



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111812260 A

(43) 申请公布日 2020.10.23

(21) 申请号 202010740550.2

(22) 申请日 2020.07.28

(71) 申请人 北京和合医学诊断技术股份有限公司

地址 101111 北京市北京经济技术开发区
经海六路5号院14号楼1层、2层、3层、5
层、6层、7层

(72) 发明人 魏斌 贾永娟 许丽 倪君君

(74) 专利代理机构 济南信达专利事务所有限公
司 37100

代理人 李世喆

(51) Int. Cl.

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

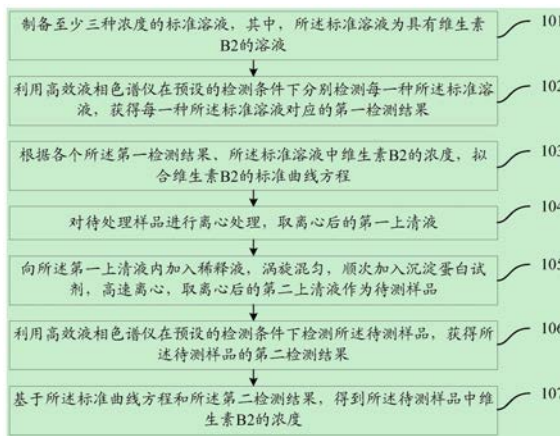
权利要求书1页 说明书8页 附图10页

(54) 发明名称

维生素B2的检测方法

(57) 摘要

本发明提供了维生素B2的检测方法,包括:制备至少三种浓度的标准溶液,其中,标准溶液为具有维生素B2的溶液;利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下分别检测每一种标准溶液,获得每一种所述标准溶液对应的第一检测结果;根据各个所述第一检测结果、所述标准溶液中维生素B2的浓度,拟合维生素B2的标准曲线方程;对待处理样品进行离心处理,取离心后的第一上清液;向所述第一上清液内加入稀释液,涡旋混匀,顺次加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取离心后的第二上清液作为待测样品;利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下检测所述待测样品,获得待测样品的第二检测结果;基于标准曲线方程和所述第二检测结果,得到待测样品中维生素B2的浓度。本方案能够缩短样品检测时间。



1. 维生素B2的检测方法,其特征在于,包括:
制备至少三种浓度的标准溶液,其中,所述标准溶液为具有维生素B2的溶液;
利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下分别检测每一种所述标准溶液,获得每一种所述标准溶液对应的第一检测结果;
根据各个所述第一检测结果、所述标准溶液中维生素B2的浓度,拟合维生素B2的标准曲线方程;
对待处理样品进行离心处理,取离心后的第一上清液;
向所述第一上清液内加入稀释液,涡旋混匀,顺次加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取离心后的第二上清液作为待测样品;
利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下检测所述待测样品,获得所述待测样品的第二检测结果;
基于所述标准曲线方程和所述第二检测结果,得到所述待测样品中维生素B2的浓度。
2. 根据权利要求1所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述检测条件,包括:
长度为100mm、内径为2.1mm以及填料粒径为5 μ m的色谱柱;
洗脱流动相为20mmol/L磷酸二氢钠的水溶液和甲醇;
柱温为28 $^{\circ}$ C;
流速为0.6mL/min。
3. 根据权利要求2所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述洗脱流动相采用等度洗脱;
20mmol/L磷酸二氢钠的水溶液与甲醇的体积比为:77:23。
4. 根据权利要求1所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述标准曲线方程的两个变量分别为:所述第一检测结果中维生素B2的色谱峰面积和所述标准溶液中维生素B2的浓度。
5. 根据权利要求1所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述检测条件还包括:检测器的激发波长为435nm,发射波长为525nm。
6. 根据权利要求1所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述沉淀蛋白试剂包括:三氯乙酸。
7. 根据权利要求1所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述第一上清液与所述沉淀蛋白试剂的体积比为:1:6-1:12。
8. 根据权利要求1至7中任一所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述向第一上清液内加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取第二上清液作为待测样品,包括:
向所述第一上清液加入稀释液,在转速为1000-2000rpm下涡旋混匀0.5-1.0min,再加入沉淀蛋白试剂,在转速为1000-2000rpm下涡旋混匀2-5min,并在转速为10000-15000rpm下高速离心3-6min,取第二上清液作为待测样品。
9. 根据权利要求8所述的维生素B2的检测方法,其特征在于,
所述稀释液包括:蒸馏水。

维生素B₂的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,特别涉及维生素B₂的检测方法。

背景技术

[0002] 维生素B₂对于体内糖类、脂类和氨基酸的新陈代谢是必须的,也是一种细胞抗氧化剂,它作为辅酶通过两次连续的单电子传递来实现这些功能。

[0003] 目前,检测样品中维生素B₂含量通常采用的方法为高效液相色谱法。而高效液相色谱法检测维生素B₂通常需要对待测样品进行较复杂的前处理,耗费时间较多,从而导致样品检测时间较长。

发明内容

[0004] 本发明提供了维生素B₂的检测方法,能够缩短样品检测时间。

[0005] 为了解决上述问题,本发明实施例提供了维生素B₂的检测方法,包括:

[0006] 制备至少三种浓度的标准溶液,其中,所述标准溶液为具有维生素B₂的溶液;

[0007] 利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下分别检测每一种所述标准溶液,获得每一种所述标准溶液对应的第一检测结果;

[0008] 根据各个所述第一检测结果、所述标准溶液中维生素B₂的浓度,拟合维生素B₂的标准曲线方程;

[0009] 对待处理样品进行离心处理,取离心后的第一上清液;

[0010] 向所述第一上清液内加入向所述第一上清液内加入稀释液,涡旋混匀,顺次加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取离心后的第二上清液作为待测样品;

[0011] 利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下检测所述待测样品,获得所述待测样品的第二检测结果;

[0012] 基于所述标准曲线方程和所述第二检测结果,得到所述待测样品中维生素B₂的浓度。

[0013] 需要说明的是,第一上清液为血清或血浆。

[0014] 优选地,

[0015] 所述检测条件,包括:

[0016] 长度为100mm、内径为2.1mm以及填料粒径为5 μ m的色谱柱;

[0017] 洗脱流动相为20mmol/L磷酸二氢钠的水溶液和甲醇;

[0018] 柱温为28 $^{\circ}$ C;

[0019] 流速为0.6mL/min。

[0020] 具体地,色谱柱包括Waters Xbridge-C₁₈,5 μ m,2.1mm \times 100mm。

[0021] 优选地,

[0022] 所述洗脱流动相采用等度洗脱;

[0023] 20mmol/L磷酸二氢钠的水溶液与甲醇的体积比为:77:23。

[0024] 具体地,洗脱时间为3.5min。

[0025] 优选地,

[0026] 所述标准曲线方程的两个变量分别为:所述第一检测结果中维生素B2的色谱峰面积和所述标准溶液中维生素B2的浓度。

[0027] 具体地,第一检测结果中维生素B2的色谱峰面积可以作为标准曲线方程的横坐标也可作为纵坐标,当维生素B2的色谱峰面积作为标准曲线方程的横坐标时,标准溶液中维生素B2的浓度作为标准曲线方程的纵坐标;当维生素B2的色谱峰面积作为标准曲线方程的纵坐标时,标准溶液中维生素B2的浓度作为标准曲线方程的横坐标。

[0028] 优选地,

[0029] 所述检测条件还包括:检测器的激发波长为435nm,发射波长为525nm。在该波长下可以检测出维生素B2,还可以检测出杂质峰。

[0030] 具体地,检测器包括岛津RF-20A,响应时间为0.5s,增益为16,设备灵敏度较高。

[0031] 优选地,

[0032] 所述沉淀蛋白试剂包括:三氯乙酸。

[0033] 具体地,三氯乙酸包括5%的三氯乙酸,该浓度的三氯乙酸不仅可以完成对待处理样品的蛋白沉淀,还可以避免酸性过大造成对色谱柱不可逆的损害。

[0034] 优选地,

[0035] 所述第一上清液与所述沉淀蛋白试剂的体积比为:1:6-1:12。

[0036] 针对待测样品与沉淀蛋白试剂的体积比来说,1:6-1:12是指1:6到1:12范围内的任一比例,比如,1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11和1:12。

[0037] 比如,对10 μ l的第一上清液进行蛋白沉淀,需要沉淀蛋白试剂最少用量为60 μ l,最多用量为120 μ l。6倍至12倍体积的沉淀蛋白试剂可以更完全地对第一上清液内的蛋白进行沉淀,还可以避免沉淀蛋白试剂用量过多造成检测成本增加,同时,还可以避免沉淀蛋白试剂用量过多导致对第一上清液的稀释强度多大不易检测待处理样品内的维生素B2。

[0038] 优选地,

[0039] 所述向第一上清液内加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取第二上清液作为待测样品,包括:

[0040] 向所述第一上清液加入稀释液,在转速为1000-2000rpm下涡旋混匀0.5-1.0min,再加入沉淀蛋白试剂,在转速为1000-2000rpm下涡旋混匀2-5min,并在转速为10000-15000rpm下高速离心3-6min,取第二上清液作为待测样品。

[0041] 具体地,向血清或血浆内加入稀释液可以通过对第一上清液进行稀释,降低第一上清液内杂质的干扰程度,然后通过沉淀蛋白试剂对稀释后的第一上清液进行蛋白沉淀处理,得到能够进行测试的待测样品。

[0042] 针对涡旋时的转速来说,1000-2000rpm是指1000rpm至2000rpm范围内的任一转速,比如,1000rpm、1100rpm、1200rpm、1300rpm、1400rpm、1500rpm、1600rpm、1700rpm、1800rpm、1900rpm以及2000rpm。

[0043] 针对加入稀释液后的涡旋时间来说,0.5-1min是指0.5min至1.0min范围内的任一时间,比如,0.5min、0.6min、0.7min、0.8min、0.9min以及1.0min。

[0044] 针对离心转速来说,10000-15000rpm是指10000rpm至15000rpm范围内的任一转

速,比如,10000rpm、11000rpm、12000rpm、13000rpm、14000rpm以及15000rpm。

[0045] 针对涡旋转速来说,2-5min是指2min至5min范围内的任一值,比如,2min、3min、4min以及5min。

[0046] 针对离心时间来说,3-6min是指3min至6min范围内的任一时间,比如,3min、4min、5min以及6min。

[0047] 优选地,用于对第一上清液进行稀释的稀释液包括:蒸馏水。

[0048] 本发明提供了维生素B2的检测方法,通过高效液相色谱仪对含有不同浓度的维生素B2的标准溶液进行检测,可以得到每种浓度的标准溶液对应的第一检测结果,然后基于各种浓度标准溶液中的维生素B2的浓度和多个检测结果拟合得到维生素B2的标准曲线方程。对待处理样品离心处理后的第一上清液加入稀释液,可以对第一上清液进行稀释,以降低稀释后的溶液中的杂质的干扰,有利于蛋白沉淀。再对稀释后的溶液进行蛋白沉淀得到待测样品,对待测样品进行检测可以得到待测样品的第二检测结果,基于标准曲线方程和第二检测结果即可得到待测样品中维生素B2的含量。通过对待处理样品进行离心、蛋白沉淀后得到待测样品,前处理相对简单,耗费时间较少,从而可以实现缩短样品检测时间。并且仅通过高效液相色谱仪即可完成测试,而无需通过液质联用仪,因此可以减少分析成本,且高效液相色谱仪对场地要求相对较低。

附图说明

[0049] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0050] 图1是本发明一实施例提供的维生素B2的检测方法的流程图;

[0051] 图2是本发明一实施例提供的标准溶液中的维生素B2的色谱图;

[0052] 图3是本发明一实施例提供的待测样品中的维生素B2的色谱图;

[0053] 图4是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为乙腈的色谱图;

[0054] 图5是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为甲醇的色谱图;

[0055] 图6是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为无水乙醇的色谱图;

[0056] 图7是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为氢氧化钾的色谱图;

[0057] 图8是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为硫酸锌的色谱图;

[0058] 图9是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为盐酸的色谱图;

[0059] 图10是本发明一实施例提供的沉淀蛋白试剂为偏磷酸的色谱图;

[0060] 图11是本发明一实施例提供的一种激发波长、发射波长下的色谱图;

[0061] 图12是本发明一实施例提供的另一种激发波长、发射波长下的色谱图;

[0062] 图13是本发明一实施例提供的又一种激发波长、发射波长下的色谱图;

[0063] 图14是本发明一实施例提供的又一种激发波长、发射波长下的色谱图;

[0064] 图15是本发明一实施例提供的一种流速下的色谱图;

[0065] 图16是本发明一实施例提供的另一种流速下的色谱图;

[0066] 图17是本发明一实施例提供的一种柱温下的色谱图;

[0067] 图18是本发明一实施例提供的另一种柱温下的色谱图。

具体实施方式

[0068] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0069] 目前,检测待测样品中维生素B2常用采用荧光法,荧光法又分为测定自身荧光的维生素B2荧光法和测定分解产物荧光的光黄素荧光法。

[0070] 对于测定自身荧光的维生素B2荧光法来说,该方法分析精度不高,只适合于测定比较纯的试样,这样就需要对待测样品进行提纯处理。

[0071] 对于测定分解产物荧光的光黄素荧光法来说,该方法灵敏度、精密度较测定自身荧光的维生素B2荧光法有所提高,但需要被完全提取。

[0072] 通过上述描述可见,采用荧光法检测待测样品中维生素B2,需要对待测样品中维生素B2进行提纯处理,而对于基质成分复杂的样本来说,提纯操作耗时通常较长,且操作较繁琐,这就增加了待测样品中维生素B2整体的检测时长。

[0073] 基于上述问题,本发明实施例提供了维生素B2的检测方法,如图1所示,包括:

[0074] 步骤101:制备至少三种浓度的标准溶液,其中,所述标准溶液为具有维生素B2的溶液;

[0075] 步骤102:利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下分别检测每一种所述标准溶液,获得每一种所述标准溶液对应的第一检测结果;

[0076] 步骤103:根据各个所述第一检测结果、所述标准溶液中维生素B2的浓度,拟合维生素B2的标准曲线方程;

[0077] 步骤104:对待处理样品进行离心处理,取离心后的第一上清液;

[0078] 步骤105:向所述第一上清液内加入稀释液,涡旋混匀,顺次加入沉淀蛋白试剂,高速离心,取离心后的第二上清液作为待测样品;

[0079] 步骤106:利用高效液相色谱仪在预设的检测条件下检测所述待测样品,获得所述待测样品的第二检测结果;

[0080] 步骤107:基于所述标准曲线方程和所述第二检测结果,得到所述待测样品中维生素B2的浓度。

[0081] 在本发明实施例中,通过高效液相色谱仪对含有不同浓度的维生素B2的标准溶液进行检测,可以得到每种浓度的标准溶液对应的第一检测结果,然后基于各种浓度标准溶液中的维生素B2的浓度和多个检测结果拟合得到维生素B2的标准曲线方程。对待处理样品离心处理后的第一上清液加入稀释液,可以对第一上清液进行稀释,以降低稀释后的溶液中的杂质的干扰,有利于蛋白沉淀。再对稀释后的溶液进行蛋白沉淀得到待测额样品,对待测样品进行检测可以得到待测样品的第二检测结果,基于标准曲线方程和第二检测结果即可得到待测样品中维生素B2的含量。通过对待处理样品进行离心、蛋白沉淀后得到进行测试待测样品,前处理相对简单,耗费时间较少,从而可以实现缩短样品检测时间。并且仅通过高效液相色谱仪即可完成测试,而无需通过液质联用仪,因此可以减少分析成本,且高效

液相色谱仪对场地要求相对较低。

[0082] 下面以几个实施例对维生素B2的检测方法进行详细说明。

[0083] 实施例1:制备系列浓度的标准溶液

[0084] 精确称取维生素B2标准品10mg置于100ml容量瓶,用蒸馏水进行溶液,并定容至标线,得到标准储备液。取适量标准储备液,用蒸馏水进行稀释,所得到的溶液中的维生素B2浓度为640 μ g/L,然后继续用蒸馏水进行稀释,配制成浓度分别为20 μ g/L、40 μ g/L、80 μ g/L、160 μ g/L、320 μ g/L、640 μ g/L浓度的维生素B2的标准工作液,并在-80 $^{\circ}$ C条件下保存。

[0085] 用移液器分别移取5 μ L标准工作液和195 μ L蒸馏水置于1.5mL离心管中混合制成六种不同浓度的标准溶液,将上述标准溶液分别在转速为1500rpm下涡旋混匀0.5min后,加入5%三氯乙酸400 μ L,并在转速为1500rpm下涡旋混匀3min后,在转速为12000转/分钟下高速离心5min后,移取上清液200 μ L作为标准溶液。

[0086] 实施例2:拟合标准曲线方程

[0087] 利用高效液相色谱仪对实施例1中六种标准溶液分别进行检测,得到六种不同浓度的维生素B2的标准溶液的色谱图。

[0088] 从上述维生素B2的标准溶液色谱图中分别得到六种标准溶液中维生素B2的峰面积,以上述每种浓度的标准溶液的色谱图中得到的维生素B2标准溶液的峰面积作为标准曲线方程的纵坐标y1,以上述维生素B2标准溶液中的浓度作为标准曲线方程的横坐标x1,将以上检测所得的不同浓度的数据进行线性回归,拟合得到标准曲线方程为 $y_1 = a \cdot x_1 + b$,并且得出权重系数a、b,权重系数a为标准曲线方程的斜率,权重系数b为标准曲线方程的截距。

[0089] 上述检测条件包括:

[0090] 色谱柱:Waters Xbridge-C₁₈,填料粒径5 μ m,内径为2.1mm,长度为100mm;

[0091] 洗脱流动相:20mmol/L磷酸二氢钠的水溶液与甲醇的体积比为=77:23,等度洗脱,洗脱时间为3.5min;

[0092] 柱温为28 $^{\circ}$ C;

[0093] 流速为0.6mL/min。

[0094] 高效液相色谱仪中的检测器为岛津RF-20A检测器,其激发波长为435nm,发射波长为525nm,响应时间为0.5sec,增益为16。

[0095] 高效液相色谱仪所使用的在线过滤器为安捷伦1290Infinity LC在线过滤器,滤芯入口内径2.0mm,孔径0.3 μ m。

[0096] 需要说明的是,在制备不同浓度的标准溶液后,可按照处理待处理样品时的前处理操作,对不同浓度的标准溶液进行前处理,即,标准溶液中的涡旋转速时间、沉淀蛋白试剂、加入沉淀蛋白试剂后的涡旋时间和转速以及离心转速和时间均与待处理样品的前处理保持一致,以消除系统误差,提高检测结果的准确度。

[0097] 实施例3:待测样品的处理

[0098] 3.1取待处理血液至少5ml,在离心速度为3500rpm下离心10min,取上清液得血清或血浆,上述血清或血浆置于-20 $^{\circ}$ C冷冻下保存至分析前备用。

[0099] 3.2用移液枪移取加入50 μ L步骤3.1中的血清或血浆,添加150 μ L蒸馏水在转速为1500rpm下涡旋混匀0.5min后,加入5%三氯乙酸400 μ L。并在转速为1500rpm下涡旋混匀

3min后,在转速为12000转/分钟下高速离心5min后,移取上述上清液200 μ L至棕色进样小瓶,得到上清液即为待测样品。

[0100] 实施例4:待测样品的检测

[0101] 利用高效液相色谱仪采用实施例2中的检测条件对待测样品进行检测,得到待测样品的色谱图。

[0102] 从待测样品的色谱图中可以得到待测样品中维生素B2的色谱峰面积,将待测样品中的维生素B2的色谱峰面积作为纵坐标y1,代入到实施例2的标准曲线方程为 $y1 = a * x1 + b$ 中,由于权重系数a和b已知,所以可以得出待测样品中维生素B2的浓度。

[0103] 实施例5:维生素B2的检测方法的线性关系和定量限

[0104] 分别移取实施例1中六种浓度的维生素B2的标准工作液,分别向移取的标准工作液中加入195 μ L蒸馏水,涡旋混匀,使得六种稀释后的标准工作液的浓度在2 μ g/L到64 μ g/L范围内。

[0105] 利用高效液相色谱仪采用实施例2中的检测条件对本实施例稀释后的六种标准工作液按照浓度由低至高的顺序进行检测,并以定量色谱峰面积-浓度作图,得到标准曲线,结果表明线性范围和定量限如下:

[0106] (1) 检测限 (LOD): 标准溶液中的维生素B2为0.6 μ g/L;待测样品中的维生素B2为2.3 μ g/L。

[0107] (2) 定量限 (LOQ): 标准溶液中的维生素B2为2.0 μ g/L;待测样品中的维生素B2为7.5 μ g/L。

[0108] (3) 线性范围:

[0109] 上述六种稀释后的标准工作液中的维生素B2在2 μ g/L到64 μ g/L范围内,线性良好,相关系数 $R^2 > 0.9900$ 。

[0110] 实施例6:维生素B2的检测方法的回收率和精密度

[0111] 分别移取实施例1中六种浓度的维生素B2的标准工作液,配置成低、中、高3中浓度进行加样回收实验和精密度实验,利用高效液相色谱仪采用实施例2中的检测条件进行测定,重复分析测定3批次,本实施例稀释后的标注工作液中维生素B2的回收率和精密度如下述表1所示。本实施例稀释后的标准工作液中的维生素B2在低、中、高的3个添加水平范围内的平均回收率为98.3%~101.5%,相对标准偏差为0.53%~1.27%。

[0112]	加标量	2 μ g/L	8 μ g/L	32 μ g/L
	平均回收率	98.3%	98.3%	101.5%
	精密度RSD	0.53%	1.27%	0.57%

[0113] 综合上述验证试验,本实施例的检测限、回收率和精密度等各项技术指标均符合要求,本方案检测血液中维生素B₂含量的重现性良好,加样回收率高,实现了提高检测结果准确度的目的。

[0114] 在本实施例中,标准溶液中维生素B2的色谱图见图2所示,待测样品中维生素B2的色谱图见图3所示,图2和图3中的维生素B2的保留时间均为2.33min,由图2和图3可知本实施例方法分析时间短、干扰杂质少,特异性强。

[0115] 需要说明的是,图2和图3的横坐标均为采集时间,纵坐标均为离子信号强度。

[0116] 实施例7:针对沉淀蛋白试剂的说明

[0117] 请参考图3至图10所,图4至图10是与实施例3和实施例4中待测样品的检测相对应的平行试验,图4至图10与实施例3和实施例4中待测样品检测区别是沉淀蛋白试剂不同。

[0118] 图4中的沉淀蛋白试剂为乙腈,图5中的沉淀蛋白试剂为甲醇,图6中的沉淀蛋白试剂为无水乙醇,图7中的沉淀蛋白试剂为1mol/L氢氧化钾,图8中的沉淀蛋白试剂为0.2mol/L硫酸锌,图9中的沉淀蛋白试剂为1mol/L盐酸,图10中的沉淀蛋白试剂为5%偏磷酸。

[0119] 通过图4至图6可以看出用乙腈、甲醇和无水乙醇进行蛋白沉淀后检测的维生素B2响应较低。也就是说,乙腈、甲醇和无水乙醇对于待处理样品中的蛋白沉淀效果较差,使得待处理样品中的蛋白和维生素B2的分离效果较差,从而导致加入蛋白沉淀剂离心后取得的上清液中维生素B2含量较低,不利于对待处理样品中维生素B2的检测。

[0120] 由于图7中利用1mol/L氢氧化钾对待处理样品进行蛋白沉淀,使得保留时间约为1.1min的杂质峰拖尾,导致待测样品中的维生素B2与杂质峰未完全分离,并且,维生素B2的响应相对于图3中维生素B2的响应相对较低,不利于待测样品中维生素B2的检测,也不利于工作人员查看检测情况。

[0121] 由于图8中利用0.2mol/L硫酸锌对待处理样品进行蛋白沉淀,使得待测样品的维生素B2的响应相对图3中维生素B2的响应相对较低,不利于待测样品中维生素B2的检测,也不利于工作人员查看检测情况。

[0122] 由于图9中利用1mol/L盐酸对待处理样品进行蛋白沉淀,使得保留时间约为1.52min的杂质峰后拖尾,导致与维生素B2未完全分离,不利于检测维生素B2的含量。

[0123] 由于图10中利用5%偏磷酸对待处理样品进行蛋白沉淀,使得待测样品的维生素B2的响应相对图3中维生素B2的响应相对较低,不利于待测样品中维生素B2的检测,也不利于工作人员查看检测情况。

[0124] 综上所述,相对于其他的沉淀蛋白试剂,选用三氯乙酸对待处理样品进行蛋白沉淀,可以降低杂质峰对维生素B2色谱峰的干扰,同时,维生素B2的响应相对较高,利于检测。

[0125] 实施例8:针对激发波长和发射波长的说明

[0126] 请参考图11至图14,图11至图14对应的试验是与实施例3和实施例4中待测样品的检测相对应的平行试验,图11至图14与实施例3和实施例4中待测样品检测区别是激发波长和发射波长不同。

[0127] 图11中的激发波长:415nm,发射波长:505nm;图12中的激发波长:455nm,发射波长:545nm;图13中的激发波长:385nm,发射波长:475nm;图14中的激发波长:485nm,发射波长:575nm。

[0128] 通过图11至图14可以看出,维生素B2在图11至图14分别对应的激发波长和发射波长下的检测,相对于在本方案激发波长435nm,发射波长525nm的检测,目标物响应相对较低,不利于目标物的检测。

[0129] 实施例9:针对流速的说明

[0130] 请参考图15和图16,图15和图16对应的试验是与实施例3和实施例4中待测样品的检测相对应的平行试验,图15和图16与实施例3和实施例4中待测样品检测区别是检测条件中的流速不同。

[0131] 图15中的流速为0.7mL/min,图16中的流速为0.4mL/min。

[0132] 通过图15可以看出目标物与杂质峰分离相对较好,但是色谱柱在0.7mL/min的相

对于0.6mL/min流速下的柱压相对较高,且响应也相对较差。

[0133] 通过图16可以看出目标物色谱峰的出现效果相对较差,且响应也相对较差。

[0134] 实施例10:针对柱温的说明

[0135] 请参考图17和图18,图17和图18对应的试验是与实施例3和实施例4中待测样品的检测相对应的平行试验,图15和图16与实施例3和实施例4中待测样品检测区别是检测条件中的柱温不同。

[0136] 图17中的柱温为23℃,图18中的柱温为33℃。

[0137] 通过图17可以看出,目标物在柱温23℃下相对于本方案的柱温28℃下,响应相对较差,不利于目标物的检测。

[0138] 通过图18可以看出,目标物与杂质峰的分离效果较差,且出峰效果较差。

[0139] 需要说明的是,图3至图18中缺失的图形不影响本方案的技术内容。

[0140] 需要说明的是,在本文中,诸如第一和第二之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个“••••”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同因素。

[0141] 最后需要说明的是:以上所述仅为本发明的较佳实施例,仅用于说明本发明的技术方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换、改进等,均包含在本发明的保护范围内。

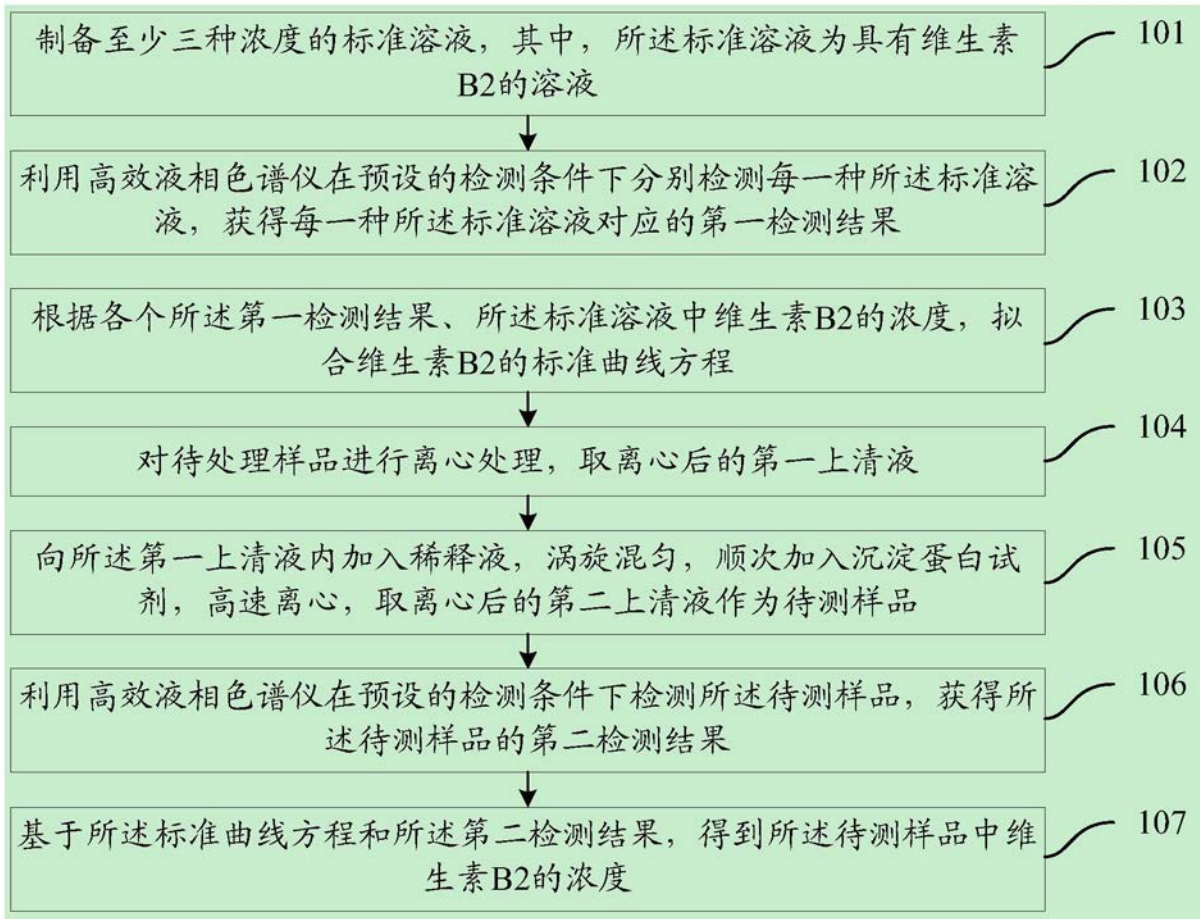


图1

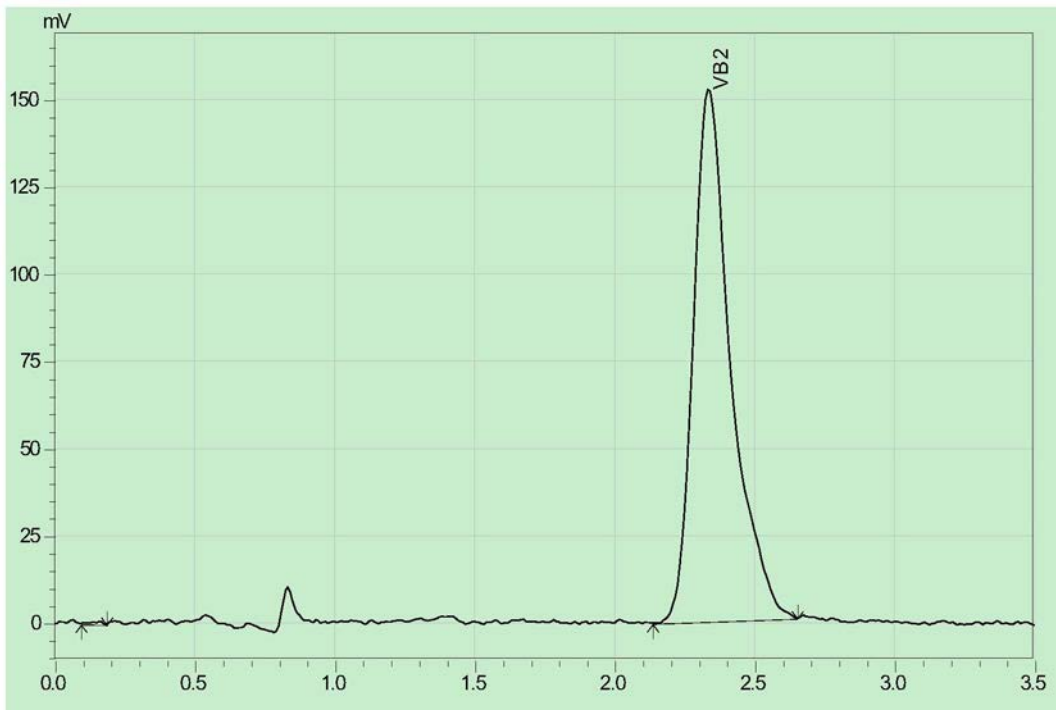


图2

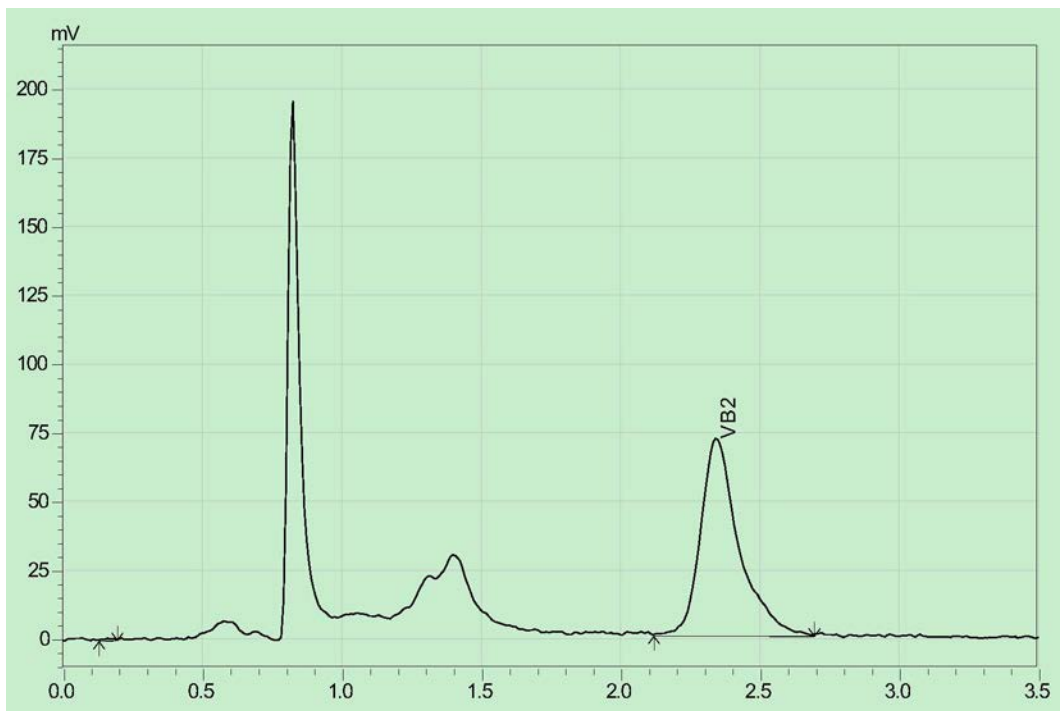


图3

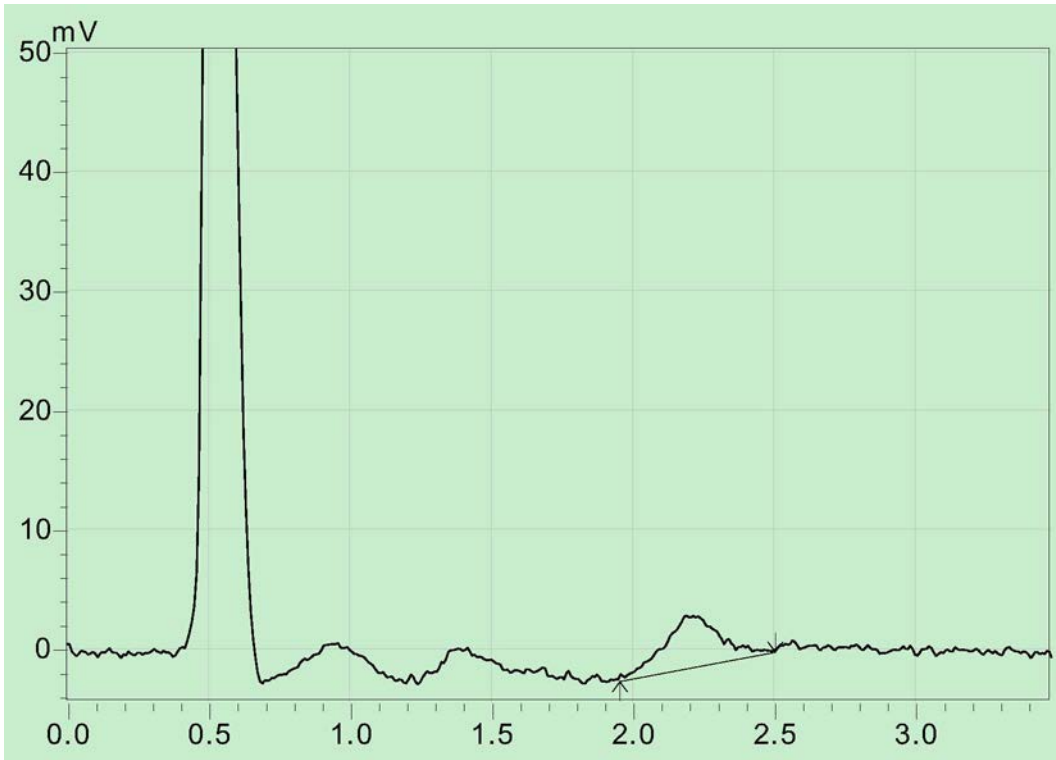


图4

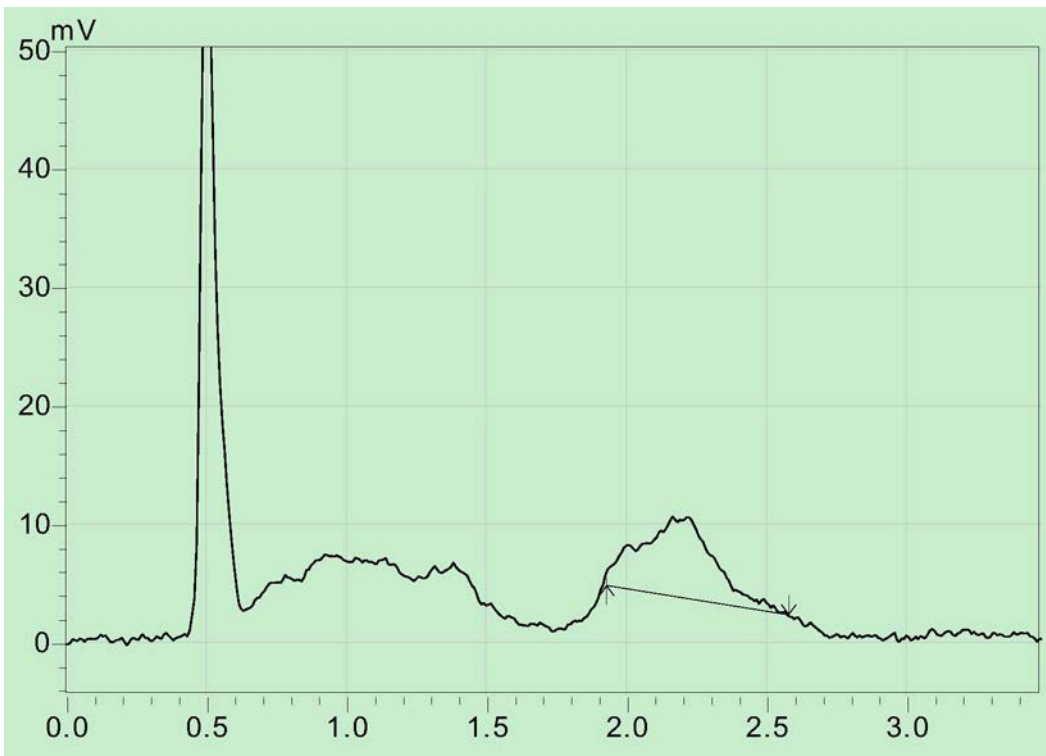


图5

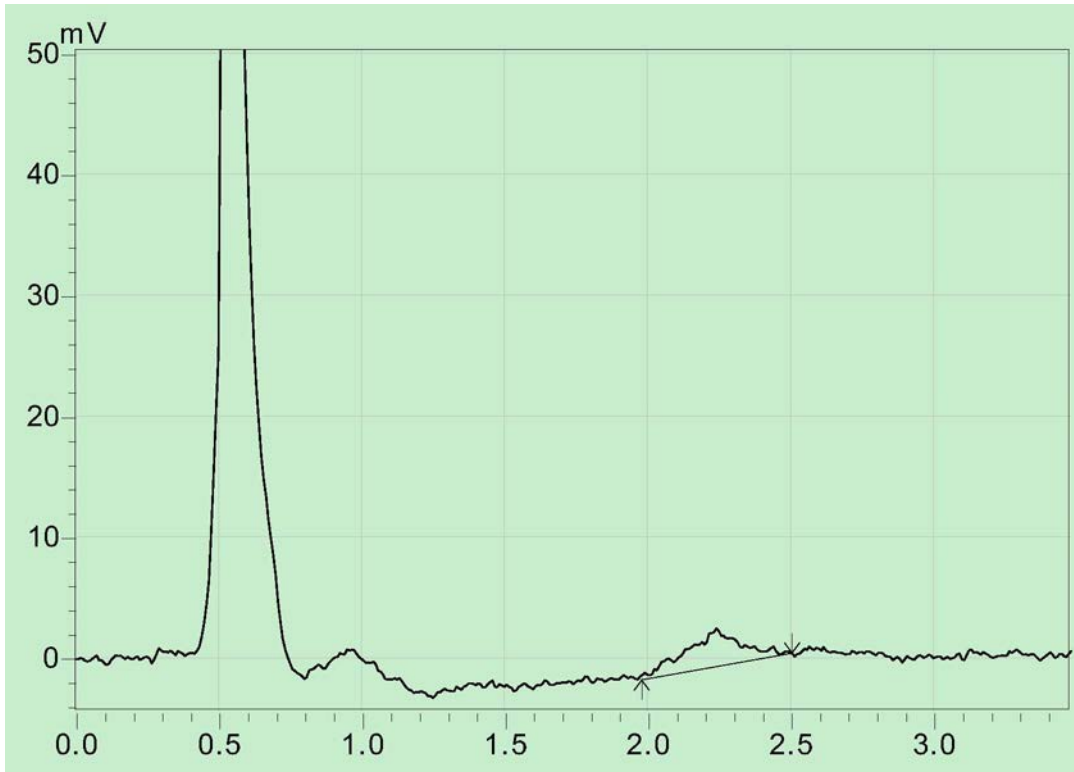


图6

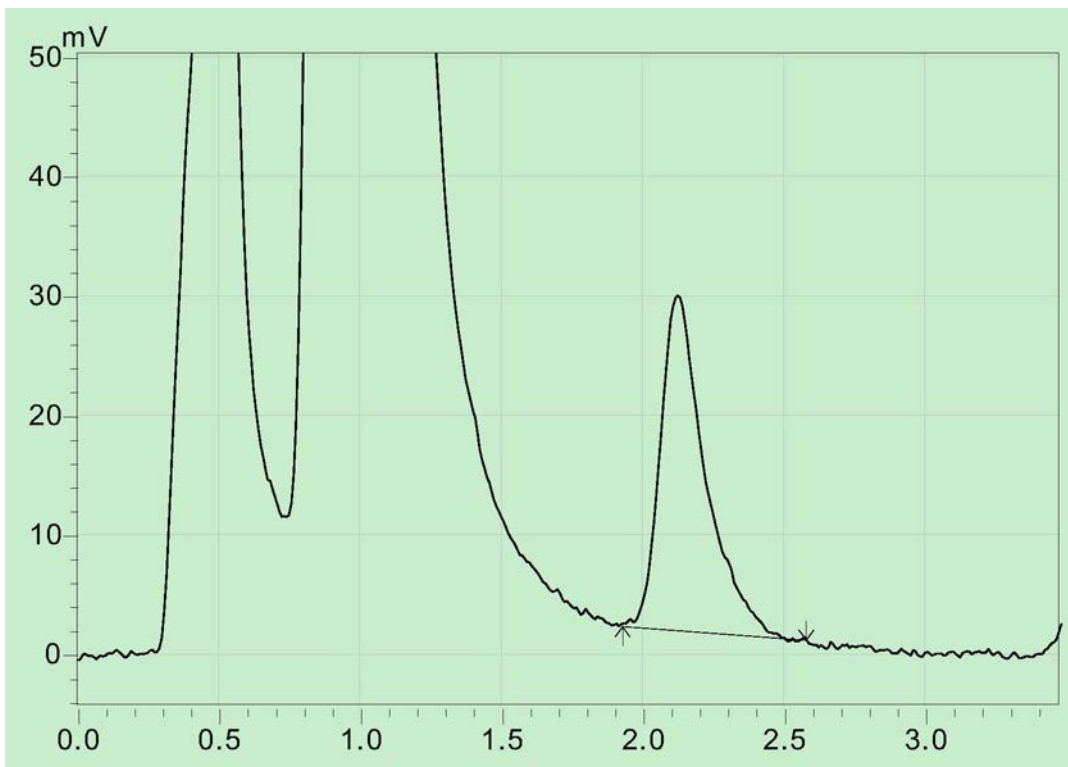


图7

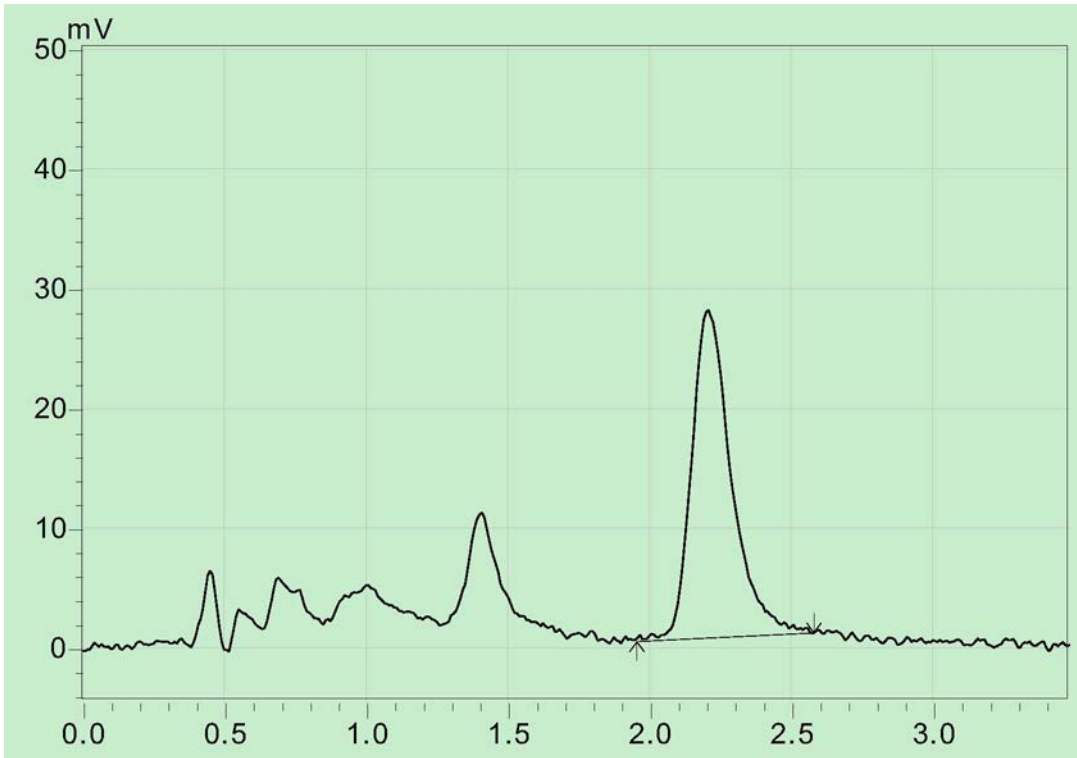


图8

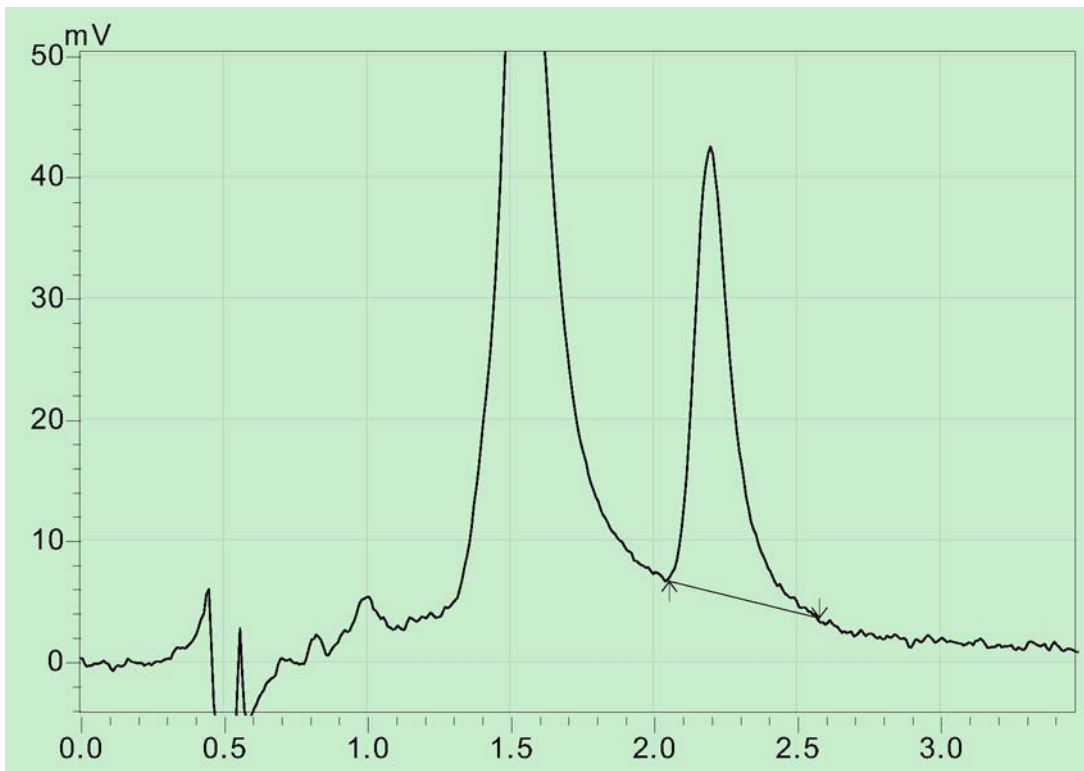


图9

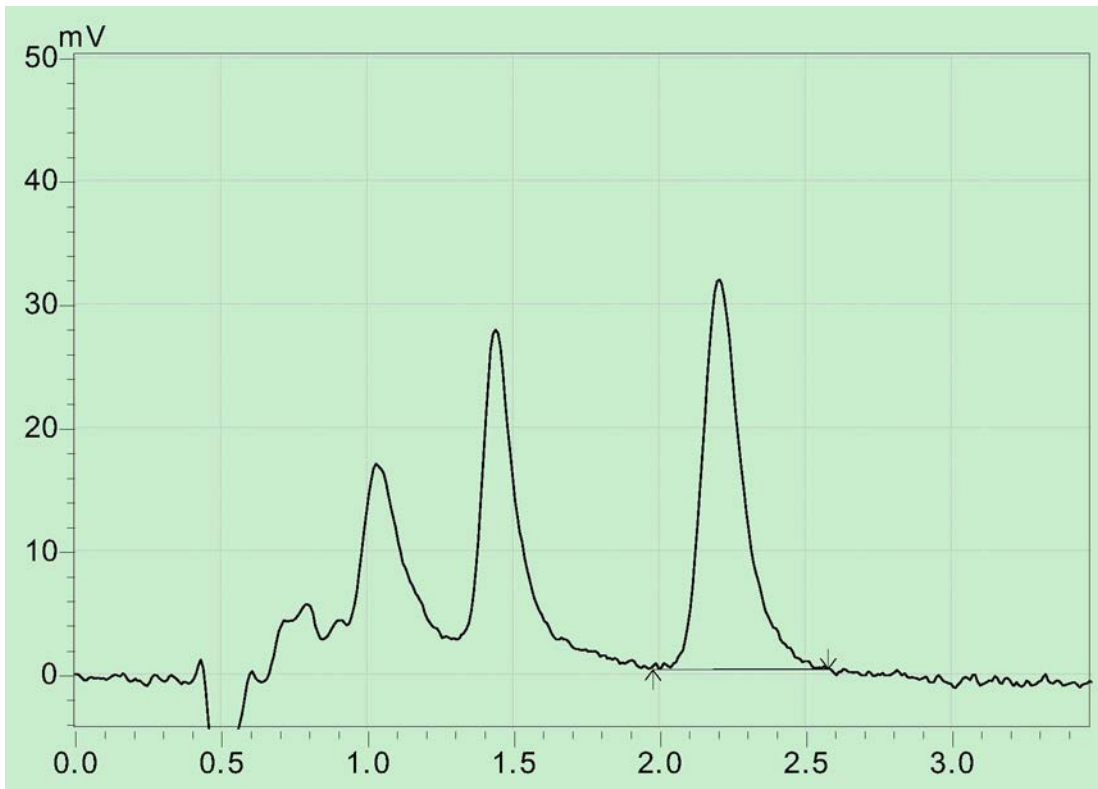


图10

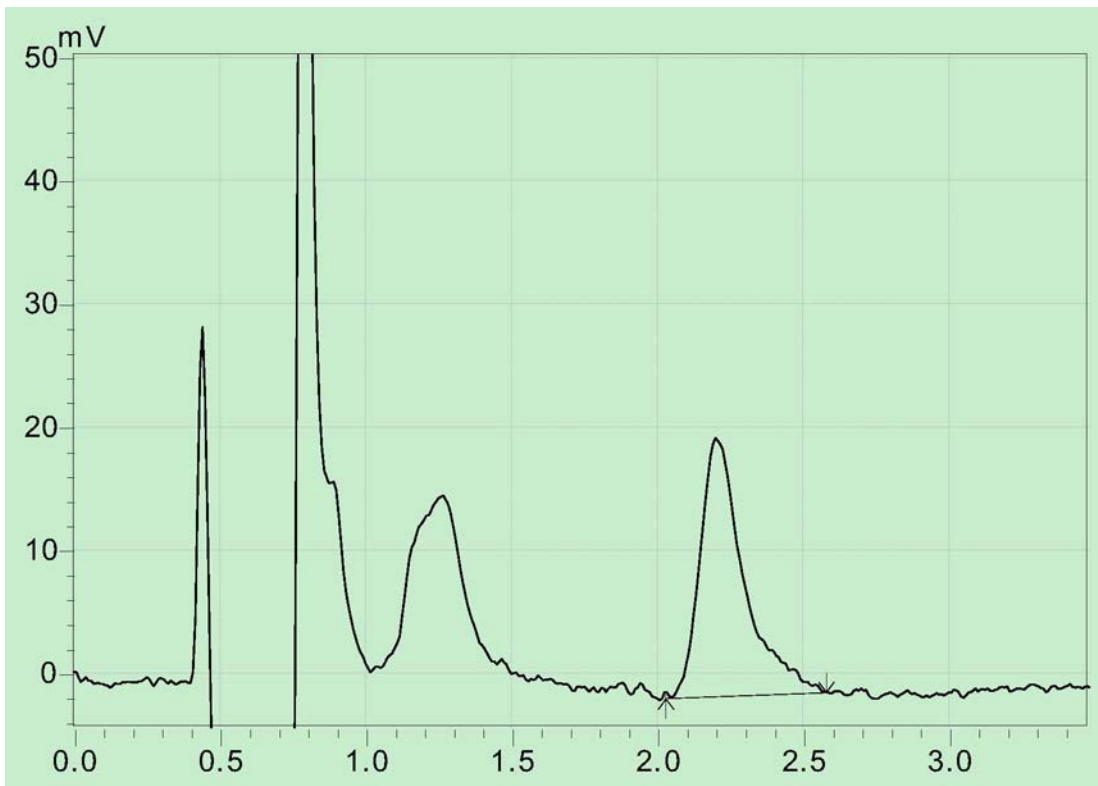


图11

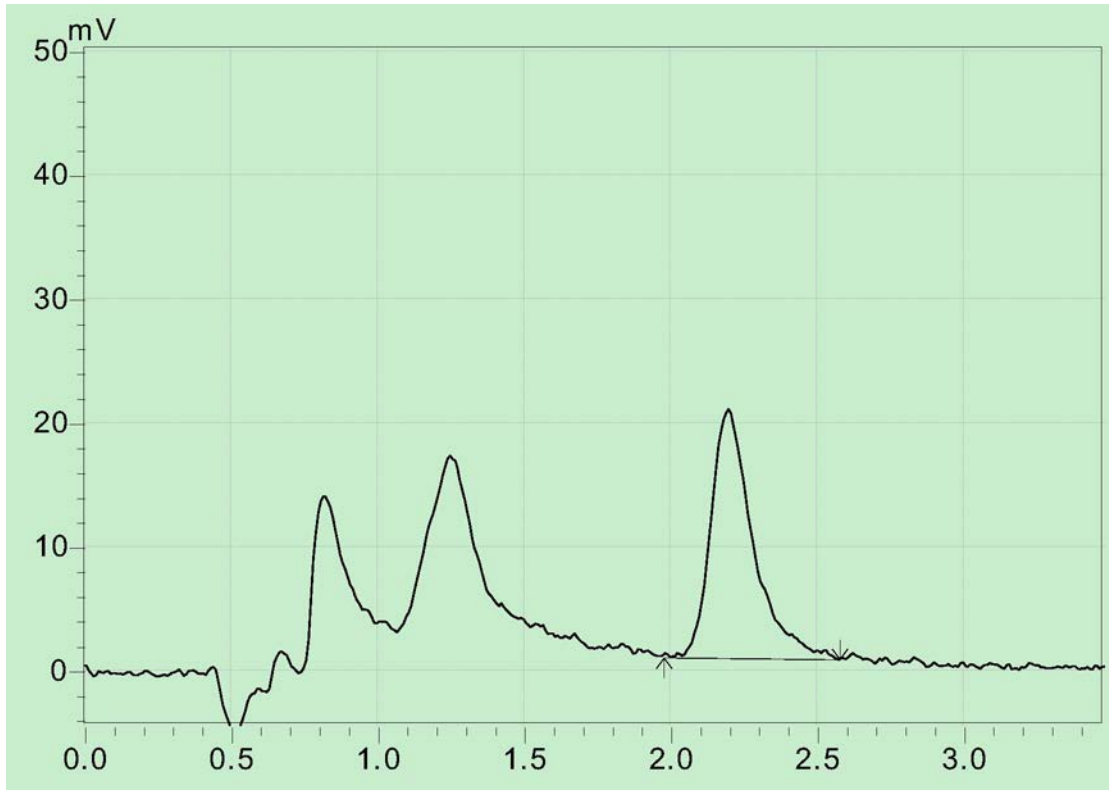


图12

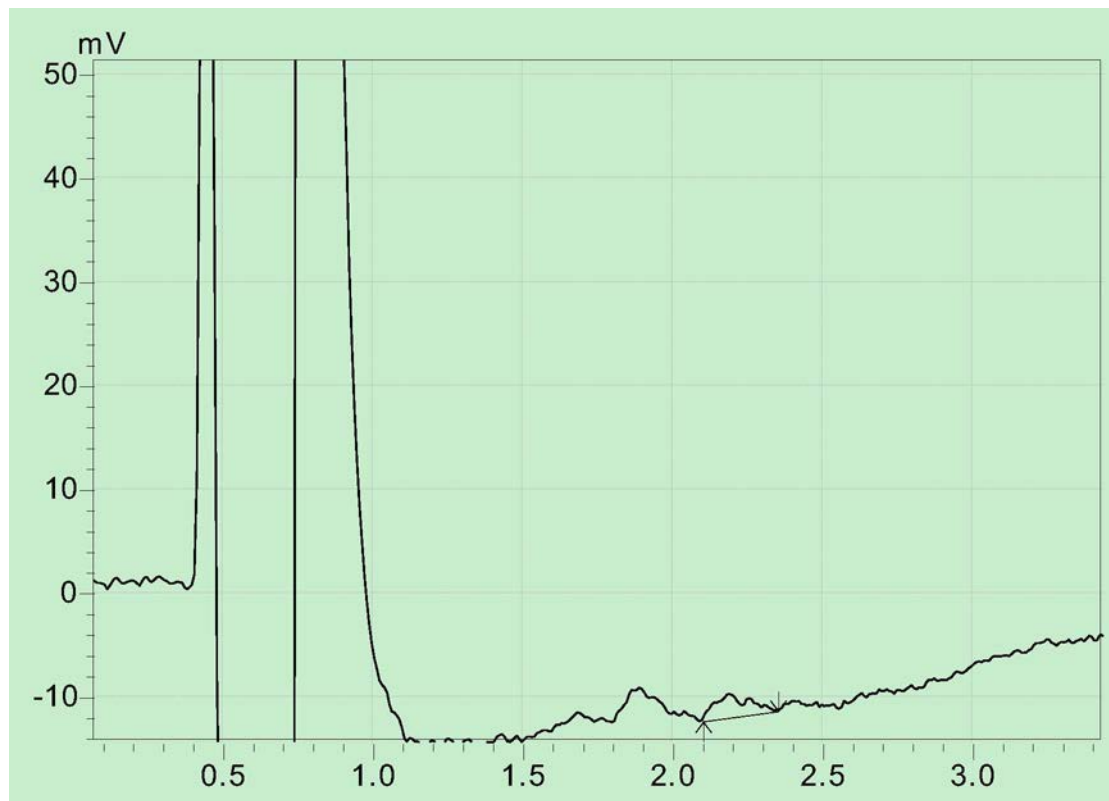


图13

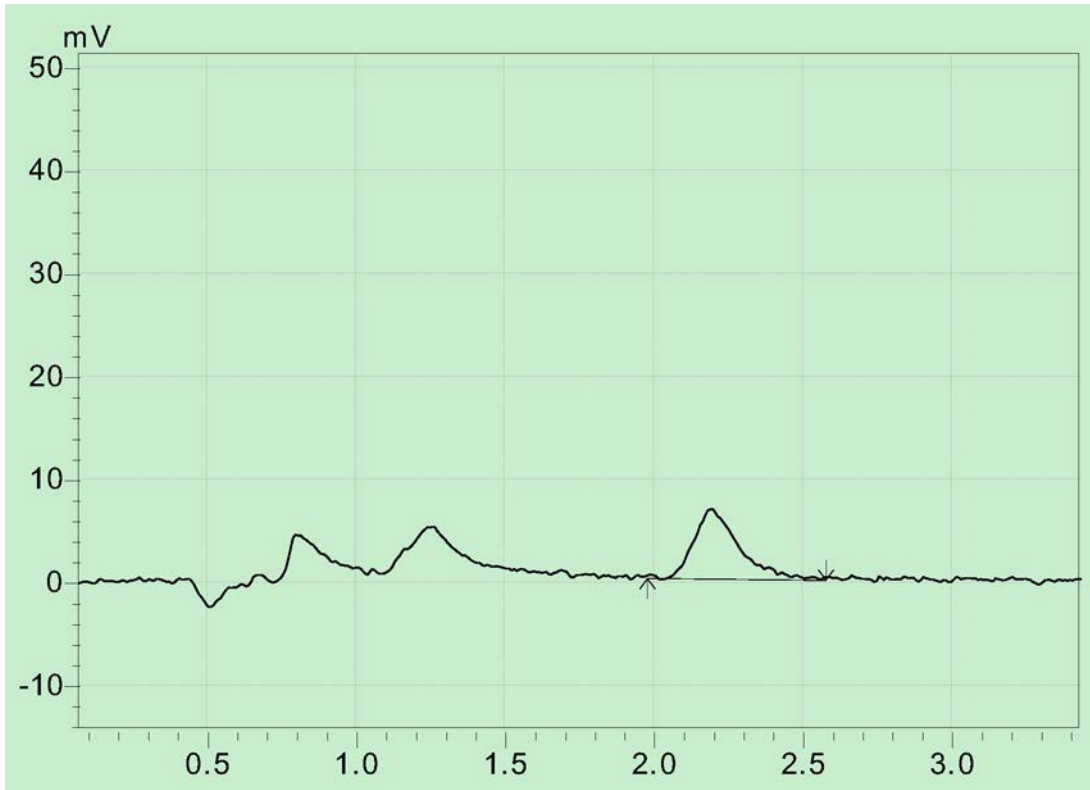


图14

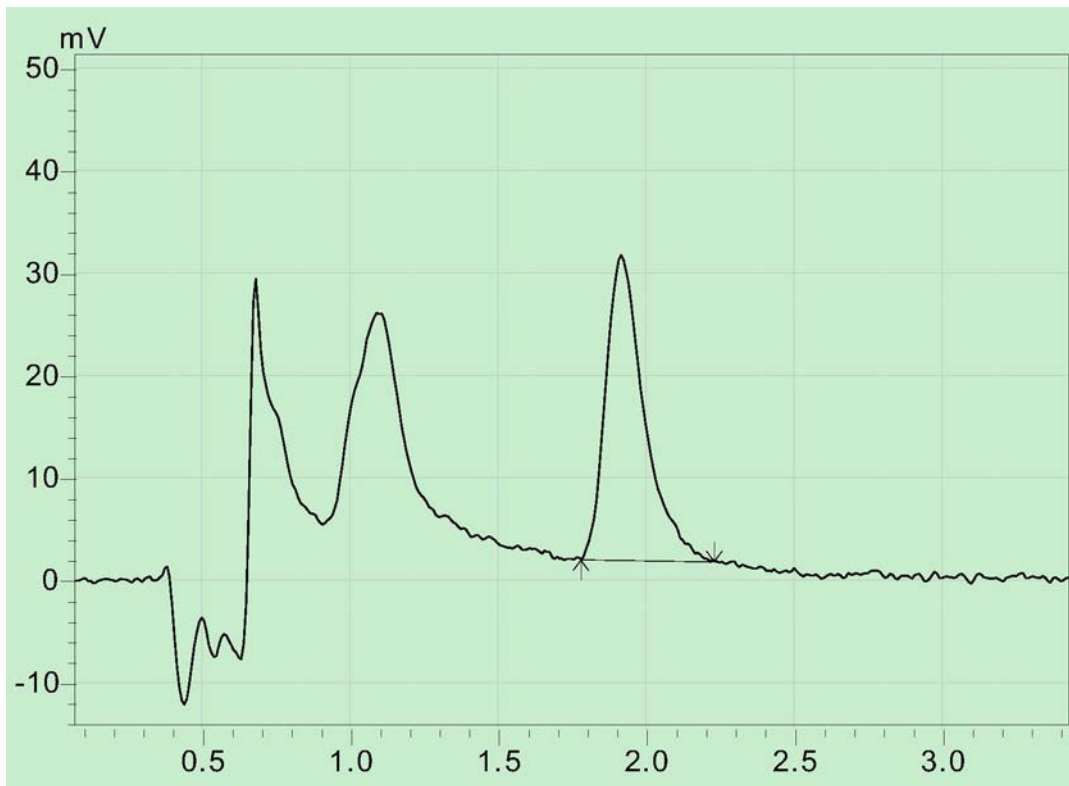


图15

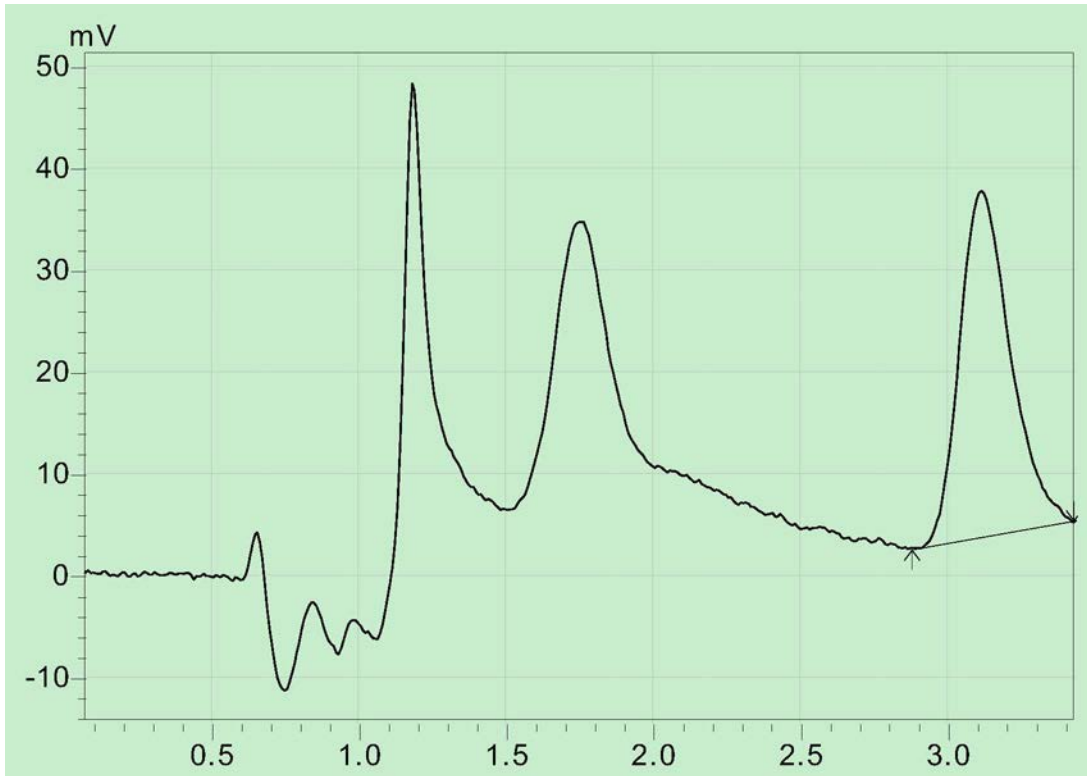


图16

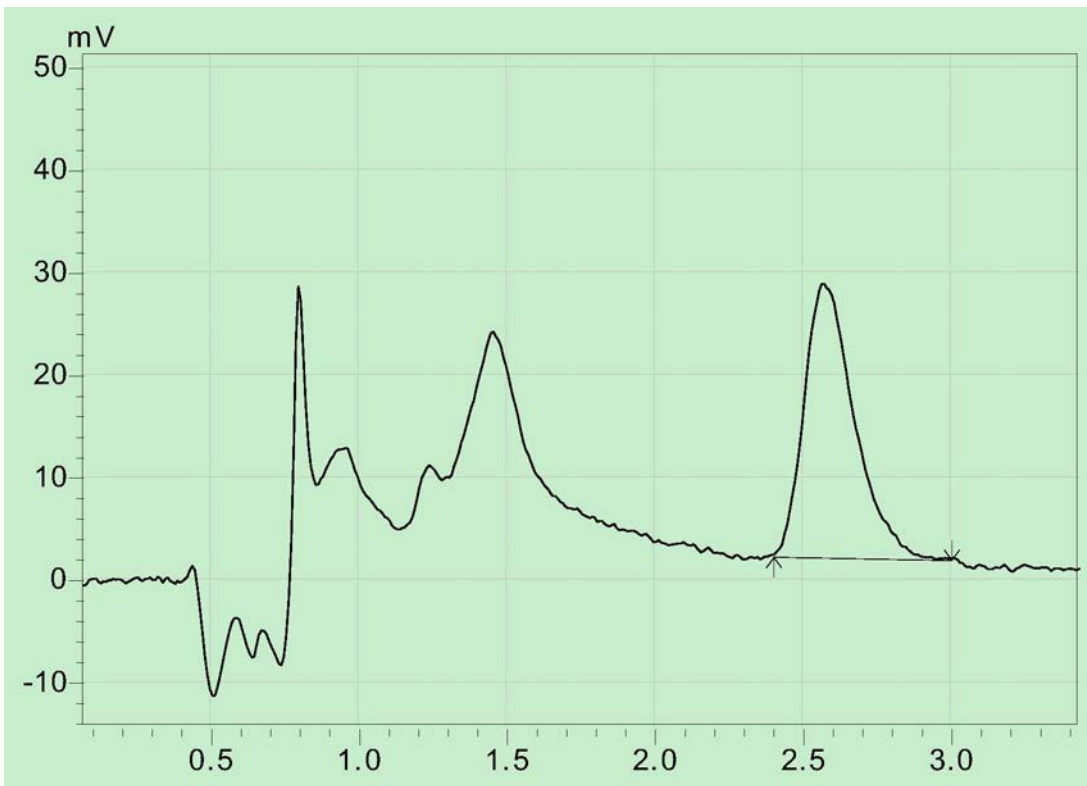


图17

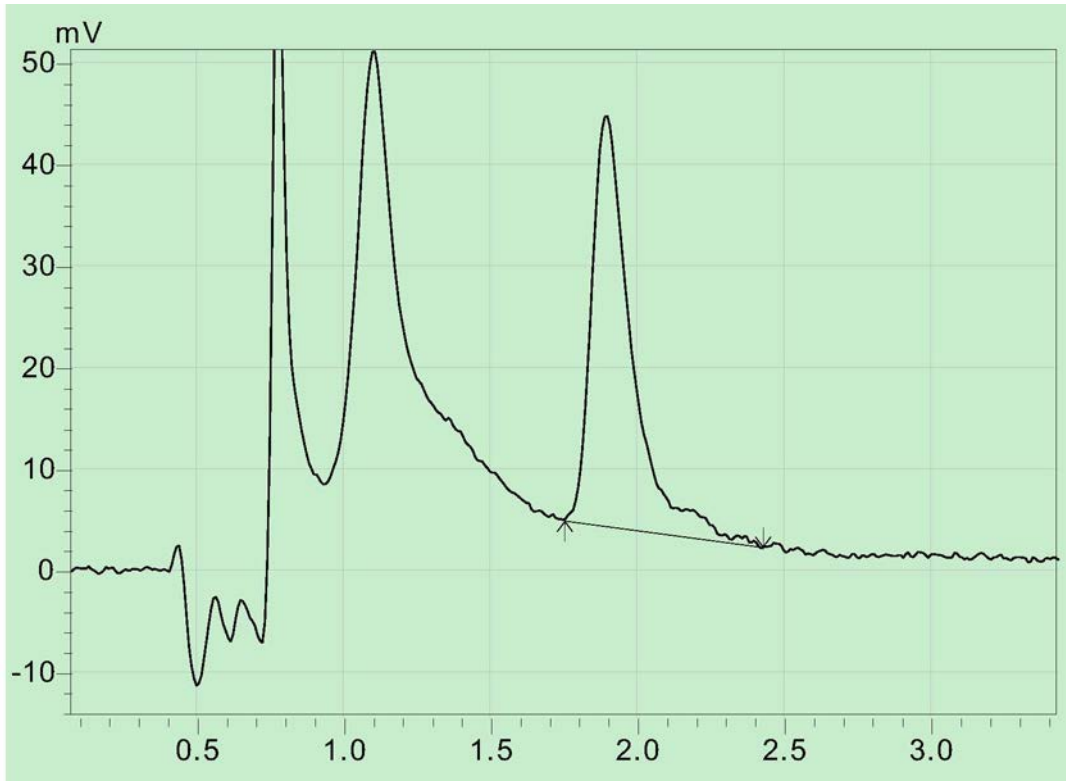


图18