

胆钙化醇（维生素D3）的高效测定方法 通过带切换阀的ChroZen HPLC

- HPLC 应用



描述

维生素D是一种脂溶性维生素，主要有两种形式，即麦角钙化醇（D2）和胆钙化醇（D3）。维生素D3由皮肤中的7-脱氢胆固醇在阳光照射下转化而来，通过帮助肠道吸收钙，对强健骨骼和肌肉起着至关重要的作用。由于室内活动和防晒霜的使用增加导致阳光照射不足，维生素D缺乏症的考虑正在出现。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。

皂化和液-液萃取（LLE）是测定维生素的常用样品制备方法。由于样品制备过程持续时间长，加速了维生素的降解，样品中的基质干扰导致分辨率低，因此很难获得维生素的准确定量结果。因此，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。

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，使用带切换阀的ChroZen HPLC进行了痕量维生素D3（胆钙化醇）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	6421011020
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 for single instrument of YL HPLC	5301011000
	Autosampler control of YL-Clarity	5301011040
Column	Agilent ZORBAX Phenyl (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m) Agilent Eclipse Plus C18 (2.1 mm x 50 mm, 5 μ m) Agilent ZORBAX XDB C18 (2.1 mm x 150 mm, 3.5 μ m)	-
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
胆钙化醇, $\geq 98\%$
正己烷 HPLC级
甲醇 HPLC级
- 氢氧化钾, $\geq 85\%$
- 邻苯三酚, $\geq 98\%$
超纯水, 电阻率 $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

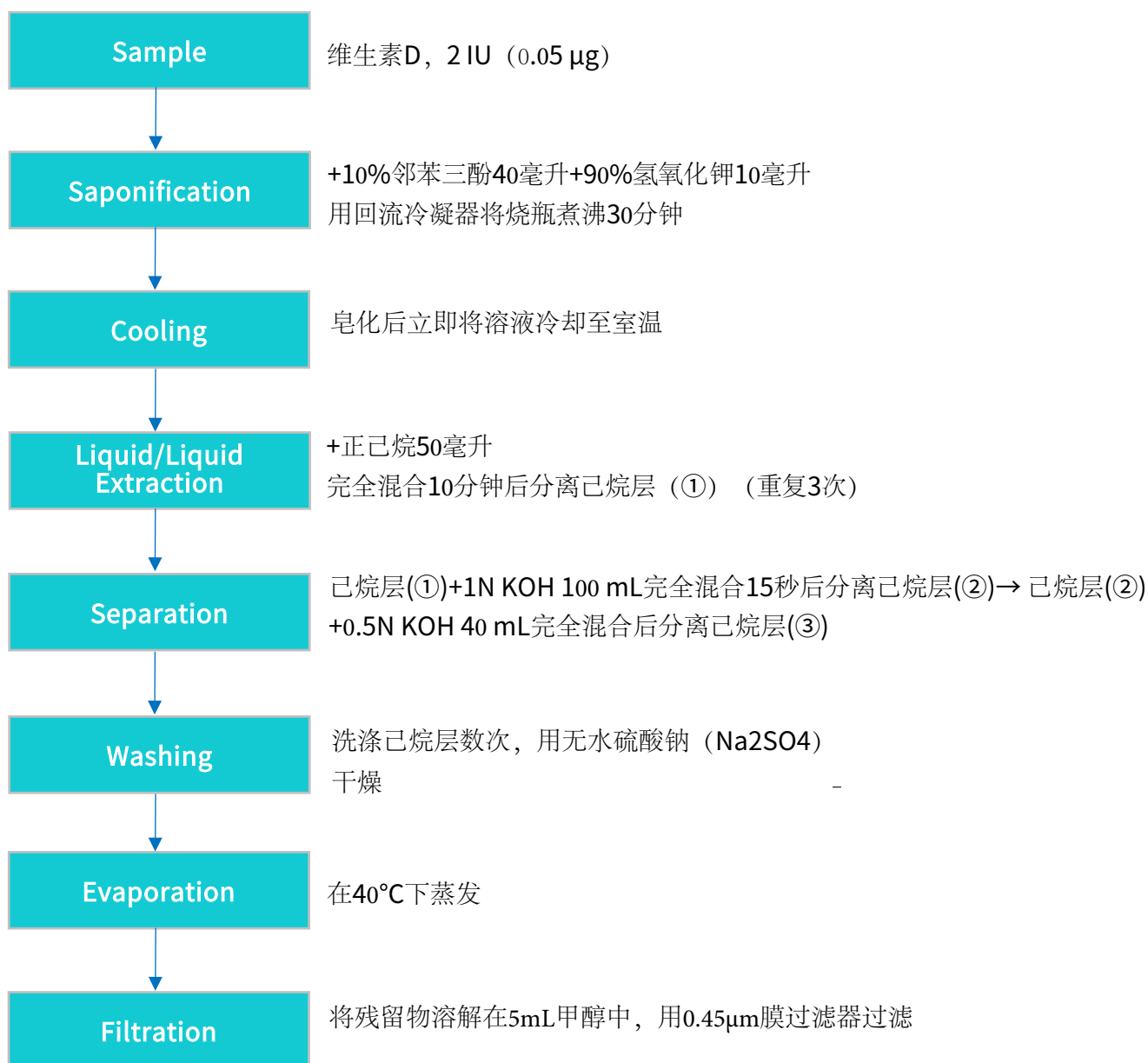


图1. ChroZen HPLC with 6-port valve

Preparation of Standard Solution

- ① Add 100 mg of Cholecalciferol to 100 mL volumetric flask, then dilute to the 100 mL mark with methanol (1,000 µg/mL)
- ② Dilute ① solution with the mobile phase to make each concentration for calibration curve.

样品溶液的制备



仪器条件

ChroZen HPLC system		
Mobile phase / Flow rate	Pump 1 – ACN : Water = 85 : 15, 0.5 mL/min Pump 2 – ACN 100%, 0.3 mL/min	
Column	Pre-separation : Agilent ZORBAX Phenyl (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) Focusing : Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm x 50 mm, 5 µm) Analytical : Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm)	
Temperature	40°C	
Injection volume	200 µL	
Detection	UV/Vis detector 265 nm	
Valve program	Time (min)	Valve
	Initial	Position 2
	6.1	Position 1
	8.0	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种柱来测定痕量胆钙化醇（维生素D3）瓣膜位置有3个步骤，[图2]是确定切换瓣膜位置以分离胆钙化醇的正确时间。

< 阀门切换时间的确定 >

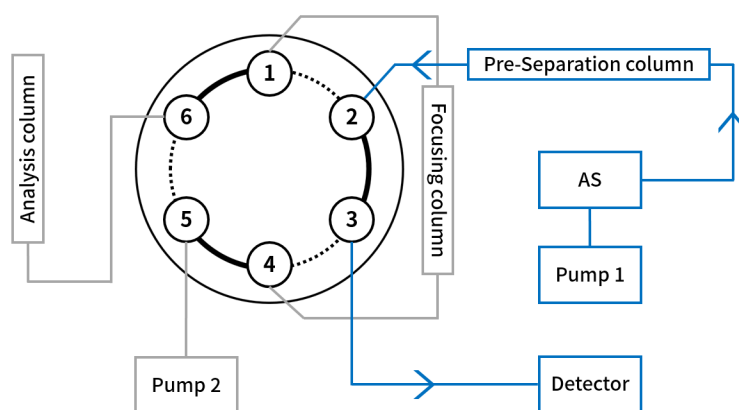


图2. 阀门图——阀门切换时间的确定

样品从预分离柱（苯基柱）流到检测器，胆钙化醇的保留时间将在阀门切换的正确时间确定。

<Step 1. 首次分离

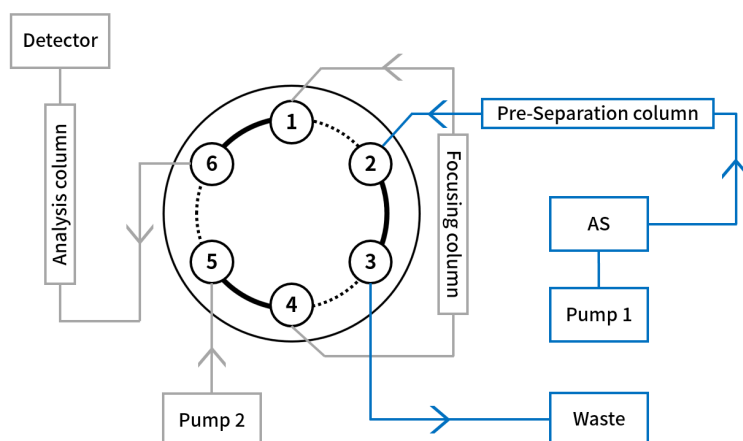


图 3. 阀动图 – Step 1

样品由流动相从泵1运送到预分离柱，在胆钙化醇洗脱之前将其排入废物中，同时流动相以0.3 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>

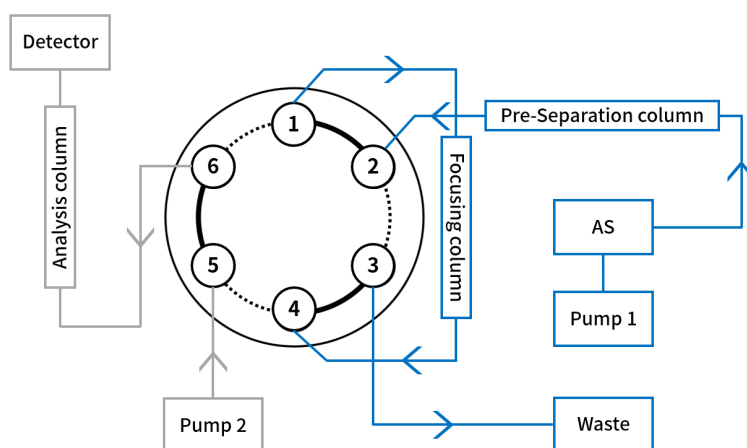


图4. 阀动图 – Step 2

当胆钙化醇被洗脱时，阀门会切换流量，使其可以留在聚焦柱中进行浓缩。（阀门位置1）

<Step 3. 二次分离>

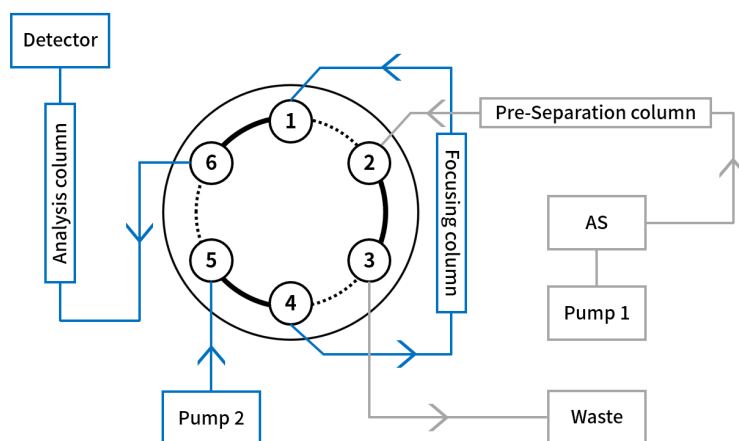


图5. 阀动图 – Step 3

在胆钙化醇完全洗脱之前，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

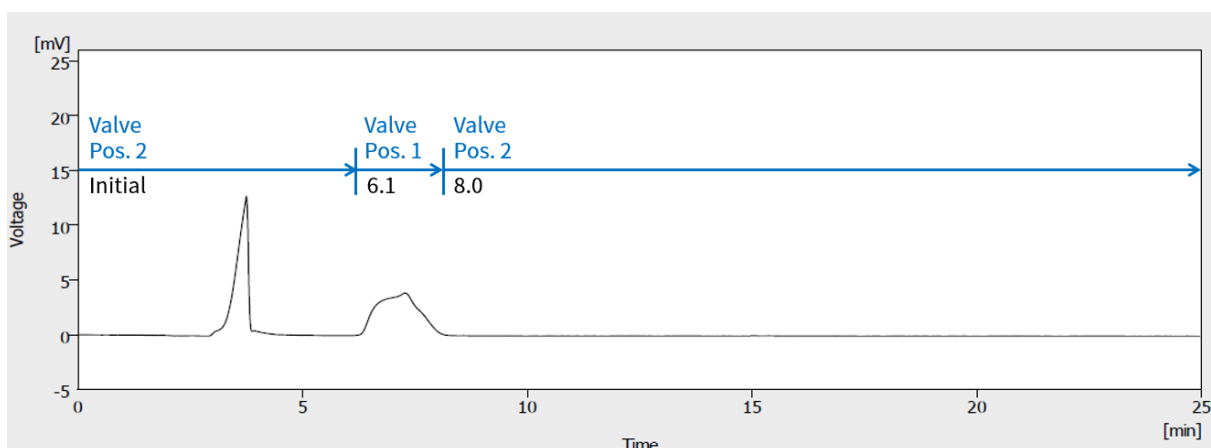


图 6. 阀门切换时间的确定

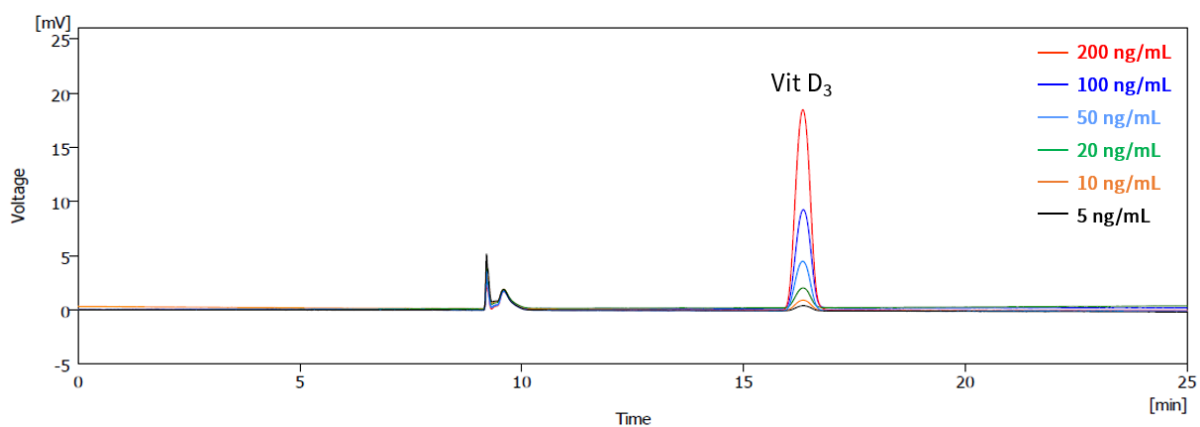
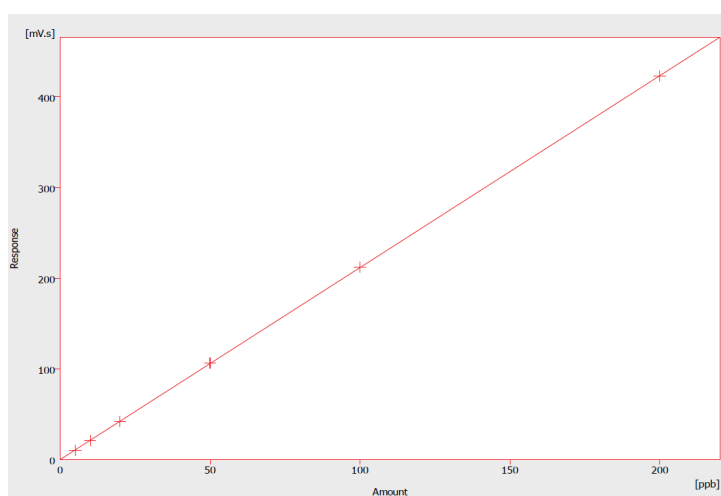


图7. 通过配备多个柱和切换阀的ChroZen HPLC叠加胆钙化醇标准色谱图



STD	Standard Concentration (ng/mL)	Area (mV.s)
1	5	10.1540
2	10	21.1994
3	20	41.6523
4	50	106.2039
5	100	212.3689
6	200	422.9139
Linearity		0.999995

图8. 校准曲线的验证

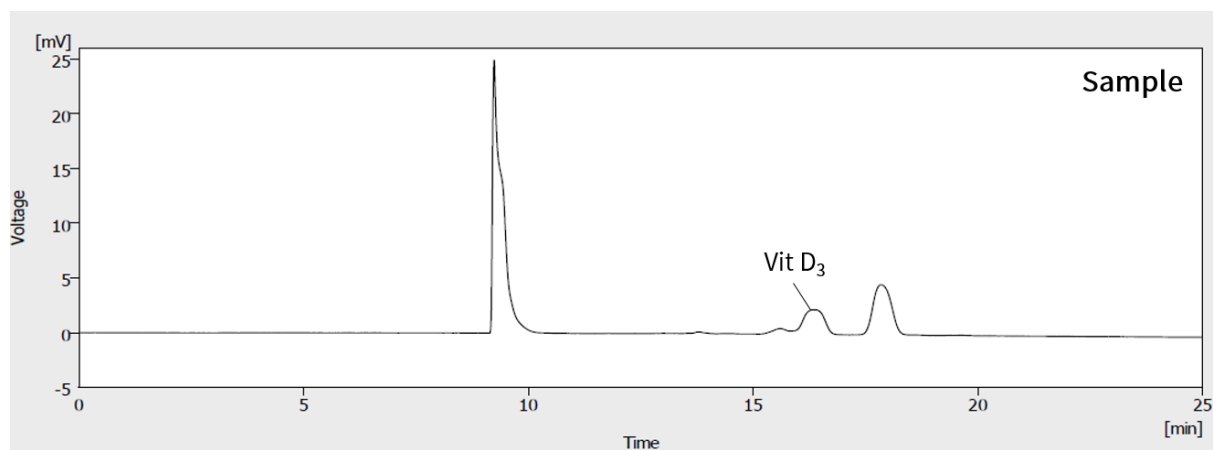


图 9. 配备多个柱和切换阀的ChroZen HPLC的胆钙化醇样品色谱图

计算

$$\text{Vitamin } D_3 (\text{Cholecalciferol}) \text{ Content } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times \frac{(a \times b)}{S} \times 100$$

C = Concentration of Vitamin D₃ in Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

a = Total Solution Volume (mL)

b = Dilution Ratio

S = Sample Amount (g)

*Vitamin D $1 \mu\text{g} = 40 \text{ IU}$

$$\text{Ex. } 0.035175 \times \frac{(5 \times 100)}{1 \text{ g}} \times 100 = 1,758.75 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

结论

在这项研究中，胆钙化醇（维生素D3）的测定是通过ChroZen HPLC进行的，该HPLC参考了韩国食品成分痕量分析的标准方法，样品是一种市售的多种维生素。[图9]

在5~200 ppb范围内，R2值大于0.999，验证了数据的有效性。[图8]这确保了带切换阀的ChroZen HPLC是一种用于痕量胆钙化醇分析的有效系统。

参考

- Korean standard methods for the analysis of food ingredients at trace level (Vitamin D)
- 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)



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