),苯甲酸,山梨酸钾。

紫外分光光度计 UV-1800、电子分析天平 日本岛津公司;数显恒温水浴锅 北京永光明医疗器械公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RA、RP 溶液的制备 称取适量 RA 和 RP 分别溶于无水乙醇和正己烷,配制成一定浓度的溶液。

1.2.2 其他溶液的配制 分别配制 1.5%、1.0%、0.5% 的 H_2O_2 溶液;0.1% 的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 离子溶液;5%、2%、1% 的盐酸和氢氧化钠溶液;根据国标 GB 2760-2007, V_c 和 V_E 作为抗氧化剂在食品中最高限量分别为 0.15% 和 0.02%,苯甲酸和山梨酸钾在食品中最高限量均为 0.2%,因此,分别配制 0.3% 和 0.05% 的抗坏血酸溶液,0.04% 和 0.01% 的维生素溶液以及 0.4% 和 0.2% 的苯甲酸和山梨酸钾溶液。

1.2.3 维生素 A 酯类的紫外光谱特性 将两种维生素 A 酯的乙醇溶液和正己烷溶液分别在 200~400nm 波长范围扫描,波长间隔 1nm。

1.2.4 维生素 A 酯类的稳定性研究 取浓度相同的两种维生素 A 酯的乙醇溶液,分别在日光、日光灯(30W)和黑暗处的条件下放置以及分别放置在黑暗处不同温度的水浴锅中,以考察光和温度对其稳定性的影响;另外分别取浓度相同的两种维生素 A 酯的乙醇溶液和正己烷溶液,并分别放置在日光、日光灯(30W)和黑暗处下,以考察溶剂类型对其稳定性的影响;其他各种配制的溶液均与两种维生素 A 酯的乙醇溶液 1:1 混合均匀,然后均放置在室内暗处,以考察相应因素对其稳定性的影响。定时取样测定吸光值并计算残留率,所有条件均作三次重复,结果取平均值。吸光度残留率计算公式:吸光度残留率 = $Abs_2 / Abs_1 \times 100\%$,其中 Abs_1 为初始吸光度值, Abs_2 为不同时刻的吸光度测定值。

1.2.5 维生素 A 酯类的热降解动力学研究 测定不同温度下溶液中维生素 A 酯类浓度与时间的关系。使用积分法结合 Excel 软件,通过相关系数确定反应级数。由于反应级数 $n=1$ 时, $\ln c \sim t$ 为线性关系; $n \neq 1$ 时, $c^{1-n} \sim t$ 为线性关系,则可分别计算不同 n 时线性回归方程的相关系数平方 R^2 ,其最大者(最接近 1)为相应的反应级数^[12]。再根据求出的反应级数,由阿伦尼乌斯公式 $[k = Ae^{(\frac{E_a}{RT})}]$ 的定积分形式:

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad [13]$$

求出热降解反应的活化能(E_a)并求出 $t_{1/2}$ 。

2 结果与讨论

2.1 最佳测定波长的选择

由图 1 可看出,RA 和 RP 的乙醇溶液在 200~400nm 波长范围的最大特征吸收峰波长分别为 326nm 和 324nm,所以,选择 325nm 作为最佳测定波长。正己烷溶液中的两种维生素 A 酯最大吸收峰也均在波长 325nm 左右(图略)。在 325nm 左右,通过吸光度可计算维生素 A 酯的含量,公式为:

$C(\mu g/mL) = Abs \times 10^6 \mu g \times 1g/E_s \times I \times 1g \times 100mL (RA:E_s = 1530, RP:E_s = 960) \quad [14-15]$ 。即在波长 325nm 下维生素 A 酯溶液的吸光度与其含量之间的对应关系很好。

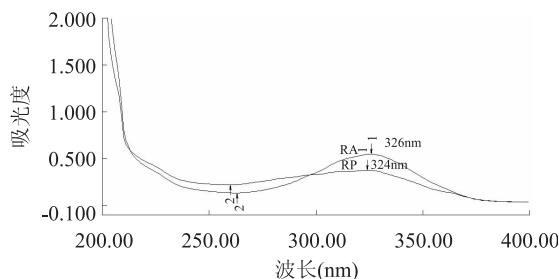


图 1 RA 和 RP 的紫外吸收光谱

2.2 维生素 A 酯类的稳定性

2.2.1 光对维生素 A 酯类的稳定性影响 图 2 的结果显示,维生素 A 酯类在日光下极不稳定,1h 后就损失殆尽。但是日光灯对其稳定性影响较小,5h 后,RA 和 RP 的吸光度残留率分别为 95.50% 和 93.76%。而在黑暗中很稳定,5h 后,吸光度残留量分别为 99.10% 和 99.88%。

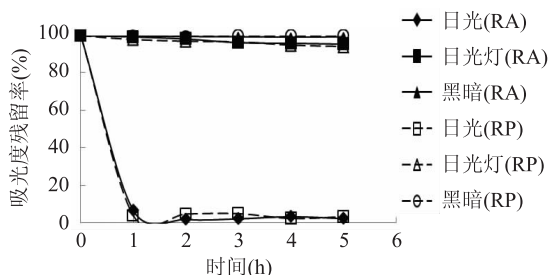


图 2 光对维生素 A 酯类的稳定性影响

2.2.2 温度对维生素 A 酯类稳定性的影响 由图 3 可看出,在室温 25℃ 左右下,两种维生素 A 酯都非常稳定,5h 后 RA 和 RP 的吸光度残留率分别为 99.09% 和 99.70%,随着温度的升高,稳定性下降。相同温度下,RP 的稳定性均高于 RA。

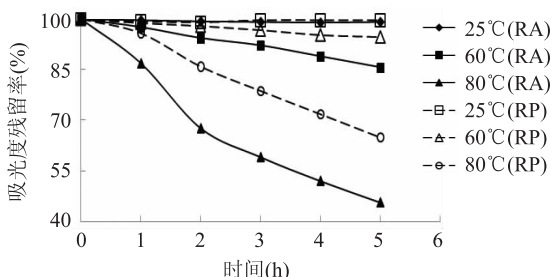


图 3 温度对维生素 A 酯类的稳定性影响

2.2.3 氧化剂对维生素 A 酯类稳定性的影响 由图 4 可看出,RA 在 H_2O_2 存在时不稳定,并随 H_2O_2 浓度增加稳定性逐渐下降。而 RP 相对稳定,5h 后各组吸光度残留率均在 92.68% 以上。

2.2.4 酸碱对维生素 A 酯类稳定性的影响 图 5 的结果表明,维生素 A 酯类对酸不稳定,并随酸浓度的升高稳定性逐渐降低。5h 后 RA 溶液的吸光度下降幅度最高达 44.80%,而相同条件下 RP 溶液的吸光度只下降了 34.80%。相同酸浓度下,RP 的稳定性均高于 RA。

表1 金属离子对 RA 稳定性的影响

金属离子	0	1	2	3	4	5
A(Na ⁺ RA)	0.285	0.285	0.283	0.272	0.264	0.259
残留率(%)	100.00	100.00	99.30	95.43	92.63	91.51
A(K ⁺ RA)	0.285	0.289	0.286	0.282	0.274	0.273
残留率(%)	100.00	101.40	100.35	98.95	96.14	95.78
A(Mg ²⁺ RA)	0.285	0.269	0.260	0.243	0.232	0.226
残留率(%)	100.00	94.38	91.22	85.26	81.40	79.30
A(Cu ²⁺ RA)	0.285	0.268	0.259	0.251	0.242	0.237
残留率(%)	100.00	94.04	90.88	88.07	84.91	83.16
A(Al ³⁺ RA)	0.285	0.263	0.253	0.243	0.235	0.227
残留率(%)	100.00	92.28	88.77	85.26	82.46	79.65
A(Fe ³⁺ RA)	0.285	0.276	0.266	0.259	0.221	0.219
残留率(%)	100.00	96.84	93.33	90.88	77.54	76.84

表2 金属离子对 RP 稳定性的影响

时间(h)	0	1	2	3	4	5
A(Na ⁺ RP)	0.173	0.174	0.174	0.174	0.175	0.174
残留率(%)	100.00	100.57	100.57	100.57	101.56	100.57
A(K ⁺ RP)	0.173	0.174	0.175	0.174	0.175	0.173
残留率(%)	100.00	100.56	101.56	100.56	101.56	100.00
A(Mg ²⁺ RP)	0.173	0.182	0.186	0.188	0.194	0.198
残留率(%)	100.00	106.40	107.51	108.67	112.14	114.45
A(Cu ²⁺ RP)	0.173	0.160	0.145	0.138	0.130	0.128
残留率(%)	100.00	92.6	84.0	79.9	75.4	74.0
A(Al ³⁺ RP)	0.173	0.174	0.171	0.170	0.169	0.171
残留率(%)	100.00	100.57	98.84	97.70	97.11	98.84
A(Fe ³⁺ RP)	0.173	0.171	0.170	0.142	0.119	0.116
残留率(%)	100.00	98.84	97.70	82.08	68.79	67.05

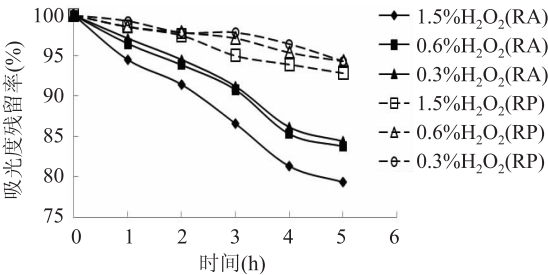


图4 H₂O₂对维生素 A 酯类的稳定性影响

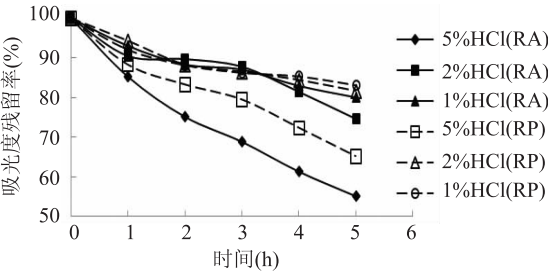


图5 HCl对维生素 A 酯类的稳定性影响

图6的结果表明,维生素 A 酯类在碱性环境中稳定。5h 后各组样品的吸光度残留率均在 98.56% 以上。

2.2.5 金属离子对维生素酯类稳定性的影响 表1和表2的数据显示,常见金属离子对维生素 A 酯类稳定性的影响不一,当 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 存在时,两种维生素 A 酯稳定性都较差,并且其对 RP 的影响更大,5h 后 RP 各组吸光度残留率比 RA 各组都低 10% 左右; Mg²⁺ 和 Al³⁺ 几乎不影响 RP 的稳定性,但对 RA 稳定

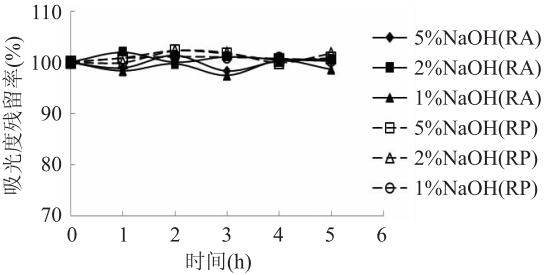


图6 NaOH对维生素 A 酯类的稳定性影响

性造成一定的影响;Na⁺ 和 K⁺ 对两种维生素 A 酯的稳定性影响不大,吸光度残留率均在 91.51% 以上。另外,RP 的乙醇溶液在 Mg²⁺ 存在时吸光度逐渐增加,可能是因为生成了其他物质。

2.2.6 抗氧化剂对维生素 A 酯类稳定性的影响 由图7看出,V_E 可以很好地保护维生素 A 酯类,5h 后各组样品的吸光度残留率在 99.48% 以上。含 V_C 的溶液中 RA 很稳定,但是 RP 的吸光度却发生轻微地降低,原因尚不明确。

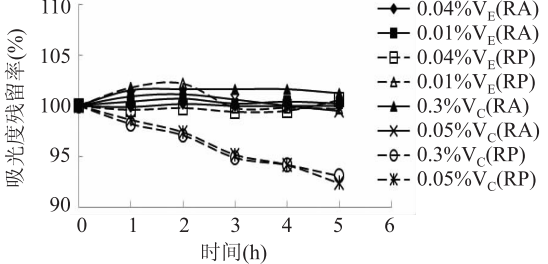


图7 V_E、V_C对维生素 A 酯类的稳定性影响

2.2.7 防腐剂对维生素 A 酯类稳定性的影响 图 8 的结果表明,两种维生素 A 酯在防腐剂存在时的稳定性存在差异。RP 在山梨酸钾存在时较稳定,而 RA 在苯甲酸存在时较稳定。整体上低浓度防腐剂对两种维生素 A 酯的稳定性影响较小,各组吸光度残留率均在 93.90% 以上。

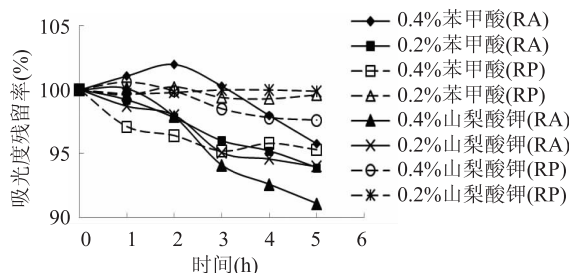


图 8 苯甲酸、山梨酸钾对维生素 A 酯类的稳定性影响

2.2.8 溶剂类型对维生素 A 酯类稳定性的影响 由图 9 可看出,日光灯下两种维生素 A 酯在正己烷中很稳定,吸光度残留率均在 99.83% 以上,稳定性高于在乙醇中。而在日光照射下,维生素 A 酯类在不同溶剂中稳定性表现出更大的差异。从图 10 可看出,乙醇中的维生素 A 酯类降解速度明显快于正己烷中,说明维生素 A 酯类在正己烷中的稳定性明显高于在乙醇中,也表明溶剂类型对维生素 A 酯类稳定性有较大的影响。

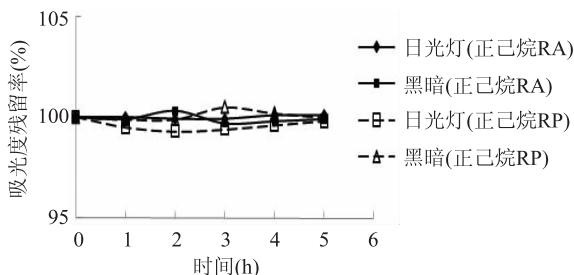


图 9 溶剂类型对维生素 A 酯类的稳定性影响(I)

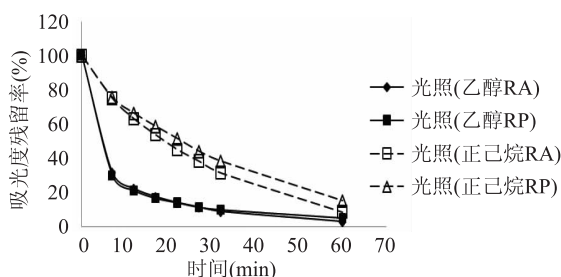


图 10 溶剂类型对维生素 A 酯类的稳定性影响(II)

2.3 热降解动力学分析

有报道 RA 在胶束溶液中的衰变符合一级反应^[11]。根据 2.1 中的公式计算出 c , 并与 t 一同代入各级反应的动力学公式计算。结果表明, $n=1$ 时线性回归方程的相关系数最大, 均在 0.9858 以上, 即维生素 A 酯类的热降解符合一级反应, 见图 11。

由阿伦尼乌斯公式的定积分形式, 分别求出热降解反应的活化能 E_a , 根据 k 值分别求出 $t_{1/2}$, 结果见表 3。RP 热降解的活化能为 100.41 kJ/mol, 明显高于 RA (80.59 kJ/mol), 其热降解速度速率明显低于 RA, 热稳定性高于 RP。

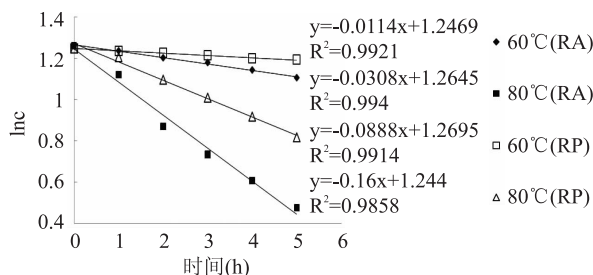


图 11 线性回归方程及相关系数

表 3 维生素 A 酯类的热降解动力学

温度(℃)	$k(h^{-1})$	$t_{1/2}(h)$	活化能(E_a) (kJ/mol)
60(RA)	3.08×10^{-2}	22.50	80.59
80(RA)	1.60×10^{-1}	4.33	80.59
60(RP)	1.14×10^{-2}	60.80	100.41
80(RP)	8.88×10^{-2}	7.81	100.41

3 结论

3.1 维生素 A 酯类营养强化剂均对日光极为敏感, 日光照射 1h 即损失殆尽。但在日光灯下较稳定, 生产储藏过程中应该尽量避免日光照射; 高温下不稳定, 工艺中的高温处理会对强化效果造成一定的损失; H_2O_2 对 RA 稳定性的影响较大, 但对 RP 稳定性影响不大; 酸性条件对维生素 A 酯类稳定性影响较大, 但在碱性环境下很稳定。

3.2 常见金属离子对其稳定性的影响不一, Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 引起的损失较大, Al^{3+} 只引起 RA 的损失较大。生产过程中应充分考虑产品中的某些微量金属元素如铁等对维生素 A 酯类的影响, 以便选择科学合理的添加量。抗氧化剂 V_E 对维生素 A 酯类营养强化剂有保护作用, 而 V_C 对 RP 的保护作用不理想。防腐剂对其稳定性的影响不大。产品中可考虑使用 V_E 作为抗氧化剂以保证强化效果。

3.3 溶剂类型对维生素 A 酯类营养强化剂稳定性影响较大。其在正己烷中稳定性高于乙醇中。多数情况下, RP 的稳定性高于 RA, 并且 RP 是天然存在的维生素 A 酯的形式, 生产中可考虑较多地使用 RP 作为营养强化剂。

3.4 维生素 A 酯类的热降解符合一级反应, RP 热降解的活化能为 100.41 kJ/mol, RA 热降解的活化能为 80.59 kJ/mol, RP 热降解速度速率明显低于 RA。

参考文献

- [1] Villamor E, Fawzi WW. Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2005, 18(4): 446-464.
- [2] Keith P, West JR. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age[J]. J Nutr, 2002, 132: 2857S-2866S.
- [3] 林良明, 刘玉琳, 马官福, 等. 中国六岁以下儿童维生素 A 缺乏情况调查[J]. 中华预防医学杂志, 2002, 36(5): 315-319.
- [4] Dary O, Mora JO. Food Fortification to Reduce Vitamin A Deficiency: International Vitamin A Consultative Group Recommendations[J]. J Nutr, 2002, 132: 2927S-2933S.

(下转第 79 页)

煮过程中可闻到略酸气味,口感上也表现为略酸。

表3 米饭添加柠檬酸制剂的蒸煮品质及保存效果

柠檬酸添加量 (mg/kg)	米饭蒸煮品质			米饭的保存 时间(d)
	颜色	气味	口感	
ck	白色	饭香味	纯正	1
100	洁白	饭香味	纯正	9
250	洁白	饭香味	纯正	>20
500	洁白	饭香味	略酸	>20

表4 米饭添加醋酸制剂的蒸煮品质及保存效果

醋酸添加量 (mg/kg)	米饭蒸煮品质			米饭的保存 时间(d)
	颜色	气味	口感	
ck	白色	饭香味	纯正	1
50	白色	饭香味	纯正	8
100	白色	饭香味	纯正	15
150	白色	略酸	略酸	9

2.3.3 甘油制剂对米饭的保存效果 由表5可知,添加500mg/kg的甘油制剂可将米饭的保存时间延长至8d。从色泽上看,添加了甘油的米饭洁白,且晶莹发亮;在气味及口感上也均良好。

表5 米饭添加甘油制剂的蒸煮品质及保存效果

甘油添加量 (mg/kg)	米饭蒸煮品质			米饭的保存 时间(d)
	颜色	气味	口感	
ck	白色	饭香味	纯正	1
500	洁白,晶莹发亮	饭香味	纯正	8
1000	洁白,晶莹发亮	饭香味	纯正	9
1500	洁白,晶莹发亮	饭香味	纯正	9

2.3.4 甘氨酸制剂对米饭的保存效果 由表6可见,甘氨酸与ε-聚赖氨酸复合使用,当甘氨酸的添加量为100mg/kg时,米饭的保存时间只有5~6d,从图1中已经明确单独添加了100mg/kg ε-聚赖氨酸的米饭也能保存5d以上,而在增加甘氨酸用量后保存时间虽有延长,但不明显,可见在米饭中甘氨酸与ε-聚赖氨酸复合使用的效果不是特别理想。

2.3.5 ε-聚赖氨酸制剂的保鲜效果比较 ε-聚赖氨酸的不同制剂对于米饭的保存时间不同。在ε-聚赖氨酸的柠檬酸制剂、醋酸制剂、甘油制剂以及甘氨酸制剂中,以柠檬酸制剂的效果最佳,醋酸制剂次之,

(上接第76页)

[5] GB14880-1994 食品营养强化剂使用卫生标[S].

[6] George C, Mohammed S P. Photo - oxidations and photosensitized oxidations of vitamin A and its palmitate ester [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1995,85:93-100.

[7] Ihara H, Hashizume N, Hirase N, et al.Esterification makes retinol more labile to photolysis[J].J Nutr Sci Vitaminol, 1999, 45:353-358.

[8] Carlotti M E, Rossatto V, Gallarate M.Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation [J].International Journal of Pharmaceutics, 2002,240:85-94.

[9] Xia Q, Yin J J, Wamer W G, et al.Photoirradiation of Retinyl Palmitate in Ethanol with Ultraviolet Light - Formation of Photodecomposition Products, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxides[J].International Journal of Environmental Research and Public Health, 2006,3(2):185-190.

表6 米饭添加甘氨酸制剂的蒸煮品质及保存效果

甘氨酸添加量 (mg/kg)	米饭蒸煮品质			米饭的保存 时间(d)
	颜色	气味	口感	
ck	白色	饭香味	纯正	1
100	白色	饭香味	纯正	5~6
150	白色	饭香味	纯正	7
200	白色	饭香味	纯正	7

而甘氨酸制剂的效果最差。同样是100mg/kg的柠檬酸和甘氨酸与ε-聚赖氨酸复合,添加了甘氨酸制剂的米饭保存5~6d就全坏了,而添加了柠檬酸制剂的米饭在保存了9d以后也只是部分变质。

3 结论

- 3.1 高湿米饭中ε-聚赖氨酸的最大使用范围控制在200mg/kg以内。
- 3.2 在高水分含量米饭中,ε-聚赖氨酸的最适使用量为100~150mg/kg。
- 3.3 在高湿米饭中,ε-聚赖氨酸与柠檬酸复合使用的保鲜效果最好,其最佳配比为1:2.5。

参考文献

[1] 徐数来,刘晓东,刘玮.我国方便米饭的发展现状及存在的主要问题[J].农机化研究,2008(10):250-252.

[2] 李兆龙.米饭添加剂[J].食品工业,1992(2):37-39.

[3] 李瑾,李汴生.α-方便米饭加工工艺及产品品质研究[J].食品工业科技,2008,29(11):305-308.

[4] 马晓军,王睿,耿敏,等.即食方便米饭的老化机理及影响因素研究[J].食品与发酵工业,2008,34(7):37-40.

[5] 张燕萍.提高即食米饭抗老化的研究[J].中国粮油学报,1997(6):15-18.

[6] Shima S, Hiroyoshi M. Antimicrobial action of ε- poly- L- lysine[J].The Journal of Antibiotic, 1984(11):1449-1455.

[7] Hiraki J.ε- polylysine, its development and utilization [J]. Fine Chem, 2000, 29(1):18-25.

[8] 张东荣,张超,段作营,等.ε-聚赖氨酸抑菌性能的初步研究[J].河南工业大学学报:自然科学版,2006,27(3):76-80.

[10] Xia Q, Yin J J, Cherng S-H, et al.UVA photoirradiation of retinyl palmitate—Formation of singlet oxygen and superoxide, and their role in induction of lipid peroxidation [J].Toxicology Letters, 2006,163:30-43.

[11] 刘巧云,梅连瑞,朱晓晴,等.维生素A在胶束溶液中衰变动力学及机理研究[J].高等学校化学学报,2009,30(2):297-301.

[12] 陈纪岳.关于反应级数的确定方法[J].大学化学,2000,15(6):49-50.

[13] 天津大学物理化学教研室.物理化学下册[M].北京:高等教育出版社,2001:219-223.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005:附录46-47.

[15] William H, George W L. Official Methods of Analysis of AOAC International [M].ED 17th, Maryland, USA: AOAC International, 2007, Ch 45:1-9.