

# 小米叶酸提取与测定方法的研究

邵丽华, 王莉\*, 白文文, 刘雅娟

(山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041000)

**摘要:** 研究小米叶酸的最好提取条件与测定方法。以河北红谷小米为原料, 针对光照条件、显色时间、检测范围、提取时间、吸附剂用量、洗脱液用量和加标回收分别进行叶酸提取的单因素实验, 确定小米叶酸的最好提取条件: 用 0.1mol/L 磷酸二氢钾 25mL 浸泡 2.5g 小米, 50℃ 恒温水浴 8h, 0.5g 活性炭(苯胺处理) 吸附 10min, 3% 氨-70% 乙醇洗脱 5 次, 每次用量 7mL。测定方法是用高锰酸钾氧化叶酸, 间接荧光分析法测定。该法操作简单, 稳定性好, 灵敏度高, 回收率为 96.14%, RSD 为 1.68%, 结果令人满意。

**关键词:** 小米, 叶酸, 提取, 测定, 间接荧光法

## Study on extraction and detection of folic acid in millet

SHAO Li-hua, WANG Li\*, BAI Wen-wen, LIU Ya-juan

(Life Science College of Shanxi Normal University, Linfen 041000, China)

**Abstract:** The optimum extraction condition and measurement method for analysis of folic acid in millet was studied. The red valley millet cultivar from Hebei was used as materials, and a single factor experiment for folic acid extraction and detection was respectively conducted based on the illumination condition, color rendering time, detection ranges, extraction time, usage of absorbent, the consumption amount of elution solution as well as the recovery rate of standard sample. Data showed that 25mL of 0.1mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was used to obtain the optimum extraction effect by soaking 2.5g millet at 50℃ for 8 hours, and adsorbing for 10 minutes with 0.5g active carbon adsorbent treated by aniline, and continuously eluting five times with 7mL of mixture containing 3% ammonia and 70% ethanol, and then indirect fluorescent method was used to determine the contents of folic acid oxidized by  $\text{KMnO}_4$ , and the satisfactory result was obtained because of higher the recovery rate of 96.14% with a relative lower deviation of 1.68%.

**Key words:** millet; folic acid; extraction; measurement; indirect fluorescent method

中图分类号: TS210.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)18-0253-05

叶酸(Folic acid)属于水溶性B族维生素, 是人体必需的营养成分之一, 也是食物成分表中有待补充的重要营养成分之一<sup>[1-2]</sup>。人体缺乏叶酸容易导致胃肠功能紊乱、智力退化及神经管畸形的发生<sup>[3]</sup>。人体不能自身合成叶酸, 只有从膳食中摄取。粮食和蔬菜是人类叶酸的主要来源<sup>[4-5]</sup>。近年来, 通过改良作物提高天然叶酸的含量已经引起人们极大的兴趣<sup>[6-7]</sup>。因此, 叶酸准确便捷的测定是叶酸营养研究的重要手段。有关叶酸的的分析方法有: 微生物法<sup>[8-10]</sup>、免疫法<sup>[11-12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13-15]</sup>等, 但这些方法均有不足, 或操作繁琐、或运行成本高。目前有报道用间接荧光法测定叶酸, 该法快速、灵敏、稳定性好, 但对提取过程中光照、显色时间等具体条件均没有详细的描述<sup>[16-17]</sup>。小米, 俗称为谷子。谷子学名: *Setaria italica*(L.) Beauv., 为禾本科狗尾草属。作为“五谷”之一的小米起源于中国, 是我国传统的优势粮食作物, 在我国各地都有

种植, 主要集中在山西、陕西、河北、内蒙等地<sup>[18]</sup>。小米营养价值较高, 含有丰富的维生素、矿物质和膳食纤维, 具有很好的食疗食补作用, 是体弱多病、术后恢复、产后孕妇等特殊群体人员的首选食物之一<sup>[19-20]</sup>。随着人民生活水平的提高, 大众对饮食结构的关注, 小米的营养价值日益受到重视, 但小米叶酸含量仅有零星报道<sup>[21]</sup>。

为此, 本研究以河北红谷小米为原料, 针对光照条件、显色时间、检测范围、提取方式、吸附剂用量和洗脱液用量分别进行叶酸提取的单因素实验, 确定间接荧光法测定小米叶酸含量的最佳条件, 以期为今后谷类作物叶酸含量测定提供方法和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

小米 河北省的红谷小米, 于 60℃ 下烘干, 研磨后过 100 目筛子备用; 叶酸、氨水、乙醇、高锰酸钾、双氧水等 均为分析纯。

CRAY 型荧光分光光度计 Eelipse; HH-S 型恒温水浴锅 郑州长城科工贸有限公司; KQ-50 型超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; LG10-2.4 型高速离心机。

收稿日期: 2013-04-10 \* 通讯联系人

作者简介: 邵丽华(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物生理生态。

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(2008BADA4B01); 山西省引进优秀人才专项基金(2010); 山西省留学基金(2011)。

## 1.2 实验方法

小米样品经 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浸提后5000r/min离心10min取上清液,加苯胺处理过的活性炭摇匀,加热煮沸10min,过滤弃上清液,用3%氨-70%乙醇洗滤渣,将洗脱液蒸发浓缩至5mL。

于该5mL叶酸提取液中加入2%的冰乙酸1mL,逐滴滴加0.04%的高锰酸钾至溶液不变色,再加3%双氧水至高锰酸钾褪色为止,定容至10mL,于 $E_s=370\text{nm}$ , $E_m=443\text{nm}$ 处测荧光强度。

### 1.2.1 间接荧光法测定叶酸最佳条件的确定

1.2.1.1 间接荧光法测定叶酸最佳光照条件 用 $0.4\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液分别于500、800、1000、1500、2000、3000、4500Lux的照度下测定其荧光强度,研究光照条件对叶酸含量的影响。

1.2.1.2 间接荧光法测定叶酸最佳显色时间 将 $0.6\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液滴加高锰酸钾激发荧光后,每隔5min测定一次测荧光强度,判断显色时间对荧光检测的影响。

1.2.1.3 间接荧光法测定叶酸的检测范围和检出限 配制从 $0.005\sim 6.4\mu\text{g/mL}$ 的不同浓度梯度的叶酸标准工作液,分别按步骤进行荧光的测定,确定间接荧光法测定叶酸的检测范围和检出限。

1.2.2 吸附剂用量的影响 采用苯胺处理的活性炭吸附10min,用量分别为0.1、0.3、0.5、0.8、1.2g。

1.2.3 洗脱液用量的影响 洗脱用3%氨-70%乙醇洗5次,每次洗脱液用量相同,分别为3、5、7、9、11、13mL。

1.2.4 淀粉对叶酸测定的干扰 在3份3mL  $2\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液中分别加入淀粉1.375、1.625、1.875g,充分搅拌溶解后过滤,按1.2.1所确定的最佳实验方法进行荧光强度的测定。

1.2.5 回收率的检测 于小米浸提液中分别加入 $2\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液1、2、3mL后,再进行测定,以考察方法的准确度。

1.2.6 不同浸提方法对小米叶酸测定的影响 小米样品2.5g加 $0.1\text{mol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浸提剂25mL, a.于 $50^\circ\text{C}$ 下浸泡,浸泡时间分别为:0.5、1、2、4、8、10、12h; b.用40kHz超声波振荡,振荡时间分别为:10、15、20、30、60、120min,比较两种浸提方法对小米叶酸的提取效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 间接荧光法测定叶酸最佳条件的确定

2.1.1 光照条件对叶酸含量测定的影响 如图1所示,用 $0.4\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液在500~4500Lux的照度下分别测其荧光强度,结果显示在500~2000Lux的光照下测定值均在20左右,彼此未造成显著差异( $p>0.05$ );2000Lux以上随着光照强度的增加,测定值降低,与2000Lux光照下的测定值造成了显著差异( $p<0.05$ )。可见,在2000Lux光照以下,不会对叶酸测定造成影响,一般实验室是可以满足测定要求的。

2.1.2 显色时间对荧光强度的影响 图2是所示为 $0.6\mu\text{g/mL}$ 叶酸标液滴加高锰酸钾激发荧光后荧光强度随显色时间的变化关系。从图2中可明显看出在显

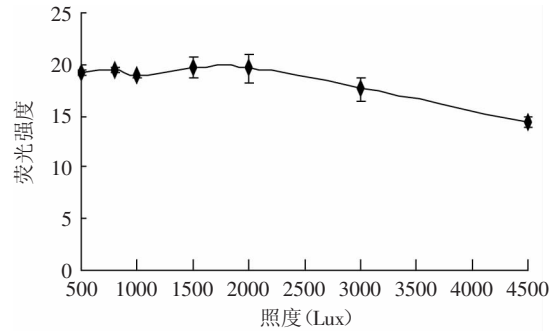


图1 光照条件对叶酸含量测定的影响

Fig.1 Effect of the illumination condition on folic acid detection

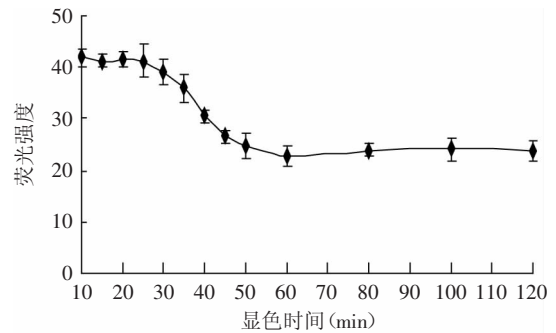


图2 显色时间对荧光强度的影响

Fig.2 Effect of the color rendering time on fluorescence intensity

色30min内,荧光强度都处在同一水平,彼此之间并未造成显著差异( $p>0.05$ );但和35min及更长时间却造成了显著差异( $p<0.05$ );50min后测定值逐渐趋于稳定,但此时检测到的荧光比30min内的荧光下降了42%左右。可见叶酸的荧光反应有效时间为25min,在加入高锰酸钾进行氧化后应于0.5h之内进行荧光检测。

2.1.3 检测范围和检出限的确定 图3显示叶酸在 $0.025\sim 4\mu\text{g/mL}$ 范围内呈线性关系,在超出 $4\mu\text{g/mL}$ 之后曲线弯曲。图4叶酸在 $0.025\sim 4\mu\text{g/mL}$ 的范围内,线性方程为 $y=71.116x-2.1344$ , $r^2=0.9993$ ,表明间接荧光法检测叶酸的检测范围为 $4\mu\text{g/mL}$ 。该法检测叶酸的空白对照组荧光值为0.26,3倍于空白对照的荧光值即其检出限为0.72,此时所对应的叶酸浓度大致在 $0.025\mu\text{g/mL}$ 左右,可以判断间接荧光法检测叶酸的检出限为 $0.025\mu\text{g/mL}$ 。

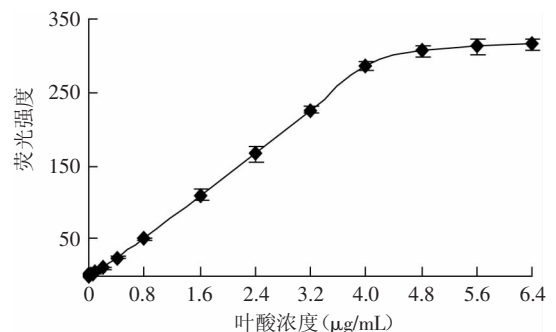


图3 叶酸标准曲线I

Fig.3 Folic acid standard curve I

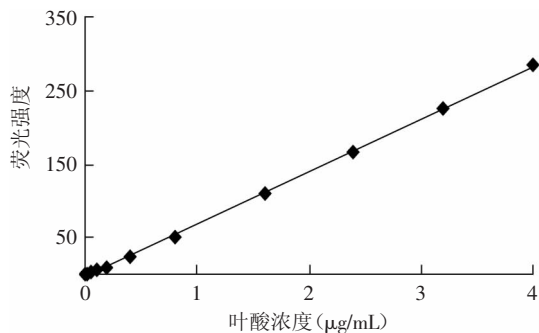


图4 叶酸标准曲线II

Fig.4 Folic acid standard curve II

### 2.2 吸附剂用量对叶酸含量测定的影响

通过图5可知,活性炭用量在0.5g时,所得叶酸含量为2.04μg/g,随着活性炭用量的增多,一直到1.2g时,所得到的叶酸含量并未随之增加,几乎趋于同一水平。经SPSS17.0的LSD检验,活性炭0.5g水平与前面两个水平造成了显著差异( $p < 0.05$ ),与后面三个水平均未造成显著差异( $p > 0.05$ )。所以当取样量为2.5g时,活性炭适宜用量为0.5g。

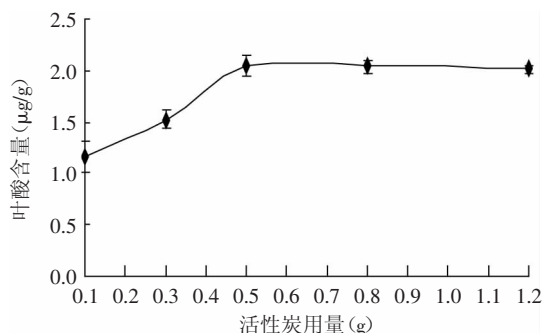


图5 不同吸附剂用量对叶酸含量测定的影响

Fig.5 Effect of different adsorbent amount on folic acid detection

### 2.3 洗脱液用量对叶酸含量测定的影响

活性炭吸附的叶酸的洗脱,应遵循少量多次的原则,本实验均设置的洗脱5次,洗脱液总用量从15mL加至65mL。由图6可看出,洗脱液用量的不同并未对叶酸含量造成显著影响,所得叶酸含量均在1.9μg/g水平附近,6组处理之间均未造成显著差异

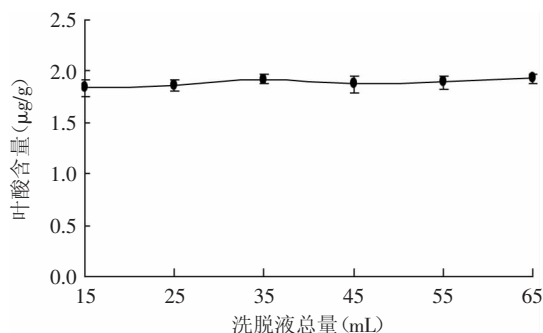


图6 不同洗脱液总量对叶酸含量测定的影响

Fig.6 Effect of different the eluent amount on folic acid detection

( $p > 0.05$ )。由于洗脱液总量为15mL和25mL时,分5次洗脱,每次洗脱分别只用3mL和5mL,在离心管里是处于一种浑浊状态,离心比较耗时。为了实验操作更方便,本实验中洗脱液用量定为35mL。

### 2.4 淀粉对叶酸测定的干扰

小米淀粉含量占小米总重的56%~61%<sup>[19]</sup>。为考察淀粉对叶酸测定结果的干扰,按照淀粉55%、65%、75%的比例,在3mL 2μg/mL的叶酸标液中分别加入纯淀粉1.375、1.625、1.875g测定其荧光强度。结果如表1所示,未添加淀粉的0.6μg/mL叶酸标液荧光强度为42.24,加淀粉后平均荧光强度仍为42,二者并未造成显著差异( $p > 0.05$ ),说明小米中所含淀粉的比例并不影响叶酸含量的测定。

表1 淀粉荧光强度测定结果

Table 1 The fluorescence intensity of starch impurity

标液浓度 (μg/mL)	淀粉加入量 (g)	荧光强度	平均荧光强度	RSD (%)
0.60	-	42.18	42.24	1.69
0.60	-	43.14		
0.60	-	41.39		
0.60	1.375	41.83	42.00	0.65
0.60	1.625	42.39		
0.60	1.875	41.79		

### 2.5 加标回收率的测定

从表2可看出,于小米浸提液中分别加入2μg/mL叶酸标液1、2、3mL后,其回收率都在90%以上,平均回收率为96.14%,RSD为1.68%,说明间接荧光法测定小米叶酸受干扰物质较少,有良好的回收率,准确度较高。

表2 加标回收率测定结果

Table 2 The recovery ratio of folacin in sample

样品本底值 (μg/mL)	标液溶液浓度 (μg/mL)	标液溶液体积 (mL)	加标后测定值 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.23	2	1	0.43	96.91		
0.23	2	1	0.43	95.94		
0.23	2	1	0.43	98.81		
0.23	2	2	0.62	96.17	96.14	1.68
0.23	2	2	0.62	97.36		
0.23	2	2	0.62	96.33		
0.23	2	3	0.77	90.16		
0.23	2	3	0.81	96.89		
0.23	2	3	0.81	96.72		

### 2.6 不同浸提方法对小米叶酸测定的影响

2.6.1 恒温浸泡时间对叶酸含量测定的影响 用0.1mol/L  $KH_2PO_4$ 于50℃下浸泡样品,结果如图7所示,随浸泡时间的延长,叶酸水平在不断升高,在0.5~4h的时间内,曲线上升较快,4~8h之间上升较慢,到浸泡8h以后,曲线趋于水平,叶酸含量趋于稳定。经SPSS17.0的LSD分析,浸泡8h所得叶酸含量与浸泡4h所得叶酸含量造成了显著差异( $p < 0.05$ ),而与

浸泡10、12h所得叶酸含量并未造成显著差异( $p>0.05$ ),因此50℃下 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浸泡提取时间定为8h。

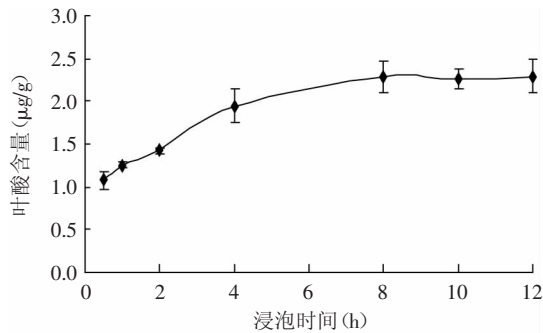


图7 浸泡时间对叶酸含量的影响

Fig.7 Effect of the soak time on folic acid detection

2.6.2 超声波振荡时间对叶酸含量测定的影响 由图8可知,超声波振荡时间15min时,叶酸含量达到最高,随着振荡时间的延长,叶酸含量不仅没有增加,反而呈现出下降的趋势,最后趋于稳定。经SPSS17.0的LSD分析,超声波振荡10min和15min,所测得叶酸含量之间并未造成显著差异( $p>0.05$ ),振荡20min所得叶酸含量显著低于振荡10min和15min( $p<0.05$ ),但显著高于振荡30min及更长时间所得叶酸( $p<0.05$ )。

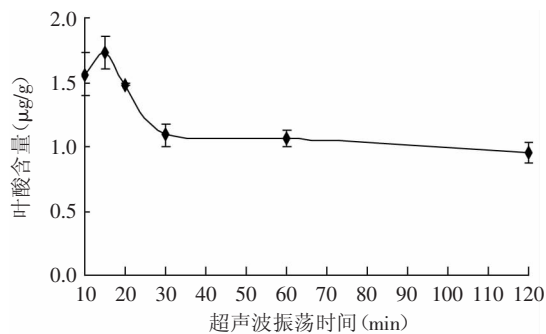


图8 超声波振荡时间对叶酸含量的影响

Fig.8 Effect of the ultrasonic concussion time on folic acid detection

综合图7、图8可以发现,超声波振荡提取所得的最高叶酸含量为 $1.73\mu\text{g/g}$ ,而50℃下 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浸泡所得最高叶酸含量为 $2.29\mu\text{g/g}$ ,可见两种方法叶酸的提取量差异甚大。因此,叶酸提取采用50℃下 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浸泡8h较为合适。

### 3 讨论与结论

叶酸大多以多聚谷氨酸的形式存在于粮食和蔬菜中,易溶于稀碱溶液且稳定性好,但具有热不稳定性 and 光不稳定性<sup>[12]</sup>。郭丽琼等研究叶酸提取方法结果表明叶酸提取检测均应在暗处进行,但并未给出具体的光照范围<sup>[22]</sup>。本实验通过不同光照条件的设置,证明叶酸提取测定过程中照度应维持在500~2000Lux的范围,没有阳光直接照射的实验室均可以完成实验。

秦立俊等报道了间接荧光法和间接原子吸收光谱法测定叶酸,结果表明间接荧光法测定叶酸灵敏

度高<sup>[23]</sup>。熊绿芸等采用间接荧光法测定刺梨等植物材料中的叶酸含量,表明间接荧光法测定叶酸回收率高<sup>[24]</sup>。本实验中用0.04%的高锰酸钾氧化,在 $E_x=370\text{nm}$ , $E_m=443\text{nm}$ 处用间接荧光法测定小米叶酸含量,其测定范围为 $0.025\sim 4\mu\text{g/mL}$ ,平均回收率为96.14%,RSD为1.68%。

郭秀珠等分别用硅胶、硅藻土和活性炭作为吸附剂从叶酸浸提液中吸附叶酸,并用3%氨-70%乙醇洗脱,结果显示用活性炭吸附,3%氨-70%乙醇洗脱效果最好<sup>[25]</sup>。本研究在此方法的基础上探讨了活性炭和3%氨-70%乙醇液的具体用量,即在取样为2.5g时,活性炭用量为0.5g,洗脱液用量为35mL。

本实验比较研究了恒温水浴提取法和超声波振荡提取法对叶酸提取的影响,结果表明两种方法叶酸的提取量差异很大。因为超声波振荡提取法会对叶酸造成不同程度的破坏,致使叶酸测定值偏低,因此叶酸提取以恒温水浴浸提为最佳选择,此结果与常娜宁等研究结果一致<sup>[11]</sup>。

综上所述,本实验所得小米叶酸浸提与测定的方法为:以1:10的浸提比率,2.5g小米样品使用0.1mol/L磷酸二氢钾25mL,50℃恒温水浴8h,用0.5g活性炭(苯胺处理)吸附,再用3%氨-70%乙醇洗脱滤渣5次,每次7mL,最后加热浓缩制备成样品液。用0.04%的高锰酸钾氧化,在 $E_x=370\text{nm}$ , $E_m=443\text{nm}$ 处用间接荧光法测定小米叶酸含量。该方法简单,灵敏度高,重复性好,结果令人满意。此方法可用于小米及谷物粮食作物的叶酸含量测定。

### 参考文献

- [1] 韩月婷,姜凌,范云六,等. 叶酸生物强化研究进展[J]. 中国农业科技导报,2009,11(4):23-28.
- [2] 孙维洋,李剑芳,牟志美. 植物叶酸的合成、代谢及基因工程研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2229-2230.
- [3] 王小娟,王振林,肖生彬,等. 陕西中农村地区两所中学生贫血原因的探究[J]. 西安交通大学学报,2008,29(5):530-534.
- [4] 张娟,靳保辉,刘灵芳,等. 差示脉冲溶出法测定粮食中叶酸的研究[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(2):91-94.
- [5] 李富兰,颜杰,郭金全,等. 蚕沙中叶酸的提取与分析检测[J]. 食品科技,2009,34(10):211-213.
- [6] 杨玉柱,王储炎,焦必宁. 叶酸的研究进展[J]. 农产品加工,2006,31(5):31-39.
- [7] 梁业红. 过量表达细菌的Folc和Folp基因对提高拟南芥叶酸含量的研究[D]. 北京:中国农业科学院,2005:6-10.
- [8] 王萍. 叶酸功能性和叶酸强化食品[J]. 粮食与油脂,1999,20(2):53-54.
- [9] 马景宏,张旭,王为黎. 微生物分析法测定保健食品中叶酸[J]. 中国微生物学杂志,2007,19(6):576-577.
- [10] 迟晓星,张涛,赵静,等. 叶酸的提取及抗氧化研究[J]. 现代食品科技,2011,27(10):1234-1237.
- [11] 常娜宁,姜凌,蒲训,等. 作物叶酸检测方法的研究进展[J]. 中国农业科技导报,2010,2(2):44-49.
- [12] 高桂花,盛筱,李雪冰. 高效液相色谱法测定叶酸片中叶

(下转第261页)

正交实验确定了最佳提取工艺条件为:以60%的乙醇溶液为溶剂,原料粒度80~100目、超声功率320W、料液比1:12、超声时间20min、超声2次,原花青素提取率为10.44%,固含物得率为22.85%,产物中原花青素的含量为44.29%。通过扫描电子显微镜观察超声波辅助提取前后的树皮表面微观形貌分析,表明超声波所具有的物理特性能促使植物细胞组织破壁或变形,从而促使胞内物质溶出,提取速度快,效率高。

### 参考文献

- [1] 吴国芳,冯志坚,马炜梁,等. 植物学[M]. 第二版. 北京:高等教育出版社,1992:190.
- [2] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(5-6):704-724.
- [3] 杜娟,李海涛. 松树皮提取物原花青素对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J]. 安徽医药, 2012, 16(10):1421-1422.
- [4] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in

- human mammary cancer cell [MCF-7] by pycnogenol[J]. Anticancer Research, 2000, 20(4):2417-2420.
- [5] Karthikeyan K, Sarala Bai B R, Niranjali Devaraj S. Grape seed proanthocyanidins ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes: An invitro study[J]. Life Sciences, 2007, 81(23/24):1615-1621.
- [6] 徐怀德,闫宁环,陈伟,等. 黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2):264-269.
- [7] 金建忠,哈成勇. 超临界CO<sub>2</sub>萃取落叶松木材挥发油的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(5):91-94.
- [8] Dawood Hattas, Riitta Julkunen-Tiitto. The quantification of condensed tannins in African savanna tree species [J]. Phytochemistry Letters, 2012(5):329-334.
- [9] 姚开,何强,吕运平,等. 葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法比较[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(2):230-231.
- [10] 刘晔,罗书勤,王博超,等. 超声辅助提取落叶松树皮原花青素的工艺研究[J]. 现代化工, 2011, 31(S1):250-253.
- [11] 马春慧,孙震,黄金明,等. 超声-微波交替法提取落叶松二氢槲皮素[J]. 化工进展, 2010, 29(1):134-145.

(上接第252页)

而言微波辅助提取比较节省时间和有机试剂,提取率比较好。

### 参考文献

- [1] 中国养蜂学会主编. 中国蜜蜂源植物及其利用[M]. 北京:中国农业出版社,1993:549.
- [2] 黄才欢,欧仕益,傅亮,等. 米团花色素的提取及其稳定性研究[J]. 中药材, 2004, 27(4):243-246.
- [3] 许杰. 微波辅助法提取盐地碱蓬红色素的工艺条件优化[J]. 湖北农业科学, 2011(9):1870-1873.
- [4] Chen Y, Xie MY, Gong XF. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from

- Ganoderma atrum[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1):162-170.
- [5] 傅荣杰,冯怡. 微波萃取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 中国中药杂志, 2003(9):804-807.
- [6] 曹雁平. 我国天然食用色素研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2007(1):80-84.
- [7] 韩晓祥,应芝,励建荣. 微波辅助提取杨梅色素及抗氧化作用研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(8):147-151.
- [8] 林满,欧仕益,孔令会. 米团花色素的提取和应用研究[D]. 广州:暨南大学, 2010.
- [9] 张俊杰,王淑霞,周云,等. 响应面分析法优化米团花黄色素提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(6):259-266.

(上接第256页)

- 酸含量[J]. 济宁医学院学报, 2010, 33(4):238-240.
- [13] Vahtersto L, Lehtikoinen K, Ollilainen V, et al. Application of an HPLC Assay for the Determination of Folate Derivatives in some Vegetables, Fruits and Berries Consumed in Finland [J]. Food Chemistry, 1997, 59(4):589-597.
- [14] Hefni M, Öhrvik V, Tabekha M, et al. Folate Content in Foods Commonly Consumed in Egypt [J]. Food Chemistry, 2010, 12(1):540-545.
- [15] Pawlosky R J, Flanagan V P. A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3):1282-1286.
- [16] 左志学. 高效液相色谱法测定叶酸复合维生素片叶酸含量[J]. 医学导报, 2010, 29(2):258-260.
- [17] 苏耀东,于娟,秦立俊. 间接荧光法测定奶粉中叶酸[J]. 理化检验, 2007, 43(2):105-107.
- [18] 李慧芝,许崇娟,郭建方. 微乳液增敏催化荧光光度法测

- 定叶酸的研究[J]. 分析科学学报, 2009, 25(2):208-210.
- [19] 薛月圆,李鹏,林勤保. 小米的化学成分及物理性质的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(3):199-203.
- [20] 刘丽萍. 小米营养及小米食品的开发[J]. 粮油加工与食品机械, 2003(1):48-49.
- [21] 王丽霞,孙海峰,赵海云,等. 山西小米资源开发利用的研究—小米营养蛋白粉制备技术[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1):173-175.
- [22] 郭丽琼,曹秋旭,吴厚玖. 果蔬中叶酸分析方法的研究进展[J]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20111018.1014.010.html>.
- [23] 秦立俊. 间接荧光法和间接原子吸收光谱法测定叶酸[D]. 上海:同济大学, 2006:14-17.
- [24] 熊绿芸,何照范,黄美霞. 荧光法测定刺梨及其他植物材料中叶酸含量的研究[J]. 贵州农学院学报, 1986, 2(2):92-97.
- [25] 郭秀珠,黄品湖,雷海清,等. 果蔬中叶酸的提取分离及测定方法研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3):183-185.