



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106324142 B

(45)授权公告日 2019.02.01

(21)申请号 201610781220.1

(22)申请日 2016.08.31

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106324142 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(73)专利权人 陈大为  
地址 250033 山东省济南市天桥区生产路  
6-2号

(72)发明人 陈大为

(74)专利代理机构 济南鼎信专利商标代理事务  
所(普通合伙) 37245  
代理人 彭成

(51)Int.Cl.  
G01N 30/02(2006.01) (续)

(56)对比文件  
CN 104198598 A,2014.12.10,  
CN 105116087 A,2015.12.02,  
CN 104914192 A,2015.09.16,  
CN 105424854 A,2016.03.23,  
CN 104749266 A,2015.07.01,  
CN 104730190 A,2015.06.24,  
WO 2011139930 A1,2011.11.10,  
Christopher J. Blake 等.Analytical

procedures for water-soluble vitamins in  
foods and dietary supplements: a review.  
《Anal Bioanal Chem》.2007,第389卷(第1期),  
徐雯 等.固相萃取-HPLC快速测定血清中烟  
酸及其代谢产物.《光谱实验室》.2011,第28卷  
(第6期),  
H. B. Li 等.Simultaneous  
Determination of Twelve Water-and Fat-  
Soluble Vitamins by High-Performance  
Liquid Chromatography with Diode Array  
Detection.《Chromatographia》.2001,第54卷  
(第3-4期),  
Pavlos F. Chatzimichalakis 等  
.Development of a validated HPLCmethod  
for the determination of B-complex  
vitamins in pharmaceuticals and  
biological fluids after solid phase  
extraction.《J.Sep.Sci.》.2004,第27卷(第14  
期), (续)

审查员 潘迪

权利要求书1页 说明书4页 附图5页

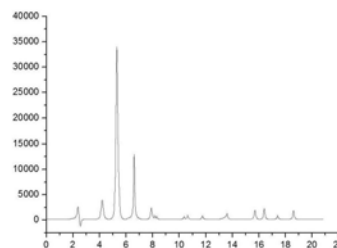
(54)发明名称

半自动样本处理液相色谱技术测定水溶性  
维生素的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用半自动样本处理液  
相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素  
的方法,采用HPLC方法,色谱条件为:流动相A:磷  
酸二氢钾溶液,流动相B:甲醇,梯度洗脱;所述多  
种水溶性维生素选自维生素B1、B2、B6、B9、B12、  
维生素C、烟酸或烟酰胺。对血清进行前处理:先  
用甲醇或乙腈沉淀蛋白,离心后取上清液,用半  
自动固相萃取仪萃取,洗脱液为甲醇水溶液,收  
集的柱后溶液进行氮气吹干至合适体积。本发明

采用高效液相色谱法检测血清中多种水溶性维  
生素,可以实现定性与定量检测,特异性强,灵敏  
性高,通量高,操作简单,成本低,结果客观易于  
分析,尤其适合临床普及应用。



CN 106324142 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*G01N 30/14*(2006.01)

(56)对比文件

Karen W. Phinney 等. Isotope Dilution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Fat- and Water-Soluble Vitamins in Nutritional Formulations.

《Anal. Chem.》.2011,第83卷(第1期),

王希希 等. 反相高效液相色谱法同时测定血清中5种水溶性维生素.《四川大学学报(医学版)》.2010,第41卷(第1期),

王希希 等. 反相高效液相色谱法同时测定血清中5种水溶性维生素.《四川大学学报(医学版)》.2010,第41卷(第1期),

1. 一种利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法, 其特征在于: 采用HPLC方法; 所述水溶性维生素为维生素B1、B2、B6、B9、B12、维生素C、烟酸和烟酰胺; 所述血清进行以下前处理: 先用甲醇或乙腈沉淀蛋白, 离心后取上清液, 用半自动固相萃取仪萃取, 洗脱液为: 甲醇水溶液, 收集的柱后溶液进行氮气吹干至合适体积, 然后进样分析;

色谱条件为: 柱温: 30°C; 色谱柱: Waters XBridge C18 3.5um 4.6\*250mm; 进样体积: 20uL; 流动相A: 磷酸二氢钾溶液, 流动相B: 甲醇; 梯度洗脱条件为: 0-5min A:B=90:10, 5-7min过渡B为50%, 7-12min A:B=50:50, 12-14min过渡B为30%, 14-18min A:B=70:30, 18-22min过渡B为10%, 流速: 0.9mL/min; 波长为260nm。

2. 根据权利要求1所述的利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法, 其特征在于: 步骤如下:

(1) 样品前处理: 向血清样本中加入等体积的乙腈, 涡旋震荡后离心, 取上清液至半自动固相萃取仪, 用甲醇水溶液洗脱; 收集的柱后溶液氮气吹干至合适体积;

(2) 标准工作液的配制: 配制多种水溶性维生素的标准工作液, 备用;

(3) HPLC检测: 将待测样本通过梯度洗脱模式进入色谱柱分离后, 在260nm检测波长下, 对待测物质进行定性与定量检测。

3. 根据权利要求2所述的利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法, 其特征在于: 所述标准工作液的配制具体如下: 以水配制100μg/mL各维生素标准品储备液, 然后用浓度为5%的BSA甲醇溶液制备不同浓度梯度的标准溶液。

## 半自动样本处理液相色谱技术测定水溶性维生素的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法,属于维生素检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 维生素是机体维持正常代谢和机能所必须的一类低分子化合物,是人体七大营养要素之一,分为脂溶性和水溶性维生素两类,人体内维生素必须保持在一个合适的范围才对人体有益,无论缺乏还是升高都会给人体带来危害。维生素B1、B2、B6、B9、B12、维生素C、烟酸、烟酰胺均属于水溶性维生素,人体缺乏该些维生素时会表现出不同的症状: B1缺乏易致脚气病等, B2缺乏致脂溢性皮炎和口腔炎症, B6缺乏易导致贫血, B9叶酸缺乏致胎儿神经管畸形; B12缺乏致巨幼红细胞性贫血; 烟酰胺缺乏会导致食欲不振、记忆力减退、痴呆等。

[0003] 近年来,国内外对维生素认识的重要性在不断提高,根据统计,维生素在美国保健品市场占有主要份额。随着国际维生素市场对中国乃至亚洲市场的不断冲击,以及国内科研单位和企业维生素行业取得的科研成果和技术突破,我国公民自身的保健意识不断增强,随着居民收入水平提高,人们开始补充各类维生素。但是,由于缺乏科学的指导,维生素产品的使用现状很混乱,一些人群为了提高身体各项机能,不惜花重金在保健品上,盲目补充维生素,据2014年中国营养学会调查显示,中国居民由于营养过剩或营养不均衡导致的疾病在逐年增多。如何了解人体是否需要补充所必需的水溶性维生素,只有通过检测体内各种维生素的真实状态,根据检测结果有针对性的调整需要的维生素,检测是科学评估和个性化使用维生素唯一的依据。

### 发明内容

[0004] 针对上述现有技术,本发明提供了一种利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法,采用HPLC方法,色谱条件为:流动相A:0.5mol/L的磷酸二氢钾溶液(在流动相中加入磷酸二氢钾有利于提高分离度,使各种维生素能够较好的分离),流动相B:甲醇,梯度洗脱;所述水溶性维生素选自维生素B1、B2、B6、B9、B12、维生素C、烟酸、烟酰胺中任意三种以上。

[0007] 所述血清,进行以下前处理:先用甲醇或乙腈沉淀蛋白(优选乙腈),离心后取上清液,用半自动固相萃取仪萃取(现有技术中已有的常规设备),洗脱液为:甲醇水溶液,对收集的柱后溶液进行氮气吹干至合适体积,然后进样分析。

[0008] 进一步地,色谱条件为:柱温:30℃;色谱柱:Waters XBridge C183.5um 4.6\*250mm;进样体积:20uL;梯度洗脱条件为:0-5min A:B=90:10,5-7min过渡B为50%,7-12min A:B=50:50,12-14min过渡B为30%,14-18min A:B=70:30,18-22min过渡B为10%,

如表1所示,流速:0.9mL/min;波长为260nm。

[0009] 表1梯度洗脱条件

[0010]

时间(分钟)	A%(体积百分数)	B%(体积百分数)
0	90	10
5	50	50
7	50	50
12	50	50
14	70	30
18	70	30
22	90	10

[0011] 优选的,利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素的方法,步骤如下:

[0012] (1) 样品前处理:向血清样本中加入等体积的乙腈,涡旋震荡后离心,取上清液至半自动固相萃取仪,用甲醇水溶液(甲醇水溶液的体积浓度为70%)洗脱;收集的柱后溶液进行氮气吹干(若洗脱液体积为2ml,则吹干至100 $\mu$ l);

[0013] 进行样品前处理的有益效果是:通过该处理,有效的分离沉淀蛋白,去除杂质,减少干扰,降低基质效应,同时可以最大程度的保留维生素,避免其分解或氧化,从而检测出最真实的维生素含量,同时尽量避免了样品处理过程中有机溶剂对实验操作人员的危害;

[0014] (2) 标准工作液的配制:以水配制100 $\mu$ g/mL各维生素标准品储备液,然后用浓度为5%(单位g/ml)的BSA(牛血清白蛋白)甲醇溶液制备5个梯度(维生素B1:10、25、50、100、250ng/mL;维生素B2:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B6:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B9:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B12:50、100、250、500、1000pg/mL;烟酸:0.5、1、5、10、20 $\mu$ g/mL;烟酰胺:10、50、100、250、500ng/mL;维生素C:1、5、10、25、50 $\mu$ g/mL)的混合标准溶液分装于1.5mL棕色瓶中,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

[0015] (3) HPLC检测:将待测样本通过梯度洗脱模式进入色谱柱分离后,在260nm检测波长下,对待测物质进行定性(以各种维生素的相对保留时间作为定性依据)与定量检测(以标准品制作标准曲线定量)。

[0016] 进一步地,进行定量检测时,应用标准品制作标准曲线,以标准溶液浓度为X轴,标准品峰面积为Y轴,进行线性回归分析得回归方程;将相应维生素峰面积代入标准曲线方程,分别计算血清样品中多种水溶性维生素的浓度。

[0017] 本发明通过对样本前处理方法和高效液相色谱条件的优化(通过具体实验,优化出通用的流动相和流速梯度以及检测波长,优化血清的前处理方法,从而可以同时检测出多种维生素),建立了一种同时检测血清中多种水溶性维生素的方法。采用本发明可以同时检测人血清中多种水溶性维生素B1、B2、B6、B9、B12、维生素C、烟酸、烟酰胺的含量,并进行精确的定性和定量分析,是一种样本处理简单、快速、通量高、结果可靠、低成本的检测方法。

[0018] 本发明在样品前处理过程引入自动固相萃取技术,可以较多的去除杂质,降低检测时的基质效应,且操作简单快捷。使用自动化固相萃取设备,准确地控制液体通过色谱柱

的流速,这样就能够保证最后结果的重现性和实验效率,提高样品处理的准确性和效率。自动化固相萃取系统将操作人员与有机溶剂的接触几率降到最低,使操作人员不再受有机溶剂的危害。

[0019] 本发明采用高效液相色谱法检测血清中多种水溶性维生素,特异性强,灵敏性高,通量高,操作简单,成本低(可以达到和质谱检测器相当的检测水平,但本发明的检测成本要远远低于质谱),结果客观易于分析,尤其适合临床普及应用。基于该方法不仅可以对营养性疾病患者进行病因诊断,还可以对潜在的维生素缺乏者进行用药指导,减少盲目补充维生素的现象发生。

### 附图说明

- [0020] 图1:样品1的色谱图。
- [0021] 图2:样品2的色谱图。
- [0022] 图3:维生素B1的标准曲线示意图。
- [0023] 图4:维生素B2的标准曲线示意图。
- [0024] 图5:维生素B6的标准曲线示意图。
- [0025] 图6:维生素B9的标准曲线示意图。
- [0026] 图7:维生素B12的标准曲线示意图。
- [0027] 图8:烟酸的标准曲线示意图。
- [0028] 图9:烟酰胺的标准曲线示意图。
- [0029] 图10:维生素C的标准曲线示意图。

### 具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0031] 下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等,可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法,检测方法等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规实验方法,检测方法等。

[0032] 实施例1利用半自动样本处理液相色谱技术同时测定血清中多种水溶性维生素

[0033] 步骤如下:

[0034] (1) 制备待测样本:向血清样本中加入等体积乙腈,涡旋震荡后离心,取上清液至半自动固相萃取仪中,进行固相萃取操作,用2ml甲醇水溶液(体积浓度70%)洗脱,将得到的萃取液氮气吹干至100ul,获得待测样本。本实施例制备了样品1、样品2两份样品。

[0035] (2) 高效液相色谱检测:待测样本通过梯度洗脱模式进入色谱柱分离,在260nm检测波长下,对待测物质进行定性(以各种维生素的相对保留时间作为定性依据)与定量检测(以标准品制作标准曲线定量),液相色谱条件如下:

[0036] 色谱柱:Waters XBridge C183.5um 4.6\*250mm;

[0037] 柱温:30℃;

[0038] 进样体积:20uL;

[0039] 流速:0.9mL/min;

[0040] 流动相A:0.5mol/L的磷酸二氢钾溶液;

[0041] 流动相B:甲醇;

[0042] 检测波长:260nm;

[0043] 梯度洗脱条件,如表1所示。

[0044] (3) 计算结果:

[0045] 标准工作液的配制:以水配制100 $\mu$ g/mL各维生素标准品储备液,然后用浓度为5% (单位g/ml)的BSA(牛血清白蛋白)甲醇溶液制备5个梯度(维生素B1:10、25、50、100、250ng/mL;维生素B2:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B6:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B9:1、5、10、25、50ng/mL;维生素B12:50、100、250、500、1000pg/mL;烟酸:0.5、1、5、10、20 $\mu$ g/mL;烟酰胺:10、50、100、250、500ng/mL;维生素C:1、5、10、25、50 $\mu$ g/mL)的混合标准溶液分装于1.5mL棕色瓶中,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

[0046] 应用标准品制作标准曲线,以标准溶液浓度为X轴,标准品峰面积为Y轴;进行线性回归分析得回归方程(如图3~10所示);将相应维生素峰面积代入标准曲线方程,分别计算血清样品中多种水溶性维生素的浓度,结果如表2所示。定性结果如表3所示。

[0047] 表2多种水溶性维生素的标准曲线范围及浓度

[0048]

名称	标准曲线范围	样品1浓度	样品2浓度
维生素B1	10~250ng/mL	38.6ng/mL	85.3ng/mL
维生素B2	1~50ng/mL	16.9ng/mL	8.6ng/mL
维生素B6	1~50ng/mL	7.5ng/mL	14.9ng/mL
维生素B9	1~50ng/mL	11.3ng/mL	8.7ng/mL
维生素B12	50~1000pg/mL	356.9pg/mL	788.2pg/mL
烟酸	0.5~20 $\mu$ g/mL	8.5 $\mu$ g/mL	13.3 $\mu$ g/mL
烟酰胺	10~500ng/mL	126.2ng/mL	187.9ng/mL
维生素C	1~50 $\mu$ g/mL	9.8 $\mu$ g/mL	16.5 $\mu$ g/mL

[0049] 表3多种水溶性维生素保留时间

[0050]

名称	保留时间 (min)
B1	4.2
维生素C	7.9
B2	13.6
B6	15.7
B9	16.4
B12	18.6
烟酸	5.3
烟酰胺	6.6

[0051] 通过表2、表3可以看到,本发明的方法,可以同时检测血清中多种水溶性维生素,特异性强,灵敏性高。

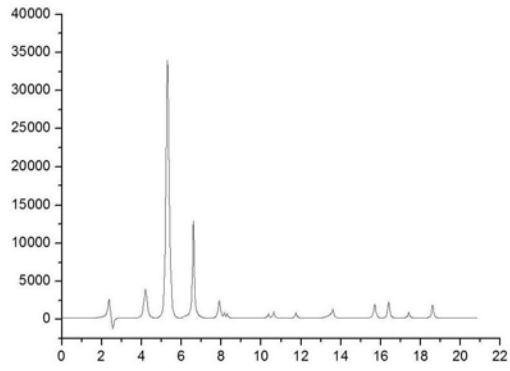


图1

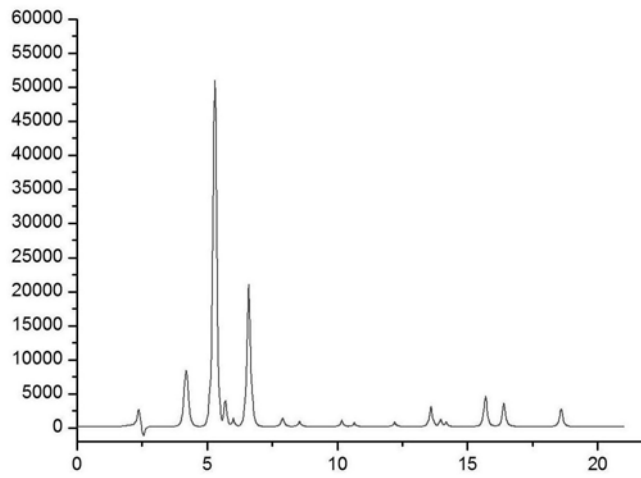


图2

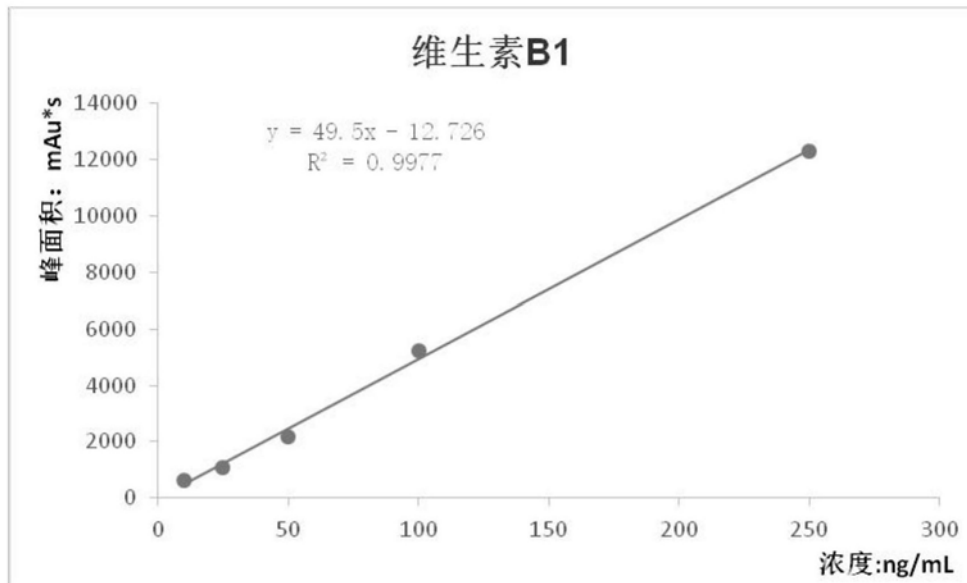


图3



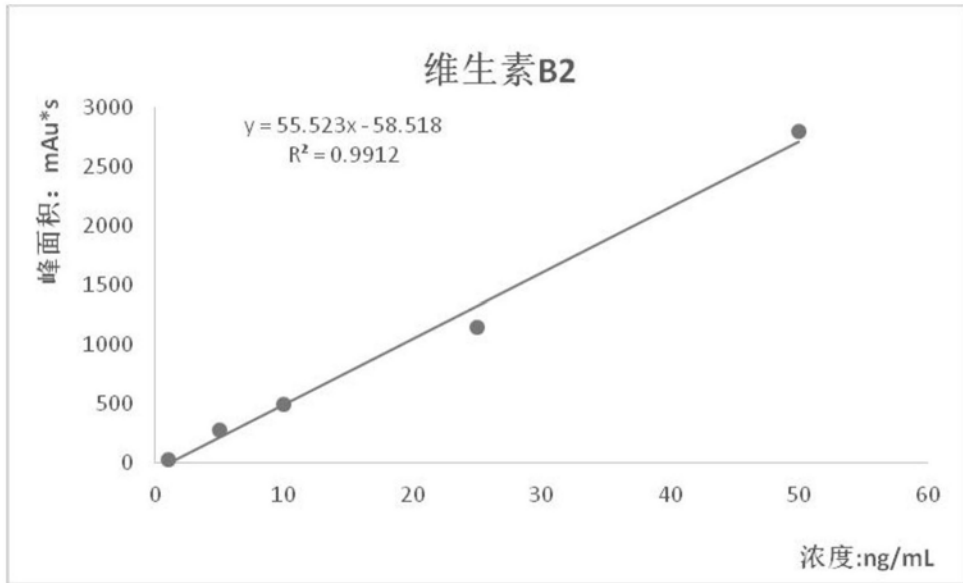


图4

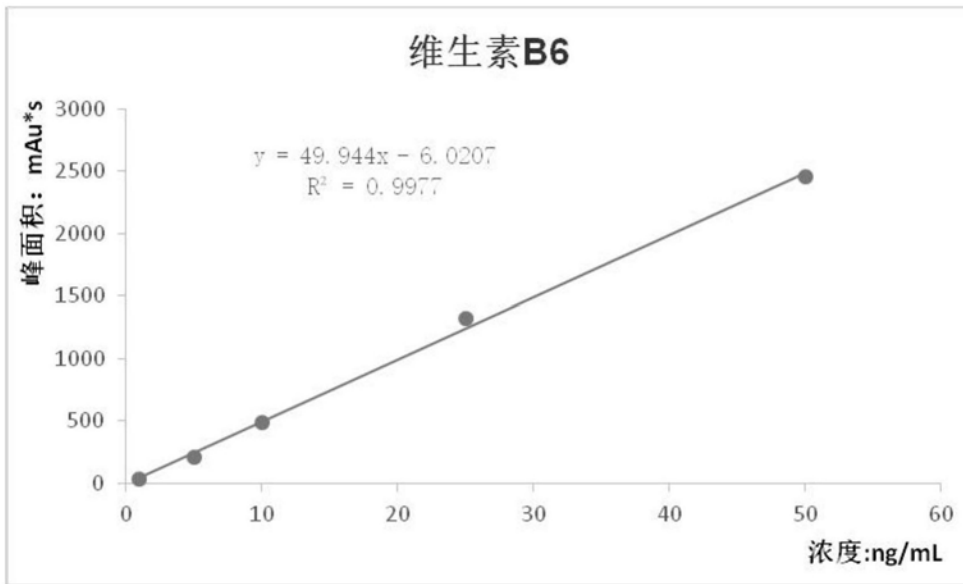


图5

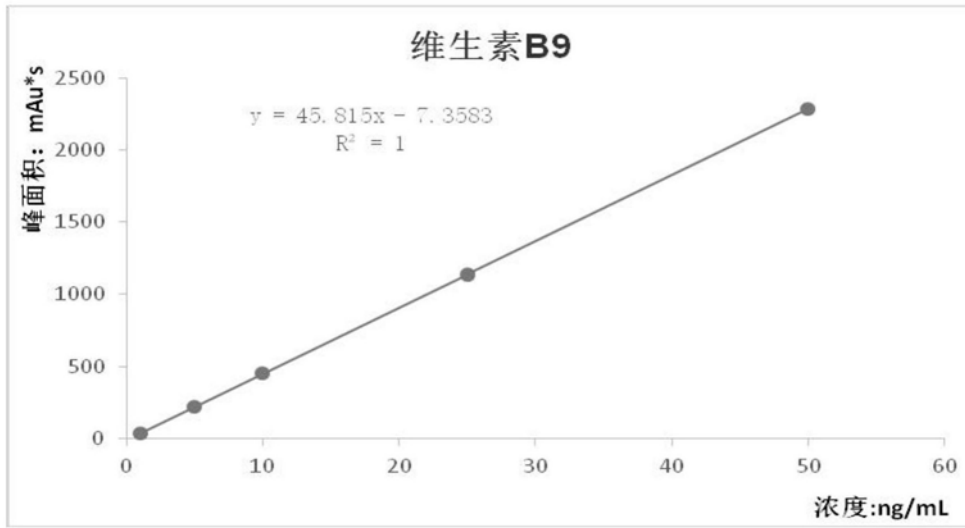


图6

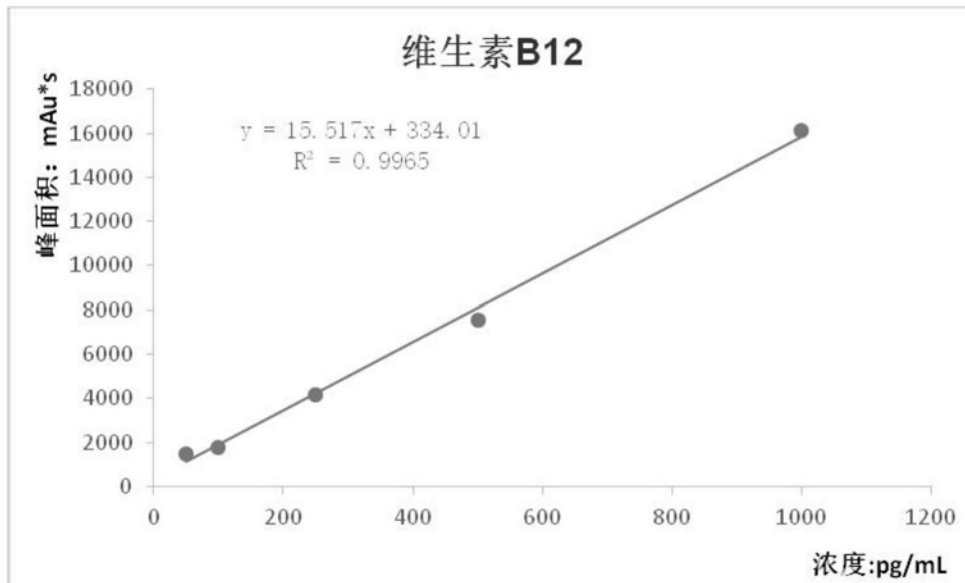


图7

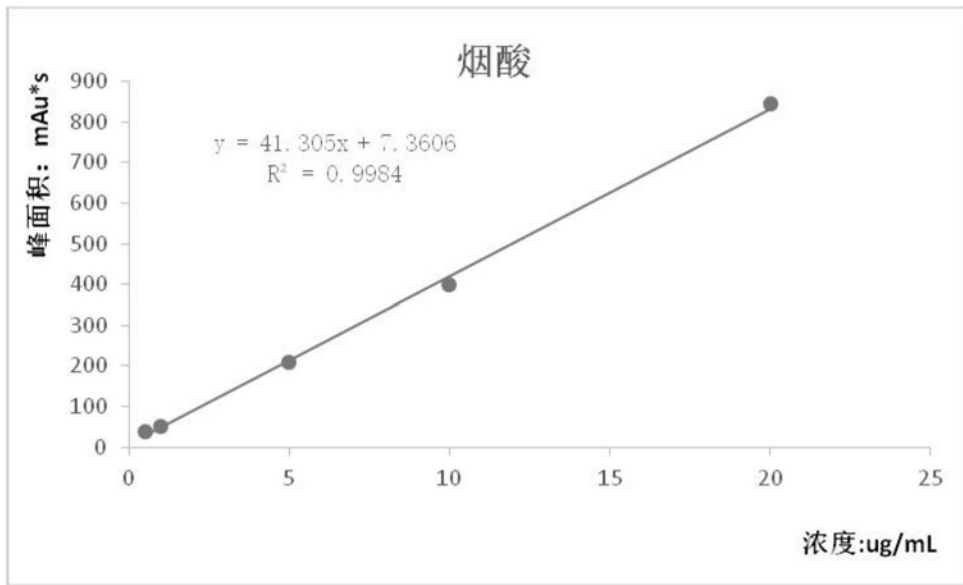


图8

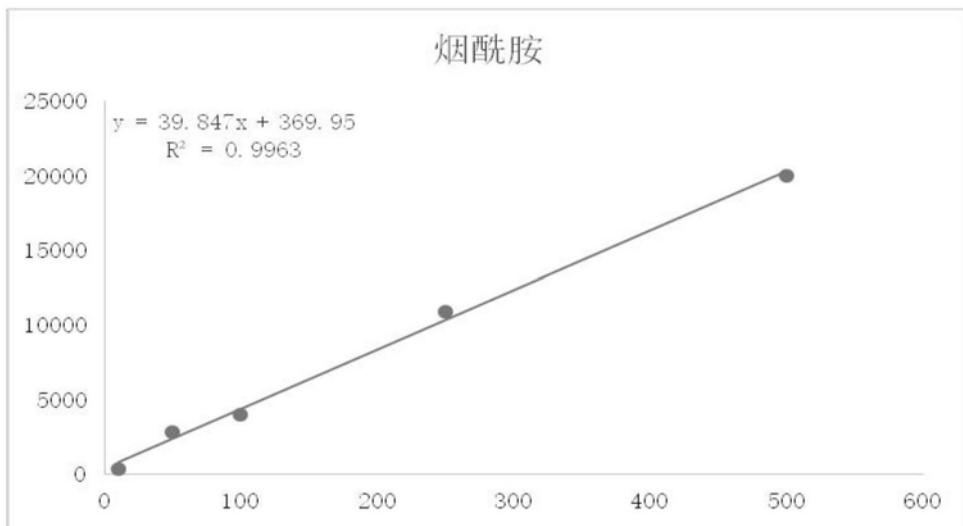


图9

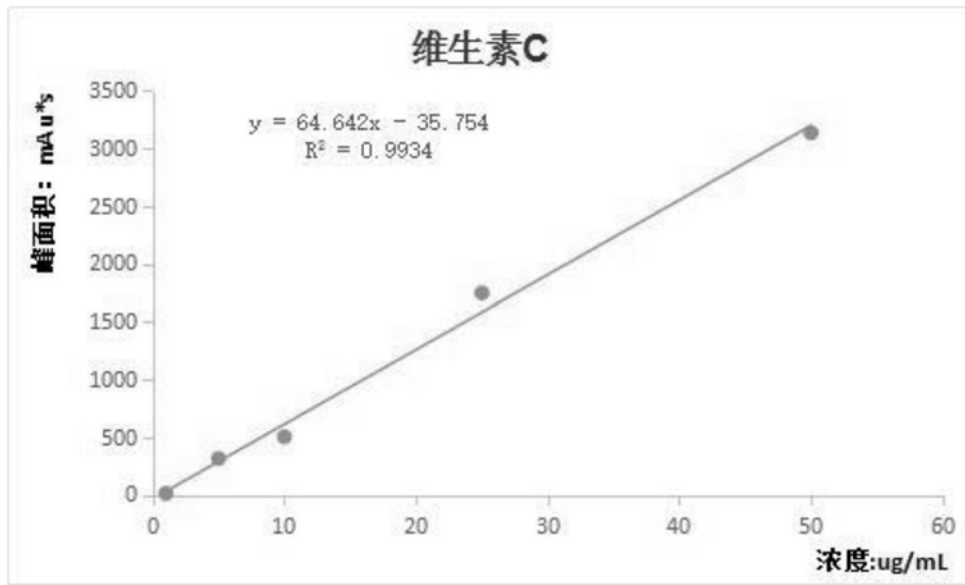


图10