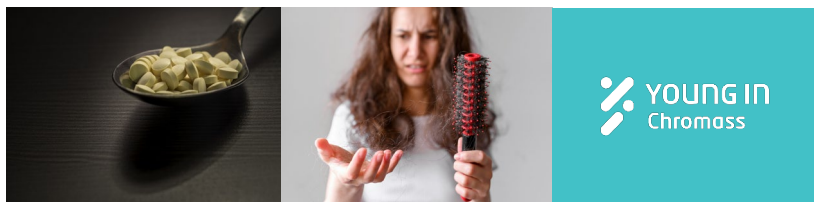


ChroZen切换阀高效液相色谱法测定生物素（维生素B7）

- HPLC 应用



描述

生物素（维生素B7）是一种水溶性B族复合维生素，是一种必需营养素，在糖异生、脂肪酸合成和氨基酸分解代谢等重要代谢途径中作为羧化酶的辅酶发挥作用。由于生物素在DNA合成中起着至关重要的作用，生物素的缺乏会导致婴儿和儿童生长迟缓，成年人脱发、皮肤问题和抑郁症。但是，缺乏生物素的情况很少见，因为肠道细菌产生的生物素超过了日常需求，而且许多类型的食物也含有生物素。

因为维生素是不稳定的化合物，暴露在氧气或紫外线下很容易降解。需要加快样品制备，并使用能够确保准确性和灵敏度的高效系统。皂化和液-液萃取（LLE）是测定维生素的常用样品制备方法。带切换阀系统的ChroZen HPLC采用聚焦柱浓缩目标化合物，并采用两级分离以提高分辨率。在这项研究中，参照食品成分痕量分析的标准方法，使用带有切换阀的ChroZenHPLC进行了痕量维生素B7（生物素）的测定。

仪器和软件

Item	Description	Part No.
Pump	ChroZen HPLC Quaternary Gradient Pump with Vacuum degasser 2 set	9421011020
Autosampler	ChroZen HPLC Autosampler	5421011020
Column Compartment	ChroZen HPLC Column Oven for Analytical scale	3421011020
Detector	ChroZen HPLC UV/Vis Detector with dual wavelength	7411011020
Install. Option	HPLC Performance Kit	1601011890
CDS	YL-Clarity software of Young In Chromass HPLC for single instrument control	5301011000
	Autosampler control of YL-Clarity	5301011040
Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4.6 mm x 150 mm, 5 μm) Agilent Eclipse Plus C18 (4.6 mm x 50 mm, 5 μm) Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18 (2.1 mm x 250 mm, 4 μm)	-
Switching Valve	6-port 2-position valve, SS/PEEK, 40MPa , 0.4, 10-32 for ChroZen HPLC	3421012020

试剂和标准品

- 乙腈, HPLC 级别
- 生物素, ≥99.0%
- 甲醇, HPLC级
- 磷酸, 85.0%
- PBS (磷酸盐缓冲盐水)
- 磷酸二氢钾, ≥98.0%
- 磷酸二氢钾, ≥99.0%
- 超纯水, 电阻率18.2 MΩ-cm



图1. ChroZen HPLC with 6-port valve

标准溶液的制备

- ① 向1000 mL容量瓶中加入100 mg生物素，然后用0.01M KH₂PO₄ (pH 4.8) 稀释至1000 mL标记。
- ② 用0.01M KH₂PO₄稀释①溶液，使各浓度用于校准曲线

样品溶液的制备



仪器条件

ChroZen HPLC system		
Mobile phase / Flow rate	Pump 1 – ACN : 10mM KH ₂ PO ₄ (0.1 % H ₃ PO ₄) = 5 : 95, 0.3 mL/min Pump 2 – ACN : 10mM KH ₂ PO ₄ (0.1 % H ₃ PO ₄) = 15 : 85, 0.2 mL/min	
Column	Pre-separation : Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4.6 mm x 150 mm, 5 μm) Focusing : Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm x 50 mm, 5 μm) Analytical : Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18 (2.1 mm x 250 mm, 4 μm)	
Temperature	40 °C	
Injection volume	200 μL	
Detection	UV/Vis detector 200 nm	
Valve program	Time (min)	Valve
	Initial	Position 2
	3.1	Position 1
	3.7	Position 2

试验方法概述

该方法需要配置HPLC、6端口切换阀、额外的泵和3种柱来测定痕量生物素（维生素B₇）水平。阀门位置有3个步骤，[图2]显示了如何确定切换阀门以分离生物素的正确时间。

< 阀门切换时间的确定 >

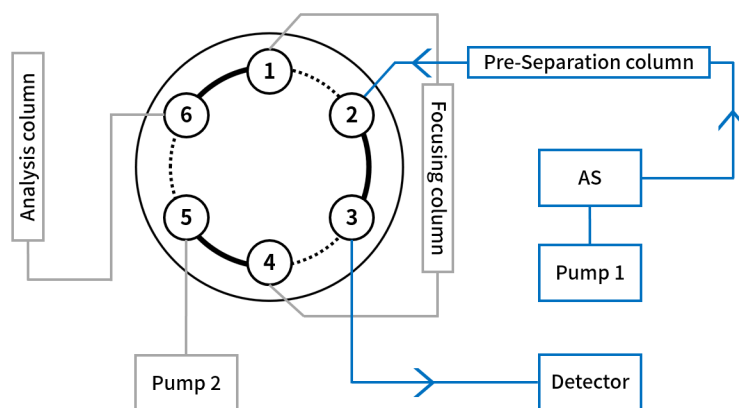


图 2. 阀门图——阀门切换时间的确定

样品从预分离柱（C8柱）流到检测器，确定生物素的保留时间，以估计阀门切换的正确时间。

<Step 1. 首次分离>

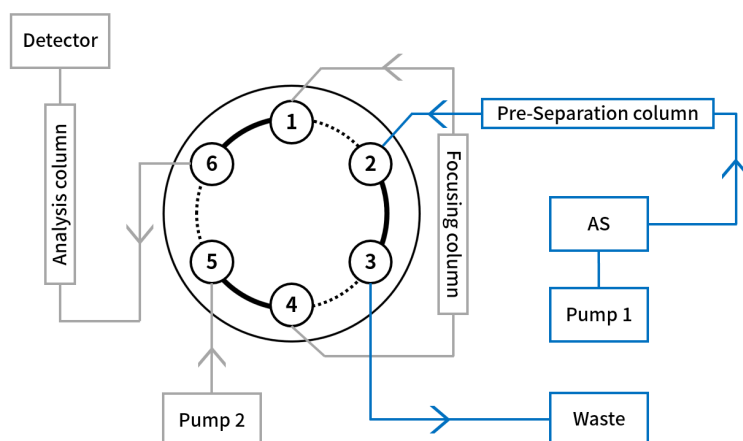


图3. 阀门图 – Step 1

样品由流动相从泵1运送到预分离柱，在生物素洗脱之前将其排入废物中，同时流动相以0.2 mL/min的速度从泵2流出。在此过程中，可以减少样品基质的干扰。

<Step 2. 浓度>

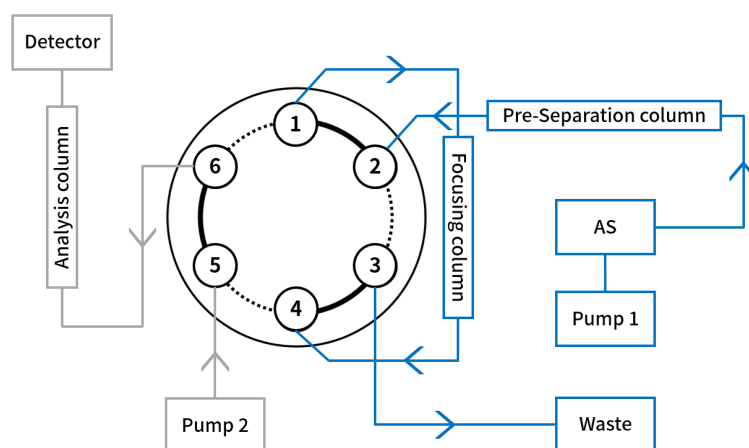


图 4. 阀门图 – Step 2

当生物素被洗脱时，阀门会切换流量，这样目标化合物就可以留在聚焦柱中进行浓缩。（阀门位置1）

<Step 3. 二次分离>

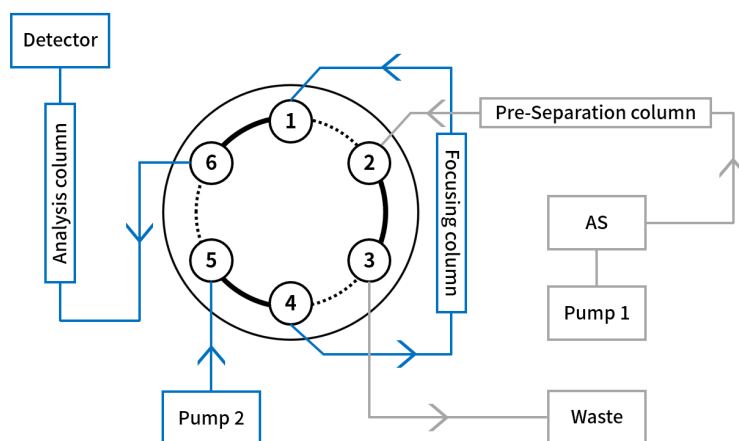


图5.阀门图 – Step 3

在生物素完全洗脱之前，阀门将位置切换回原位，使目标化合物留在聚焦柱中，流向分析柱，由检测器检测。分析柱的内径越小，灵敏度和纯化效果越好。（阀门位置2）

色谱图

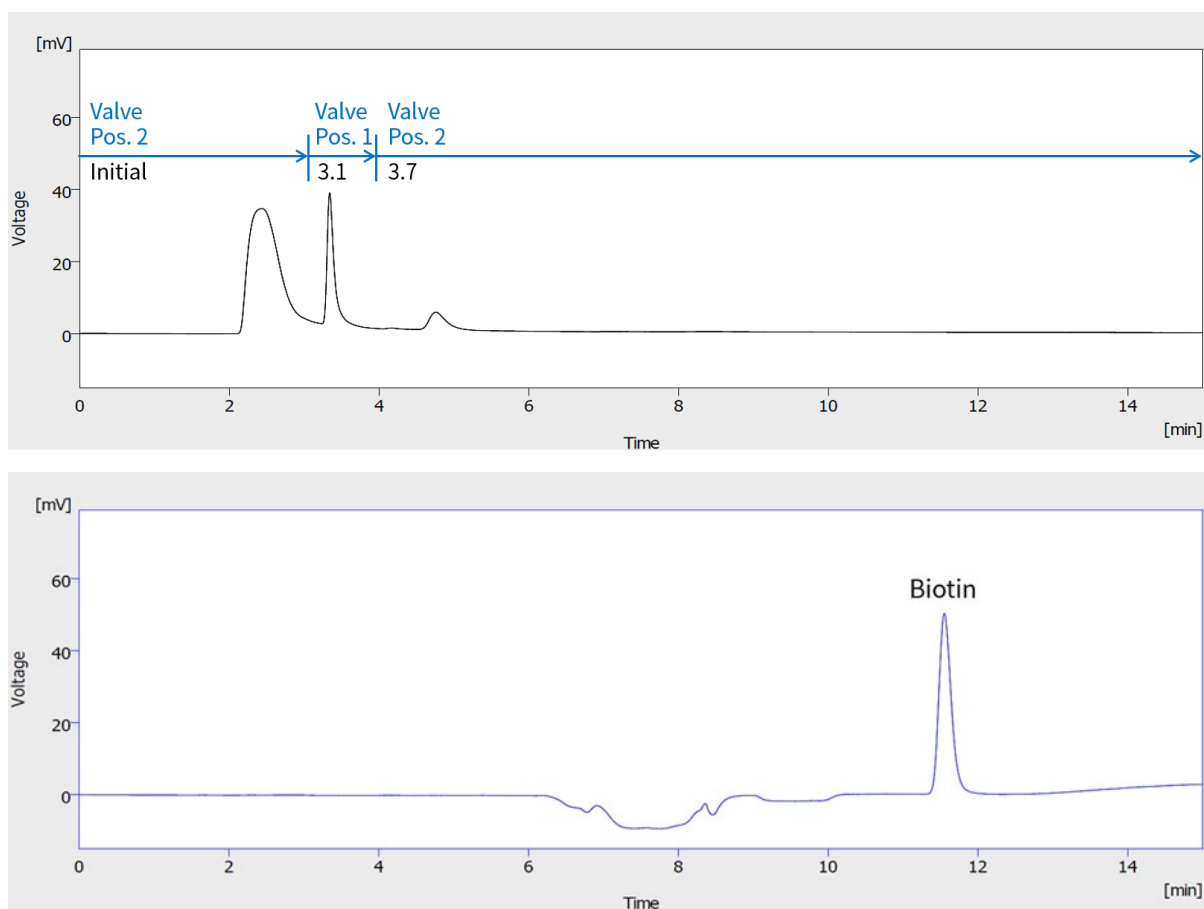


图 6. 配备多柱和切换阀系统的ChroZen HPLC生物素色谱图

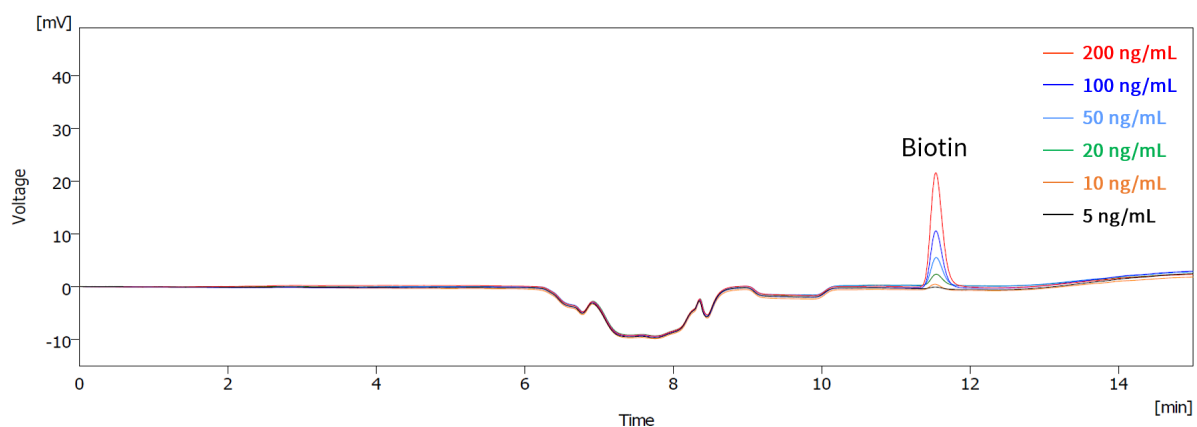


图7. 生物素标准色谱图的叠加

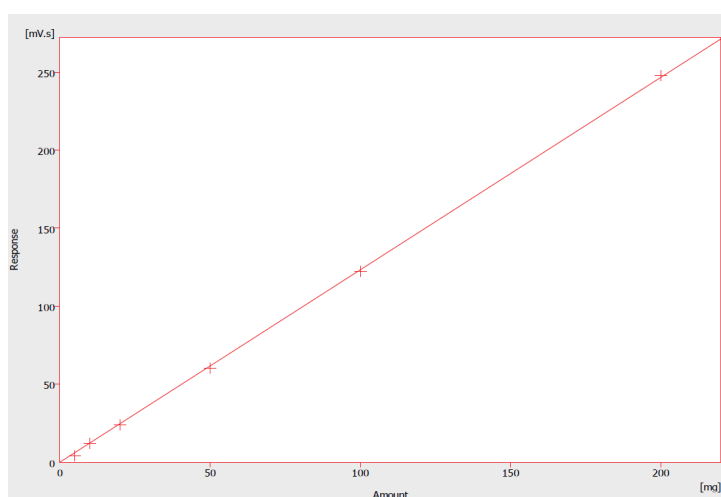


图8. 校准曲线的验证

计算

$$\text{Vitamin } B_7(\text{Biotin}) \text{ Content } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times \frac{(a \times V_2 \times b)}{S \times V_1} \times 100$$

C = Concentration of Vitamin B₇ in Sample (μg/mL)

a = Total Solution Volume (mL)

V_1 = Volume of Loaded Solution in Immunoaffinity Column (mL)

V_2 = Volume of Eluted Solution from Immunoaffinity Column (mL)

b = Dilution Ratio

S = Sample Amount (g)

结论

在这项研究中，生物素（维生素B₇）的测定是通过ChroZen HPLC进行的，参考了韩国食品成分痕量分析的标准方法。

在5~200 ppb范围内，R²值大于0.999，验证了数据的有效性。[图8]这确保了带有切换阀的

ChroZen HPLC是一种用于痕量生物素分析的有效系统。

参考

- Korean standard methods for the analysis of food ingredients at trace level (Biotin)
- Simultaneous Determination of Vitamin D3 and K1 in Infant Formula by HPLC with column-switching
(Korean journal of food science and technology, Vol. 37, No; 6, 1024-1027)
- New nutritional concepts of some vitamins and minerals
(Korean Journal of Pediatrics, Vol. 48, No. 12)
- Adverse Effects on the skin by the deficiency of vitamins and minerals
(Korean Journal of Aesthetics and cosmetology, Vol. 10, No. 4)



60, Anyangcheondong-ro, Dongan-gu,
Anyang-si, Gyeonggi-do, 14042, Korea

TEL: +82-31-428-8700

FAX: +82-31-428-8787

E-mail: export@youngincm.com

Homepage: www.youngincm.com