Penetapan Niasin Pada Susu Formula Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan Teknik Persiapan Contoh Termodifikasi yang Sederhana

Determination of niacin in infant formula by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with modification simple sample preparation

Erna Febriyanti^{a*}, Nurhajawarsi^b dan Fatan Umbara^c

^a Balai Besar Industri Agro, Kementerian Perindustrian
Jln. Ir. H. Juanda No. 11, Bogor 16122, Indonesia

^b Akademi Komunitas Industri Manufaktur Bantaeng, Program Studi Analisis Kimia, Nipa-Nipa,
Kec. Pa'jukukang, Kab. Bantaeng, Sulawesi Selatan, 92461, Indonesia

^c Institut Pertanian Bogor, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA),
Gedung Kimia, Sayap 2, Lantai 2, Jl. Tanjung, IPB Kampus Darmaga, Bogor, 16680, Indonesia

Riwayat Naskah:

Diterima 09, 2018
Direvisi 05, 2019
Disetujui 06, 2019

ABSTRAK: Metode pengujian niasin terhadap matrik-matrik yang sederhana telah banyak dilakukan, akan tetapi untuk matrik kompleks seperti susu formula masih terbatas. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metode uji niasin pada susu formula menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang handal dan cepat dengan teknik persiapan contoh yang mudah dan sederhana. Niasin ditetapkan secara KCKT detektor UV-Vis berdasarkan perbedaan afinitasnya terhadap fasa diam dalam kolom fasa terbalik kolom C₁₈ menggunakan fasa gerak campuran KH₂PO₄ (pH 7) 0,1 mol/L – metanol (90:10) terhadap cahaya UV di panjang gelombang 261 nm dan laju alir 0,7 mL/menit. Dalam kondisi optimum puncak niasin akan muncul pada waktu retensi 3,26 – 3,30 menit. Metode terpilih memiliki rentang konsentrasi niasin 0,108 sampai 8,64 mg/L dengan nilai koefisien korelasi 0,999, limit deteksi sebesar 0,083 mg/L dan limit kuantitasi sebesar 0,28 mg/kg

Kata kunci: niasin, KCKT, susu formula

ABSTRACT: Several methods to determine the content of niacin in simple matrices have been reported, but for complex matrices such as infant formula is still limited. The aim of this study is to obtain the niacin test method in infant formula using high performance liquid chromatography (HPLC) with easy and simple sample preparation techniques. Niacin was determined by UV-Vis detector HPLC based on the difference in affinity to stationary phase, C₁₈ reversed phase column, using mobile phase, mixture of KH₂PO₄ (pH 7) 0.1 mol/L solution and methanol (90:10) at wavelength 261 nm and flow rate of 0.7 mL/minute. In optimum conditions the peak of niacin will appear at 3.26 - 3.30 minutes of retention time. The chosen method has range of niacin concentrations of 0.108 to 8.64 mg/L with correlation coefficient of 0.999, limit of detection of 0.083 mg/L and a quantitation limit of 0.28 mg/kg.

Keywords: niacin, HPLC, infant formula

* Kontributor utama
Email : erna_febriyanti@yahoo.com

1. Pendahuluan

Niasin atau vitamin B3 dikenal juga dengan asam nikotinat yaitu senyawa organik yang dibutuhkan oleh tubuh. Vitamin B3 merupakan salah satu dari 5 vitamin, apabila tubuh mengalami kekurangan Vitamin B3, maka tubuh akan mengalami dampak penyakit. Kekurangan niasin berakibat penyakit pellagra. Vitamin B3 ini tidak berwarna dan larut dalam air.

Salah satu sumber makanan yang mengandung niasin dan banyak beredar di kalangan masyarakat adalah produk susu formula bayi (*infant formula*). Sumber protein, komposisi makro nutrien dan mikro nutrien serta kandungan dari rantai panjang asam lemak tak jenuh dari susu formula bayi berpengaruh terhadap pertumbuhan (Fleddermann *et al.*, 2013).

Dalam beberapa tahun terakhir, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) telah terbukti menjadi alat pengujian analisis berbagai senyawa termasuk vitamin yang larut dalam air. Metode KCKT memiliki keunggulan pengujian yang lebih spesifik, nondestruktif dan mampu membedakan antara struktur yang berbeda dari vitamin dengan berbagai aktivitas biologinya (Pakin, Bergaentzie, Hubscher, Aoude-Werner, & Hasseimann, 2004).

Penelitian metode KCKT dan spektrofotometri untuk penetapan niasin terhadap matrik-matrik contoh yang sederhana telah banyak dilakukan tetapi untuk matrik yang kompleks masih terbatas (Peng, Li, Zhang, Liu, Yu, & Feng, 2013; Li & Chen, 2010; Rames, Raihan, Supriya, & Sheetal, 2012; Chandra, Bordoloi, Chakraborty, Chakraborty, & Das, 2017). Ketersediaan metode pengujian kadar niasin yang sesuai dengan sifat matrik dan tingkat ketelitian yang dibutuhkan (limit deteksi yang kecil) merupakan faktor penentu dalam memperoleh metode yang handal.

Tujuan dalam penelitian ini adalah tersedianya metode uji niasin dengan menggunakan KCKT yang lebih handal, cepat, dan mengikuti perkembangan teknologi namun tetap ekonomis guna meningkatkan kemampuan laboratorium dalam hal pengujian bahan serta produk pangan sehingga dapat mendukung tersedianya informasi kesehatan dan gizi pangan.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan kimia yang digunakan adalah standar niasin (*HPLC grade*-Sigma Aldrich), contoh susu formula, metanol (*HPLC grade*-JT Bakers), KH_2PO_4 (*extra pure*-Merck), SPE with Sep-Pak C_{18} (500 mg) cartridges, HCl (Merck), NaOH (Merck), ammonium asetat (Merck), asam format (Merck) dan aquabides.

2.2. Alat

Peralatan yang digunakan antara lain adalah : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT, Shimadzu), Discovery C_{18} (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) Supelco, detector UV-Vis dengan panjang gelombang 261 nm (Shimadzu), neraca analitik dengan ketelitian 0,0001 g (Mettler Toledo), peralatan gelas, kertas saring Whatmann no. 42, pemanas contoh, ultrasonik (Branson), vortex (Cole-Parmer), manifold (Merck).

2.3. Metode

2.3.1. Prinsip metode yang digunakan

Kandungan niasin dari contoh-contoh produk pangan dapat ditetapkan secara KCKT dengan detektor UV-Vis berdasarkan perbedaan afinitasnya terhadap fasa diam dalam kolom fasa terbalik C_{18} menggunakan fasa gerak campuran KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L – metanol (90:10) dengan program isokratik terhadap cahaya UV di panjang gelombang 261 nm dan laju alir 0,7 mL/menit.

Untuk persiapan contoh, ada beberapa cara kerja yang dicobakan yaitu :

2.3.2. Metode Ekinci (2004)

Contoh ditimbang sebanyak 5 gram dan dilarutkan dengan menggunakan aquabides, dihomogenkan selama 1 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit. SPE diaktifkan dahulu dengan cara membilas SPE tersebut menggunakan 10 mL metanol dan 10 mL air (pH 4,2). Larutan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam SPE kemudian dibilas dengan 5 mL air (pH 4,2) lalu 10 mL metanol pada laju alir 1,0 mL/menit. Larutan hasil bilasan tadi ditampung dan dikeringkan menggunakan evaporator. Selanjutnya residu dilarutkan dengan fasa gerak dan disaring menggunakan penyaring membran (ukuran pori 0,45 μm). Hasil saringan ditampung dalam vial dan siap diinjeksikan ke KCKT.

2.3.3. Metode Shin, Kim, & Lee (2013)

Contoh ditimbang sebanyak 2 gram dan dilarutkan dengan 30 mL aquabides, kemudian dilakukan vortex dan ultrasonik. 10 mL larutan tersebut dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 5 mL NaOH 5M, lalu dipanaskan pada *waterbath* selama 1 jam. Setelah suhu didinginkan sampai suhu ruang, pH larutan contoh dijadikan 2,5-3,0 dengan menambahkan HCl. Selanjutnya larutan disaring dengan penyaring Whatmann no. 42 dan penyaring membran ukuran pori 0,45 μm .

2.3.4. Metode Staggs (2004)

1-2 gram contoh ditimbang kemudian ditambah 25 mL aquabides dan dilakukan vortex selama 1 menit. 2 mL dari contoh tersebut dipipet ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan 100 °C selama 2 jam. Setelah contoh didinginkan pada suhu ruang, pada contoh dilakukan sentrifugasi selama 10 menit. Kemudian supernatannya ditambah NaOH 10 M sampai pH 2,5 dan disaring dengan penyaring membran dengan ukuran pori 0,45 µm.

2.3.5. Pengukuran kadar

Sebanyak dua replikat untuk masing-masing larutan standar dan contoh diinjeksikan sebesar 20 µL ke dalam sistem KCKT.

Perhitungan :

$$C_{sp} = \frac{(Asp - Intercept)}{slope} \times \frac{fp}{Wsp}$$

Keterangan :

C sp = konsentrasi contoh

A sp = area contoh

fp = faktor pengenceran

W sp = bobot contoh (gram)

Intersep dan slope diperoleh dari linearitas kurva deret standar

Gambar 1. Kromatogram niasin menggunakan ekstraksi SPE dari (A) standar niasin, (B) contoh susu formula

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pemilihan metode uji

Pada awal penelitian digunakan metode seperti yang dilakukan Ekinci (2004) yaitu analisis vitamin

larut dalam air (termasuk niasin) dengan menggunakan *solid phase extraction* (SPE) pada tahap persiapan contoh. SPE yang digunakan adalah Sep-Pak C₁₈ 500 mg. Metode ini telah berhasil digunakan untuk memisahkan niasin dalam contoh sereal, oleh karena itu metode tersebut digunakan pada contoh susu formula. Hasil dari pemisahan dari metode tersebut terlihat pada Gambar 1.

Gambar 2. Kromatogram niasin menggunakan ekstraksi SPE dengan komposisi fasa gerak bufer fosfat : metanol (95:5) dari (A) standar niasin, (B) contoh susu formula

Gambar 3. Kromatogram niasin menggunakan ekstraksi SPE dengan komposisi fasa gerak bufer fosfat : metanol (85:15) dari (A) standar niasin, (B) contoh susu formula

Pada Gambar 1 tersebut dapat dilihat bahwa pada contoh susu formula (B), pemisahan pik niasin belum sempurna oleh karena itu dilakukan percobaan beberapa rasio bufer fosfat dan metanol berturut-turut sebagai berikut: 95:5, 85:5, 80:20, dan 75:25. Hasil kromatogramnya dapat dilihat pada gambar 2, 3, 4 dan 5.

(A)

(B)

Gambar 4. Kromatogram niasin menggunakan ekstraksi SPE dengan komposisi fasa gerak bufer fosfat : metanol (80:20) dari (A) standar niasin, (B) contoh susu formula

(A)

(B)

Gambar 5. Kromatogram niasin menggunakan ekstraksi SPE dengan komposisi fasa gerak bufer fosfat : metanol (75:25) dari (A) standar niasin, (B) contoh susu formula

Dari hasil kromatogram pada Gambar 2, 3, 4 dan 5 tersebut, pik niasin dalam contoh susu formula belum terpisah sempurna walaupun komposisi fasa gerak sudah divariasikan. Hal ini mengindikasikan bahwa pemisahan kedua pik tersebut harus dilakukan pada tahap persiapan contoh. Ketidaksiesuaian SPE yang digunakan dengan matrik yang terdapat dalam contoh menyebabkan tidak dapat terpisahnya niasin dari matrik-matrik pengganggu. Wang, Song, Hang, Wen, & Yang (2010) mengatakan bahwa ketidakberhasilan penggunaan SPE pada preparasi contoh dapat diakibatkan oleh ketidaksiesuaian matrik, beragam pKa dan sifat hidrofilik dari matrik contoh.

(A)

(B)

Gambar 6. Kromatogram niasin dari contoh susu formula menggunakan metode hidrolisis basa

Kemudian digunakan metode preparasi yang dilakukan oleh Shin, Kim, & Lee (2013) dengan menggunakan metode hidrolisis basa. Sebelum larutan contoh disaring menggunakan SPE, larutan dikondisikan pada pH 2,5-3. Pengkondisian ini memerlukan waktu yang cukup lama dikarenakan pH larutan mengalami perubahan yang lama yang mengindikasikan reaksi berjalan lambat. Dari hasil injeksi standar pik terpecah menjadi dua bagian (Gambar 6A) sedangkan pada kromatogram contoh tidak terdapat pik yang muncul pada waktu retensi yang sama dengan standar niasin (Gambar 6B).

Dari hasil tersebut, kemudian dilakukan penggantian fasa gerak seperti pada metode Ekinci (2004) yaitu menggunakan bufer fosfat dan metanol, sehingga diperoleh kromatogram seperti pada Gambar 7. Terlihat bahwa pik standar tunggal (Gambar 7A) dan pik niasin pada contoh hanya muncul sedikit dan masih terhalang oleh pik matrik lain (Gambar 7B).

(A)

(B)

Gambar 7. Kromatogram niasin dari contoh susu formula metode hidrolisis basa dengan fasa gerak metode Ekinci (2004)

Agar hasil lebih maksimal, maka dilakukan penggantian pemanasan menggunakan inkubator dengan menggunakan penangas air suhu di atas 100 °C yang diharapkan dapat meningkatkan intensitas pik niasin dalam sampel.

Larutan contoh sebelum diinjeksikan diatur keasamannya pada pH 2,5 dengan penambahan NaOH 10 M. Namun, basa yang ditambahkan memiliki konsentrasi yang cukup pekat sehingga pH larutan yang didapat sering melampaui pH 2,5. Hasil yang didapat dari persiapan contoh ini dapat dilihat pada Gambar 8.

Gambar 8. Kromatogram niasin pada contoh susu formula dengan pH larutan > 2,5

Pada percobaan selanjutnya fasa gerak yang dipilih adalah campuran bufer fosfat dan metanol. Sedangkan untuk persiapan contoh dilakukan percobaan dengan metode yang dilakukan oleh Staggs (2004) yaitu metode hidrolisis asam yang dibantu dengan proses inkubasi selama 2 jam. Pada supernatan yang akan diinjeksikan ke KCKT, keasaman larutan dikondisikan dahulu pada pH 2,5.

Hasil yang diperoleh terlihat pada gambar 9B, pemisahannya belum sempurna masih ada dua pik besar di kanan dan kiri pik niasin yang tumpang tindih (overlap). Sedangkan untuk larutan standar telah memberikan respon/pik yang baik, seperti terlihat pada Gambar 9A.

(A)

(B)

Gambar 9. Kromatogram standar niasin dan contoh dengan metode hidrolisis asam

Untuk mendapatkan pH larutan contoh yang tepat maka penambahan NaOH dilakukan menggunakan konsentrasi yang lebih rendah (5 molar). Pengkondisian pH ini sangat penting karena menurut Chen & Wolf (2007) vitamin B kompleks lebih stabil dalam keadaan asam. Dapat dilihat pada Gambar 10, pik niasin dapat terpisah lebih baik dari metode-metode lain yang sudah dilakukan.

Gambar 10. Kromatogram niasin pada contoh susu formula dengan pH larutan 2,5

Pik yang diduga niasin ini perlu dikonfirmasi kebenarannya dengan pembacaan spektrum dari pik tersebut dan dibandingkan dengan spektrum

standar niasin. Spektrum untuk setiap senyawa adalah khas sehingga tidak mungkin dua senyawa memiliki spektrum yang sama.

Pada spektrum standar niasin terlihat bahwa panjang gelombang maksimum berada pada 262 nm dan pada contoh susu formula pun menunjukkan hal yang sama. Sedikit perbedaan terlihat pada panjang gelombang antara 200-230 nm. Hal ini dapat disebabkan oleh masih adanya matrik pengganggu pada sampel. Dengan demikian pik yang muncul pada kromatogram contoh adalah betul senyawa niasin.

Metode yang digunakan dalam pengujian niasin di atas harus dapat diandalkan sehingga menjamin

kebenaran data yang diperoleh. Untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode yang didapat tersebut sudah sesuai maka perlu dilakukan suatu langkah validasi metode.

3.2. Kurva deret standar niasin

Nilai koefisien korelasi merupakan indikator kualitas dari parameter linieritas karena menggambarkan proporsionalitas respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi analit yang diukur. Linieritas yang ideal memiliki nilai koefisien korelasi mendekati 1.

Gambar 11. Spektrum standar niasin

Gambar 12. Spektrum niasin dari contoh susu formula

Dari kurva deret standar niasin antara 0,108–0,8 mg/L dapat dilihat bahwa kurva menunjukkan kelinierannya hingga titik ke 10 (8,64 mg/L) dan pada titik ke 11 respon detektor terhadap konsentrasi mulai menurun. Berdasarkan data tersebut maka rentang kerja untuk analisis niasin adalah antara 0.108–8,64 mg/L.

Gambar 13. Kurva deret standar niasin

Berdasarkan data evaluasi deret standar niasin deret standar antara 0,108– 8,64 mg/L seperti pada tabel 1 didapat sebuah kurva regresi seperti pada Gambar 14, dengan persamaan regresi $y = 43392x - 367,2$ dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,999. Konsentrasi teoritis analit berada di sumbu x dan respon analit (luas area) dari instrumen yang digunakan berada pada sumbu y. Hasil tersebut memenuhi syarat keberterimaan, yaitu $r \geq 0,99$ (Association of Official Analytical Chemistry. 2005; Devika, Sudhakar, & Rao, 2012; Harmita, 2004).

Tabel 1
 Data evaluasi linieritas niasin

Standar No.	Konsentrasi Deret Standar (mg/L)	Area
1	0.108	4586.1
2	0.540	20728.9
3	1.080	45896.7
4	2.160	95012.2
5	3.240	142106.6
6	4.320	189601.3
7	5.400	235121.9
8	6.480	273577.1
9	7.560	328869.1
10	8.640	376039.0

3.3. Limit deteksi dan limit kuantisasi

Secara teoritis antara limit deteksi dan limit kuantitasi memiliki korelasi perbandingan 3 : 10, sehingga menggunakan nilai dari salah satu limit tersebut secara teoretis dapat pula ditentukan nilai limit yang lainnya. Namun demikian penggunaan

aturan teoritis tersebut seringkali tidak memuaskan secara praktis, sehingga jika terdapat data aktual yang diperoleh dari evaluasi fisik akan jauh lebih dapat memuaskan.

Gambar 14. Kurva linieritas standar niasin

Tabel 2
 Data evaluasi limit deteksi dan limit kuantitasi

No	Konsentrasi Niasin Teoritis (mg/L)	Waktu Retensi (Menit)	Luas Area	Konsentrasi Niasin Praktis (mg/L)	% Recovery
1	0.0826	3.191	736	0.0858	103.85
2	0.0826	3.187	847	0.0883	106.88
3	0.0826	3.188	693	0.0848	102.68
4	0.0826	3.191	785	0.0869	105.19
5	0.0826	3.191	633	0.0835	101.04
6	0.0826	3.188	761	0.0863	104.53
7	0.0826	3.191	910	0.0897	108.60
Rata-rata			766	0.0865	104.68
SD			92.74	0.0021	2.53
% RSD			12.10	2.42	2.42
CV _{Horwitz}			5.888	23.128	7.945
2/3 CV _{Horwitz}			3.925	15.4187	5.2967
Limit Deteksi (mg/L)				0.083	
Limit Kuantitasi (mg/kg) (Teoritis = 10/3 x LD)				0.28	

Dalam kegiatan penelitian ini limit kuantitasi dievaluasi dengan teknik visual (trial and error), yaitu dengan mencobakan secara langsung nilai konsentrasi analit terendah yang diduga sebagai limit kuantitasi. Biasanya tidak cukup hanya dengan mencoba satu nilai saja, tapi banyak nilai hingga didapat nilai terkecil yang dapat dikuantitasi dengan perolehan %RSD dan % Recovery yang memenuhi syarat keberterimaan. Berdasarkan hasil percobaan didapatkan konsentrasi niasin terendah yang dapat dibaca oleh instrumen adalah 0,083 mg/L dengan %RSD sebagai indikator kualitas presisi sebesar 2,42% dan % recovery sebagai indikator kualitas akurasi berkisar antara 101 sampai 108%.

4. Kesimpulan

Metode pengujian kadar niasin dalam contoh susu formula yang dimodifikasi dari metode Ekinci (2004) dan metode Staggs (2004). Metode terpilih memiliki nilai koefisien korelasi untuk linieritas 0,999 pada rentang konsentrasi 0,108 sampai 8,64 mg/L; limit deteksi sebesar 0,083 mg/L dan konsentrasi limit kuantitasi sebesar 0,28 mg/kg.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada laboratorium instrumen Balai Besar Industri Agro yang telah memberikan fasilitas serta peralatan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Daftar Pustaka

- Association of Official Analytical Chemistry. (2005) AOAC Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. Benyamin Franklin Station: Washington DC.
- Chandra, I., Bordoloi, R., Chakraborty, D., Chakraborty, P., Das, S. R. C., (2017) Development and Validation of UV-Spectroscopic Method for Estimation of NIACIn in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7, 081-084
- Chen, P. & Wolf, W.R. (2007) LC/UV/MS-MRM for The Simultaneous Determination of Water Soluble Vitamins in Multi-vitamin Dietary Supplements. *Analytical Bio Chemistry*. 387, 2441-2448
- Devika, G.S., Sudhakar, M., & Rao, J.V., (2012) Development and Validation of RP- HPLC Method for Simultaneous Determination of Niacin (Extended Release) and Lovastatin in Oral Solid Dosage Form. *Oriental Journal of Chemistry*. 28, 887-893
- Ekinci, R., (2004) The Effect of Fermentation and Drying on The Water-soluble Vitamin Content of Tarhana, a Traditional Turkish Cereal Food. *Food Chemistry*. 90, 127-132
- Fleddermann, M. Fechner, A. Rosler, A. Bahr, M. Pastor, A. Liebert, F. Jahreis, G. (2013) Nutritional Evaluation of Rapeseed Protein Compared to Soy Protein for Quality, Plasma Amino Acids, and Nitrogen Balance – A Randomized Cross-Over Intervention Study in Humans. *Clinical Nutrition*, 32, 519-526
- Harmita. (2004) Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol.1 (3), 117-135
- Li, H., Chen, F., (2010) Simultaneous of Nine-soluble Vitamins in Pharmaceutic Preparations by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Journal of Separation-Science*, 24, 271-274
- Pakin, C. Bergaentzie, M. Hubscher, V. Aoude-Werner, D. Hasseimann, C. (2004) Fluorimetric Determination of Panthothenic Acid in Foods by Liquid Chromatography with Post-column Derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1035, 67-95
- Peng, X., Li, Z., Zhang, Y., Liu, T., Yu, Q., Feng, Y. (2013) Study of Retention Mechanism of a Mixed-Mode Stationary Phase and its Application for The Simultaneous Determination of Ten Water-and Fat-soluble Vitamins by HPLC-UV. *Chromatographia*, 76, 735-745
- Rames, S., Raihan, A., Supriya, R., Sheetal, D. (2012) Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Atorvastatin and Niacin in Tablet Dosage Form. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 364-367
- Shin H, Kim B, Lee J., (2013) Investigation of Isotope Dilution Mass Spectrometric (ID-MS) Method to Determine Niacin in Infant Formula, Breakfast Cereals, and Multivitamins. *Food Chemistry*. 138, 1109-1115
- Staggs, C. G. (2004) Determination of The Biotin Content of Select Foods Using Accurate and Sensitive HPLC/Avidin Binding. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17, 767-776
- Wang Y, Song M, Hang T, Wen A, Yang . (2010) LC-MS-MS Simultaneous Determination of Niacin, Niacinamide, and Nicotinuric Acid in Human Plasma LC-MS-MS and it Application to a Human Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*. 72, 245-253