

Development of HPLC-UV method for detection and quantification of seven organic acids in animal feed

Jin kug Kim, Mi Jin Lee, Ye Ji Lee, Hye Jin Kim, Min Hee Jeong and Ho Jin Kim[★]

National Agricultural Products Quality Management Service, Kimchun 740-871, Korea

(Received June 2, 2016; Revised June 30, 2016; Accepted August 24, 2016)

사료 중 유기산 7종 동시분석법 개발 및 유통 사료의 모니터링

김진국 · 이미진 · 이예지 · 김혜진 · 정민희 · 김호진[★]

국립농산물품질관리원 시험연구소

(2016. 6. 2. 접수, 2016. 6. 30. 수정, 2016. 8. 24. 승인)

Abstract: A novel and simple method for detecting seven organic acids (formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid and propionic acid) in animal feed using high performance liquid chromatography equipped with a photo-diode array detector (HPLC/PDA) was developed. The chromatographic peaks of the seven organic acids were successfully identified by comparing their retention times and UV spectra with reference standards. Method validation was performed in terms of linearity, sensitivity, selectivity, accuracy, and precision. The limits of detection (LODs) for the instrument employed in these experiments ranged from 12 to 8,026 µg/kg, and the limits of quantification (LOQs) ranged from 43 to 26,755 µg/kg. Average recoveries of the seven organic acids ranged from 79.3 to 95.2 %. Method replication resulted in intra- day and inter-day peak area variation of <3.2 %. The developed method was specific and reliable and is therefore suitable for the routine analysis of organic acids in animal feed.

요 약: 본 연구에서는 사료 첨가제로 이용되고 있는 유기산 7종(formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, propionic acid)의 동시분석법 개발을 위한 연구를 실시하였다. 7종의 화합물은 표준물질의 Retention time과 UV spectra를 통해 구별하였고, 분석법 검증은 직선성, 민감성, 선택성, 정확성, 정밀성을 통하여 검증하였다. 그 결과로 LOD와 LOQ의 범위가 각각 43~26,755 µg/kg, 12-8,026 µg/kg으로 설정하였고, 평균 회수율이 79.3~95.2 %로 우수하게 보였으며, intra-day, inter-day에 대한 전반적인 상대 표준 편차(%RSD)는 3.2 % 미만으로 나타났다. 이와 같이 검증된 자료를 통해 유기산의 동시분석에 대한 직선성, 민감성, 선택성, 정확성 및 정밀성을 확인하였고, 높은 수준을 나타냄을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 유기산이 검출되는 단미사료 46 가지를 분석에 적용하여 진행하였고, 정량과 동시분석 검출을 위한 방법은 RP-HPLC/UV 검출기를 이용하여 성공적으로 개발되었다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 하여 사료 중의 유기산의 분석이 신속하고 정확해졌을 뿐 아니라, 다른 종류의 사료 또한 이를 적용하여 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

Key words: organic acid (formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, propionic acid), animal feed, hplc, simultaneous

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)53-429-7819 Fax : +82-(0)53-429-7829

E-mail : rex7878@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

사료 첨가제로 이용되고 있는 유기산은 acetic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid, lactic acid, propionic acid 등으로 개별적으로 사료와 음수에 첨가하거나 복합유기산제 형태로 이용되고 있다.¹ 사료 중에 유기산을 첨가하면 가축의 위장관의 pH를 조정해 항균, 항곰팡이 작용으로 독소생성을 감소시키고 유산균, 효모 등의 서식을 유리하게 만들어 성장촉진과 영양소 이용률 개선에 도움을 준다. 또한 위산의 pH를 낮춰 펩신활성화를 증가시켜 단백질과 식물성 사료의 소화율 개선에 도움을 주며,^{1,5} citric acid 및 fumaric acid은 대사과정(TCA Cycle)의 중간대사물질로 에너지 공급 효과가 있다.⁶ 이러한 유기산의 기능으로 세계적으로 동물용 사료 내 항생제를 대체하는 원료로 인정받고 있다. 유기산을 먹이면 영양소 이용률이 성장촉진용 항생제 첨가 시와 유기산 첨가 시 유사한 경향을 보인다는 연구결과가 보도되고 있다.^{7,8} 이러한 작용으로 동물용 사료, 사일리지 및 곡물의 보존제로 폭넓게 사용되고 있다.

유기산은 종류가 다양하고 그 종류에 따라 유해균을 억제하는 작용기전과 억제균의 종류가 달라 사료로 사용할 경우 혼합하여 복합 유기산제를 많이 사용하는데,¹ 현재의 사료공정서 상의 분석법은 적정법⁹으로 실험시간 오차가 크고, 한 번에 한 성분만 분석할 수 있어 분석 능률이 떨어지며, 사료 검정업무 물량 증가로 시간이 오래 걸려 현실적으로 적합하지 않다. 따라서 유기산(formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, propionic acid)의 물리 화학적 특성을 파악하고 사료에서의 분리능을 확보하여 HPLC를 이용한 동시분석법 개발로 신속, 정확한 분석법 활용으로 업무의 효율화가 필요하다.

유기산의 분석 방법으로는 HPLC-UV(high performance liquid chromatography-ultraviolet detection),¹⁰⁻¹⁴ LC-MS/MS(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry),¹⁵ GC(gas chromatography)^{16,17} 등으로 다양하게 보고되고 있다. LC-MS/MS는 분자량과 화합물의 구조적 특성에 대한 정보를 제공하므로 분리, 정량적인 측면에서 다른 분석 방법에 비해 유용하지만 이는 고가의 장비일 뿐 아니라 조작성이 어렵고 보편화 되어 있지 않아 적용하는데 어려움이 있다. 다른 많은 연구들은 보다 가격이 저렴하고, 조작성이 편리하며, 보편화 되어 있는 HPLC-UV 검출 방법을 선호

하고 있어, 유기산을 분석하는데 적합한 방법이라고 판단되었다.

본 연구에서는 단미사료에서 7개 (formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, propionic acid)의 유기산을 동시 분석하였고, 이는 신속하고 정확한 분석으로 분석업무의 효율성을 높일 뿐 아니라 사료의 표준품 관리에 도움으로 작용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

단미사료에 포함된 유기산을 대상으로 실험하였으며, 시료는 지역자치단체(서울, 경기, 강원, 대전, 충북, 충남, 전북, 전남; 2015년)에서 의뢰받은 단미사료를 사용하였다. 총 46 개의 시료를 사용하였으며, 시료는 분말로 분쇄하여 사용하였다(HMF-100; HANIL Electric Co., Seoul, Korea). 분쇄기의 속도는 22,000 rpm으로 설정하고, 크기는 400~1000 μm 으로 분쇄하였다. 모든 시료는 4 °C에 저장하였다.

2.2. 시약

HPLC급 시약으로 HCl, H₂SO₄는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 증류수는 Milli-Q RiOsTM/Elix water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)을 사용하였다. Malic acid (99%), lactic acid (98%), acetic acid (99%), citric acid (99.9%), fumaric acid (98%) 표준품은 Sigma-Aldrich에서 구입하였고, Formic acid (98%), Propionic acid (99.8%)은 Fluka에서 구입하였다. 본 시험에 사용된 유기산의 물리화학적 특성은 Table 1에 나타내었다.

2.3. 표준품 전처리

표준물질인 Formic acid, Malic acid, Lactic acid, Acetic acid, Citric acid, Fumaric acid, Propionic acid를 0.4% 염산용액에 녹여 1,000 mg/L의 농도로 조제된 stock solution을 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 mg/L의 농도가 되도록 working solution을 조제하였다. 그 후 10 μL 씩 기기에 주입하여 나타난 크로마토그램 상의 peak 면적을 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

2.4. 시료 전처리

1 g의 균질화된 시료를 tube에 칭량하고, 0.4% HCl 20 mL를 주사하여 혼합한다. 그 혼합물을 초음파 추

Table 1. Physicochemical properties of formic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, propionic acid

Common name	Chemical structure	Chemical formula	Melting point	Boiling point	Solubility in water
Formic acid		CH ₂ O ₂	8.4 °C	100.8 °C	miscible
Malic acid		C ₄ H ₆ O ₅	130 °C (266 °F; 403 K)		558 g/L (at 20 °C)
Lactic acid		C ₃ H ₆ O ₃	L: 53 °C D : 53 °C D/L: 16.8 °C	122 °C (252 °F; 395 K) 12 mmHg	
Acetic acid		C ₂ H ₄ O ₂	16 to 17 °C; 61 to 62 °F; 289 to 290 K	118 to 119 °C; 244 to 246 °F; 391 to 392 K	miscible
Citric acid		C ₆ H ₈ O ₇	156 °C (313 °F; 429 K)	310 °C (590 °F; 583 K) decomposes from 175 °C	117.43 g/100 mL (10 °C) 147.76 g/100 mL (20 °C) 180.89 g/100 mL (30 °C) 220.19 g/100 mL (40 °C) 382.48 g/100 mL (80 °C) 547.79 g/100 mL (100 °C)
Fumaric acid		C ₄ H ₄ O ₄	287 °C (549 °F; 560 K) (decomp)		4.3 g/L at 20 °C
Propionic acid		C ₃ H ₆ O ₂	-20.5 °C (-4.9 °F; 252.7 K)	141.15 °C (286.07 °F; 414.30 K)	8.19 g/g (-28.3 °C) 34.97 g/g (-23.9 °C) Miscible (≥ -19.3 °C)

출기를 이용하여 20분간 추출한 다음 0.4% 염산 용액으로 정용하여 원심분리(3000 rpm, 10 min, 4 °C)를 진행한 후, 필터(0.45 μm)한다.

2.5. HPLC 분석조건

분석에 사용된 HPLC는 auto sampler, photodiode array detector (PDA)가 장착된 Shiseido Nanospace SI-2 system (Shiseido, Tokyo, Japan)에서 진행하였고, EZ Chrom Elite software (Aglient)을 이용하였다. 컬럼은 역상 Imtakt Unison UK-C18 (250 × 4.6 mm, 3 μm particle size) (Tokyo, Japan)을 사용하여 모든 분리를 진행하였으며, 온도는 40 °C로 설정하였다. 이동상은 유기산의 분리능 개선과 pH를 낮추기 위해 H₂SO₄를 첨가하여 20 mM H₂SO₄를 이동상 조건으로 설정하였다. 시료는 10 μL를 주입하였고, 유속은 0.8 mL/min으로 설정하였으며, 모든 피크는 210 nm의 파장을 이용하여 검출하였다. 이동상은 사용하기 전에 0.45 μm 필터 (Millipore, Milford, MA, USA) 를 통해 여과하고, 진공 하에 탈기하여 사용하였다.

Table 2. Retention time, Resolution, Asymmetry of seven organic acid compound

Compound	Retention time(min)	Resolution	Asymmetry
Formic acid	4.9	-	1.06
Malic acid	5.7	6.66	1.00
Lactic acid	6.8	7.20	0.85
Acetic acid	7.1	1.99	1.30
Citric acid	9.5	9.69	0.97
Fumaric acid	12.4	8.75	0.87
Propionic acid	15.7	7.66	1.01

2.6. 분석법 검증

분석법의 검증은 International Conference on Harmonization (ICH, 2005)¹⁸와 International Union of Pure and Applied Chemistry(IUPAC, 2002)¹⁹에서 설정한 기준을 근거로 직선성(linearity), 민감성(sensitivity), 선택성(selectivity), 정확성(accuracy), 정밀성 등으로 실시하였다(Table 2~4).

Table 3. Linear equation of calibration curve for the quantification, limit of detection and limit of quantification of seven organic acid compound

Compound	Linear equation		R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
	Slope	Intercept			
Formic acid	1.22168	8.66995e ⁻¹	0.99992	99	333
Malic acid	1.24356	-7.23914e ⁻²	0.99999	134	448
Lactic acid	9.68213e ⁻¹	1.21182	0.99984	175	585
Acetic acid	7.10236e ⁻¹	1.92624e ⁻¹	0.99999	251	836
Citric acid	1.57119	8.21165e ⁻²	1.00000	8,026	26,755
Fumaric acid	189.90409	11.61508	0.99986	12	43
Propionic acid	9.90923e ⁻¹	-1.80677e ⁻¹	0.99997	3,988	13,296

Table 4. Precision, Recovery of seven organic acid compound

Compound	Precisions (%RSD)		Recovery	
	Intra -day	Inter -day	Low level (2.0 mg/kg)	High level (20.0 mg/kg)
Formic acid	2.3	3.2	71.6	87.0
Malic acid	3.1	2.9	96.3	95.9
Lactic acid	2.1	2.4	90.4	96.8
Acetic acid	2.7	2.1	91.2	91.6
Citric acid	2.6	2.7	77.3	89.7
Fumaric acid	2.2	3.1	98.1	92.3
Propionic acid	2.4	2.6	76.7	89.4

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석법 검증

개발된 RP-HPLC/UV 분석 방법은 단미사료에서 유기산의 분석에 대한 조건을 충족하는지 확인하기 위하여 유효성 검증을 진행하였고, 이는 직선성 (linearity), 민감성 (sensitivity), 선택성 (selectivity), 정확성 (accuracy) 및 정밀성 (precision)을 통해 검증하였다.

선택성 (selectivity)은 크로마토그램 상에서 피크의 간섭 유무에 의해 결정되고, 이는 특정 정량 파장 (210 nm)에서 빈 크로마토그램을 사용하여 측정하였다. Fig. 1과 Table 2에서 관찰되어 지듯이, 7 개의 유기산

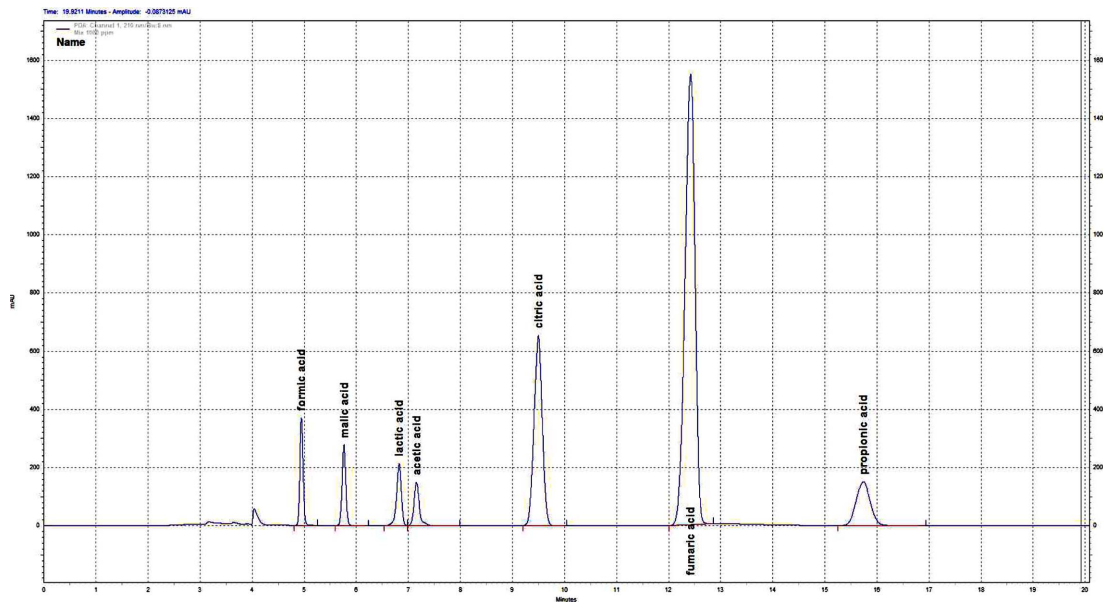


Fig. 1. HPLC Chromatogram for standard.

Table 5. Determination of the content (g/kg) of seven compounds in feed using the proposed method

Sample	Formic acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Fumaric acid	Propionic acid
1	32.01	-	79.32	-	11.31	-	-
2	28.87	-	-	40.82	7.92	-	5.54
3	10.7	-	-	9.26	22.93	-	-
4	16.58	2.02	29.01	14.72	3.24	13.93	42.36
5	3.18	16.72	-	-	-	13.09	44.62
6	-	14.50	17.33	53.8	-	-	-
7	19.3	-	-	-	9.92	-	40.05
8	-	31.05	11.31	-	-	15.02	-
9	14.92	-	41.19	27.43	-	-	27.49
10	-	26.94	-	38.25	-	14.42	-
11	-	29.08	11.05	-	6.37	-	-
12	31.55	-	-	-	-	-	6.77
13	-	-	-	-	5.53	-	-
14	21.94	-	-	-	2.13	-	22.73
15	-	14.27	-	-	15.38	-	-
16	-	-	-	32.59	-	-	7.52
17	-	-	-	-	8.77	16.65	-
18	-	30.01	88.85	-	-	-	-
19	-	61.59	-	-	-	-	-
20	44.22	10.82	30.22	16.67	9.13	14.27	13.91
21	41.13	24.37	-	-	-	-	6.31
22	-	1.53	-	-	15.53	-	-
23	-	-	1.42	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	28.47
25	16.94	11.73	-	-	12.1	-	-
26	-	5.21	-	-	60.09	-	-
27	16.25	-	-	-	-	-	30.25
28	-	52.03	2.29	0.21	-	-	-
29	-	-	-	-	1.61	-	22.95
30	18.62	-	-	-	-	16.21	-
31	-	31.26	-	-	-	15.36	-
32	12.91	-	-	-	9.28	-	-
33	24.38	28.02	12.39	-	-	-	-
34	-	-	24.11	-	-	-	2.77
35	31.23	-	-	13.89	-	-	12.21
36	-	-	-	56.01	-	-	-
37	-	25.05	-	-	-	-	-
38	-	-	-	2.97	74.31	-	-
39	10.06	17.32	18.91	33.02	19.37	15.07	3.58
40	-	-	20.15	-	-	-	-
41	-	-	-	10.93	-	-	27.1
42	11.5	20.85	-	-	17.44	-	-
43	-	-	-	-	-	-	8.76
44	33.47	-	-	-	-	-	-
45	22.03	16.82	21.55	15.05	22.96	16.42	15.59
46	-	20.35	-	7.62	-	-	-

의 Retention time을 살펴보면 16분 이전에 모든 피크가 나타나고, 7 개의 화합물이 모두 성공적으로 분리됨을 알 수 있었다. 또한 Resolution과 Asymmetry가 각각 4.9~15.7, 0.86~1.30으로 나타나 HPLC 시스템에 대한 선택성이 양호함을 확인하였다.

직선성(linearity)은 working solution을 사용하여 각 화합물에 대한 외부 검량선을 작성함으로써 평가하였다. 검량선은 일곱개의 각기 다른 농도와 분석 피크 면적을 설정하여 작성하였고, 혼합 표준 용액의 각 농도는 3 반복으로 주입한 후, 회귀 매개 변수를 계산하였다. 그 결과는 상관계수(R^2)가 0.999 이상으로 나타나 높은 직선성을 확인 할 수 있었으며(Table 3), 이러한 결과는 외부 표준 검량선의 정량 목적을 위해 적용될 수 있음을 보여준다.

민감성(sensitivity)은 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ) 값을 결정함으로써 평가하였고, 이 값은 신호 대 잡음비(S/N비)의 각각의 회귀 방정식에서 반응 및 기울기를 바탕으로 산출하였다. 검출한계는 분석기기의 최적 분석 조건하에서 S/N비의 3:1로써, 3 배에 해당하는 성분의 피크로 하였다. 또한 분석 기기의 정량한계(LOQ)는 목적 성분의 유무가 정확히 판단될 수 있는 최저 농도로, S/N비가 10:1로써, 10 배에 범위에 해당하는 양이며, 본 실험에서는 LOD의 3 배를 적용하였다. 검출 한계의 경우, 43~26,755 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 값의 범위를 설정하였고, 정량 한계는 12~8,026 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 설정하였다(Table 3).

정밀성(precision)은 intra-, inter- day의 정밀성을 측정함으로써 결정하였다. intra-day의 정밀성은 용액을 3일 연속으로 관찰하면서 하루 동안 혼합 표준 용액을 6회 반복하여 분석한 결과이고, 이는 상대 표준 편차(%RSD)의 백분율로써 산출하였다. intra-day에 대한 전반적인 %RSD는 3.1 % 미만이었으며, 반면에 inter-day에 대한 %RSD의 값은 3.2 % 미만으로 나타났다(Table 4).

정확성(accuracy)은 AAFCO(Association of American Feed Control Official, 201591-Swine Mineral and Vitamin Supplement) 시료에 다른 농도(high: 20.0 mg/kg and low: 2.0 mg/kg)의 혼합 표준 용액을 첨가함으로써 평가하였으며, 그 혼합물은 개발된 HPLC 방법을 사용하여 추출하였다. 모든 실험은 3 반복하여 진행하였고, Table 4에서 설명한 바와 같이 79.3~95.2 %의 우수한 회수율을 보였으며, 이 방법에 대한 정확성은 높은 수준으로 나타남을 알 수 있었다. 이와 같이 검증된 자료를 바탕으로 한 이 방법은 유기산의 동시분석에 대

한 직선성, 민감성, 선택성, 정확성 및 정밀성을 제공하기 위함이다.

3.2. 단미사료 중 유기산의 함량

본 연구에서는 유기산이 검출되는 단미사료 46 가지를 가지고 분석을 진행하였으며, 단미사료는 지역자치단체(서울, 경기, 강원, 대전, 충북, 충남, 전북, 전남)에서 의뢰 받은 시료를 사용하였다. 각 시료는 3 반복으로 실험을 진행하였으며, 7 개의 화합물은 표준물질의 Retention time과 UV spectra를 통해 구별하였다. 단미사료에서 7 가지 유기산 화합물의 정성 및 정량의 조성은 상당히 다양하다. 더 구체적으로 살펴보면, formic acid의 함량의 범위가 3.18~44.22 g/kg이고, 평균 함량이 21.99 g/kg이며, malic acid의 함량의 값의 범위와 평균이 각각 1.53~61.59 g/kg, 22.34 g/kg으로 나타남을 알 수 있었다. 또한 lactic acid와 acetic acid의 함량(평균)이 각각 1.42~88.85 g/kg (27.27 g/kg), 0.21~56.01 g/kg (23.33 g/kg)로 확인 되었으며, citric acid의 경우 1.61~74.31 g/kg으로 함량의 범위와 16.77 g/kg을 평균으로 알 수 있었다. fumaric acid는 13.09~16.65 g/kg의 함량과 평균 15.04 g/kg을 확인하였으며, propionic acid의 함량(평균)은 2.77~44.62 g/kg (19.42 g/kg)으로 나타났다.

따라서 단미사료로부터 7 개의 유기산의 정량과 동시분석 검출을 위한 시료, 정성 및 정량적 방법은 RP-HPLC/UV 검출기를 이용하여 성공적으로 개발되었다. 또한 이러한 방법은 정확성과 정밀성을 보여 다른 종류의 사료 또한 이를 적용하여 효율적으로 이용할 수 있을 것이라 판단된다. 결과적으로 본 연구를 통한 이 HPLC 방법은 특이성, 민감성 등으로 인하여 일상적인 분석을 위한 좋은 대안을 제공하고, 단미사료의 안정적인 품질 평가 방법으로써 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. D. W. Kim, J. H. Kim, S. K. Kim, G. H. Kang, H. K. Kang, S. J. Lee and S. H. Kim, *J. Anim. Sci. Technol.*, **51**, 207-216 (2009).
2. J. W. Joo, J. Y. Choi, S. C. Choi, W. T. Cho, B. J. Chae and Y. X. Yang, *J. Anim. Sci. Technol.*, **51**, 15-24 (2009).
3. K. H. Partanen and Z. Mro, *Nutr. Res. Rev.*, **12**, 117-145 (1991).
4. I. H. Hwang, *Feed Industry*, **2**, 58-65 (2004).

5. H. K. Yoon, Y. H. Kim and J. H. Han, *Korean J. Vet. Serv.*, **32**(1), 77-82 (2009).
6. X. Yin, Jianghua Li, H. D. Shin, Guocheng Pu, Long Liu and Jian Chen, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 830-841 (2015).
7. C. H. Lee, I. H. Jo, J. C. Shon and S. H. Lee, *Korean J. Org. Agric.*, **17**, 237-251 (2009).
8. Sung Su Ill, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MFAFF), 506028-3 (2009).
9. Standard and specification for animal feeds, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), 2014-45 (2014.04.29).
10. Rodrigo Scherer, Ana Cecilia Poloni Rybka, Cristiano Augusto Ballus, Adriana Dillenburg Meinhart, Jose Teixeira Filho, Helena Teixeira Godoy, *Food Chem.*, **135**, 150-154 (2012).
11. Hans A. Eyeghe-Bickong, Erik O. Alexandersson¹, Liezel M. Gouws, Philip R. Young and Melane A. Vivier, *J. Chromatogr. B*, **885-886**, 43-49 (2012).
12. Giuseppe Zeppa, Lorenza Conterno and Vincenzo Gerbi, *Agric. Food Chem.*, **59**, 2722-2726 (2001).
13. Jorge Bouzas, Carlos A. Kantt, Floud Bodyfelt and J. Antonio, Torres, *Food Sci.*, **56**, 276-278 (1991).
14. Fabio Chinnici, Umberto Spinabelli, Claudio Riponi and Aureliano Amati, *J. Feed Compos. Anal.*, **18**, 121-130 (2005).
15. X.-Q. Wang, F.-Y. Wei, Z.-F. Wei, L. Zhang, M. Luo, Y.-H. Zhang, Y.-G. Zu and Y.-J. Fu, *Sep. Purif. Technol.*, **35**, 80-87 (2014).
16. Ute Roessner, Cornelia Wagner, Joachim Kopka, Richard N. Trethewey and Lothar Willmitzer, *Plant J.*, **23**, 131-142 (2000).
17. M.-H. Yanga and Y.-M. Choongb, *Food Chem.*, **75**, 101-108 (2001).
18. ICH International Conference Harmonization, Validation of analytical procedures: test and methodology (2005).
19. M. Thompson, S. L. R. Ellison and R. Wood, *Int. Union Pure Appl. Chem.(IUPAC)*, **74**, 835-855 (2002).