

# LCMS-8050 CL 测定血清中的维生素 K1

## LCMSMS-390

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用检测血清中 VK1 的检测方法。血清样品使用试剂除蛋白后，萃取离心，浓缩复溶移取上清液，进样分析。采用 APCI 离子源模式，MRM 模式采集数据，内标法定量，用超高效液相色谱 LC-30A CL 在 7.0 min 内完成分析，三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 进行定量分析。结果显示，VK1 在 0.1~12.5 ng/mL 内线性良好；低、中、高三个浓度水平的加标血清样品进行了加标回收率实验，其回收率在 85% ~ 113% 之间，精密度实验结果良好。该方法可为血清中维生素 K1 的临床快速 / 准确定量分析提供参考。

**关键词：** 维生素 K1 血清 液相色谱 - 三重四极杆质谱 医用质谱仪

维生素 K1，又名叶绿醌，在食物、人体中广泛存在。维生素 K1 是肝脏合成凝血因子 II、VII、IX、X 所必需的物质，能促进血液凝固；当其缺乏时可引起这些凝血因子合成障碍或异常，临床可见出血倾向，凝血时间延长。目前，维生素 K1 的血药浓度测定方法有 HPLC 荧光检测法、HPLC-UV 法、GC-MS 法和 HPLC-APCI/MS 法。这些方法的操作过程繁琐，成本较高，不利于大量生物样品的分析。国外权威医学机构 Mayo 报道人体中正常维生素 K1 的含量大约为 0.1 ~ 2.2 ng/mL，随食物及时间的不同，其浓度的波动范围没

有显著变化。本文建立了灵敏度较高，且满足临床需求的人血清中维生素 K1 的 HPLC-APCI/MS/MS 测定法，经方法学验证定量限浓度为 0.1 ng/mL，线性范围 0.1~12.5 ng/mL，可应用于血清中维生素 K1 的定性定量研究。

本文利用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用对人血清中维生素 K1 进行定性定量分析。有助于高通量、更简单、更安全、更准确地实现临床维生素 K1 的检测。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL × 2 (输液泵)，DGU-20A5R CL (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-30A CL (柱温箱)，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件：

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.5 mL/min

色谱柱：BEH C18 2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.7 μm

柱温：40°C

进样体积：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

表 1 梯度洗脱条件

时间	单元	处理命令	值
0.00	泵	B.Conc	85
3.50	泵	B.Conc	90
4.00	泵	B.Conc	100
7.00	泵	B.Conc	100
7.10	泵	B.Conc	85
11.00	控制器	Stop	

质谱条件：

离子源：APCI

接口电压：3.0 KV

雾化气：3.0 L/min

干燥气流量：5.0 L/min

接口温度：300°C

DL 管温度：150°C

加热块温度：250°C

扫描模式：MRM 模式，见表 2

表 2 MRM 参数

化合物	CAS No.	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
维生素 K1	84-80-0	Phylloquinone	451.35	187.15*	-14	-27	-19
			451.35	185.20	-14	-22	-19
D7- 维生素 K1	1233937-39-7	D7- Phylloquinone	458.30	194.10	-20	-23	-18

\* 定量离子对

1.3 标准品、及样品制备

标准溶液配制：维生素 K1 标准品称取适量乙醇溶剂配制 1.0 mg/mL 的单标准贮备液，用 30% 甲醇 - 水溶液逐步稀释成 0.1、0.2、0.5、1.25、2.5、5 和 12.5 ng/mL 系列浓度的标准工作液。

样品前处理方法：取 200  $\mu$ L 标准溶液或血清加入 500  $\mu$ L 含内标 (2 ng/mL) 蛋白沉淀剂 (乙腈 - 甲醇 =9:1)，振荡均匀 10 min 后加入 800  $\mu$ L 正己烷振荡 15 min，10000 rpm 离心 3 min，取 750  $\mu$ L 上清液吹干后用 100  $\mu$ L 甲醇 - 水 -0.1% 甲酸 (85:15) 的混合溶剂复溶，振荡均匀 10 min 后，10000 rpm 离心 3 min，转瓶进样 20  $\mu$ L。

■ 结果讨论

2.1 空白及标准品色谱图

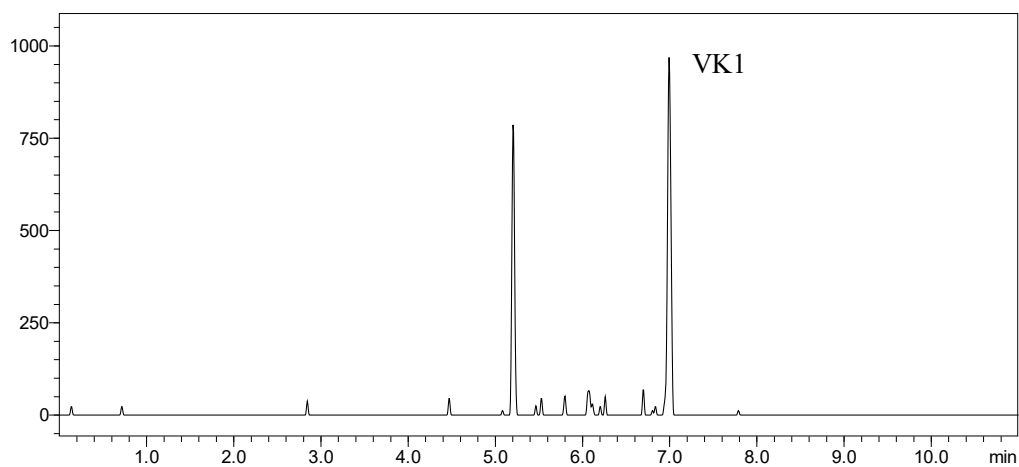


图 1 标准品 Level 1 浓度色谱图

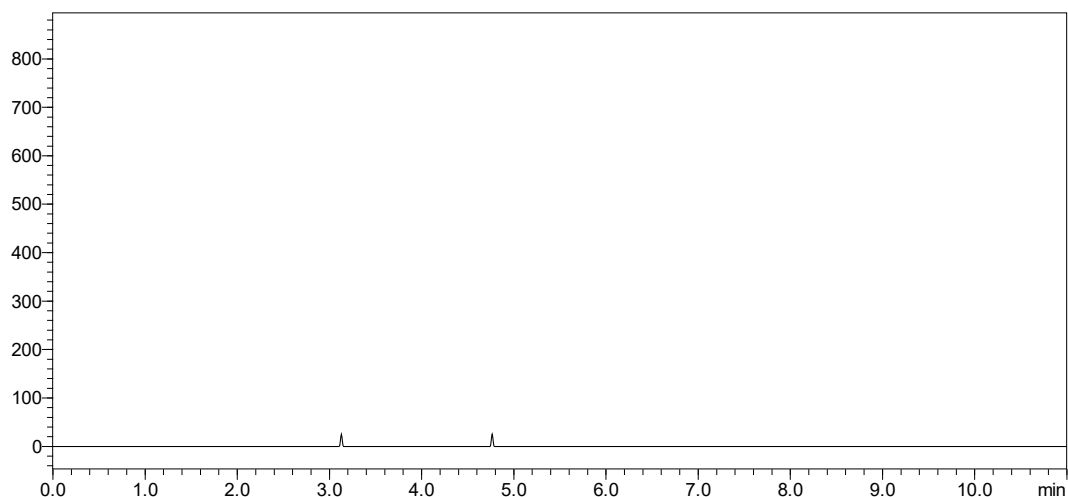


图 2 空白基质色谱图

## 2.2 基质效应验证

使用配制标准曲线的基质（30% 甲醇 - 水）溶解高、中、低三个不同浓度水平的标准溶液，分别将标准溶液和基质样本按 1: 1 比例进行混合得混合样本，将混合样本平行处理 3 个样，上机检测；混合样本的响应值（待分析物 / 内标）与病人样本和标准溶液响应均值的差异应小于 20%，则说明无相对基质效应。其中理论浓度为进行 1:1 混合后混合样本的理论值，应为基础浓度均值的一半。验证结果如表 3 所示。

表 3 基质效应

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均值 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
4.38			2.16	98.9
4.28	4.35	2.18	2.13	97.8
4.40			2.27	104.1
7.35			3.47	91.4
7.07	7.57	3.79	3.65	96.4
8.31			3.33	88.0
9.65			4.76	100.2
9.47	9.50	4.75	4.29	90.4
9.38			4.98	104.8

## 2.3 线性范围

对标准品按 1.2 中的分析条件进行了 6 个批次的分析，内标法制作校准曲线。表 4，表 5 显示，该方法线性范围宽，最低点信噪比  $S/N > 10$ ， $RSD = 2.85\%$  小于 20%，标准曲线相关系数均大于 0.995，因此方法定量限为 0.1 ng/mL，线性范围为 0.1~12.5 ng/mL。

表 4 线性范围验证

批次	级别	S/N	标准浓度 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数
1	1	45	0.1	107.9	0.995
	2	79	0.2	85.4	
	3	278	0.5	92.7w	
	4	3,607	1.25	109.1	
	5	2,095	2.5	102.8	
	6	3,624	5	102.3	
	7	15,201	12.5	99.9	
2	1	146	0.1	100.7	0.998
	2	243	0.2	95.4	
	3	350	0.5	106.6	
	4	1,163	1.25	104.6	
	5	1,605	2.5	98.5	
	6	6,072	5	100.5	
	7	7,564	12.5	93.6	
3	1	79	0.1	103.9	0.995
	2	96	0.2	88	
	3	598	0.5	113.1	
	4	3,397	1.25	91.6	
	5	2,130	2.5	99.8	
	6	6,058	5	104.7	
	7	7,564	12.5	98.8	
4	1	15	0.1	102.4	0.997
	2	51	0.2	90.7	
	3	72	0.5	88.2	
	4	241	1.25	96.3	
	5	635	2.5	101.5	
	6	803	5	105.8	
	7	3,062	12.5	105.7	
5	1	13	0.1	107.2	0.995
	2	53	0.2	90.1	
	3	200	0.5	86	
	4	373	1.25	103.8	
	5	1,095	2.5	102.2	
	6	2,822	5	103.4	
	7	3692	12.5	107.3	

	1	60	0.1	103.1	
	2	137	0.2	89.8	
	3	109	0.5	113.5	
6	4	1,803	1.25	92	0.997
	5	2,340	2.5	100.3	
	6	4,428	5	95.1	
	7	8,771	12.5	106.3	

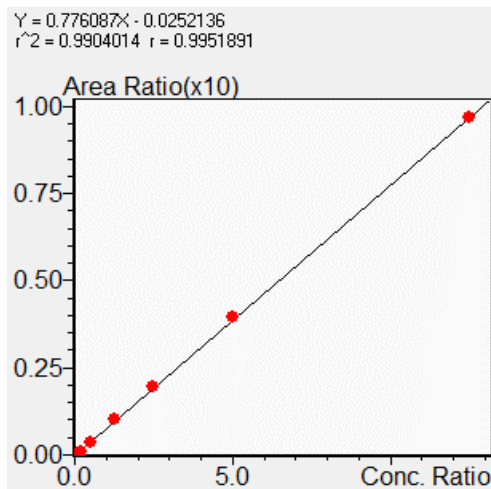


图3 维生素 K1 的线性方程及相关系数

表5 线性范围结果汇总

	方法检出限 LOD	方法定量限 LOQ	线性范围 AMR
K1 (ng/mL)	0.05	0.1	0.1~12.5

## 2.4 准确度及精密度

分别制备并处理已知浓度的低、中、高三个浓度的样品，LQC 为 2.0 ng/mL、MQC 为 9.0 ng/mL、HQC 为 11.0 ng/mL，按 1.3 所述前处理方法处理后进样分析，精密度结果如表 6。通过基质加标的方式验证准确度，结果如表 7 所示。从表中可见，维生素 K1 准确度 RSD 在 89.3%~109.2% 范围内，精密度分别在 5.5%~7.9% 范围内，均符合标准。

表6 批内精密度考察结果

样品编号	时间 (min)	低浓度 (ng/mL)	时间 (min)	中浓度 (ng/mL)	时间 (min)	高浓度 (ng/mL)
1	6.99	2.00	7.16	8.60	7.14	11.32
2	6.99	1.94	7.11	8.02	7.04	11.61
3	6.98	2.11	7.11	9.54	7.06	11.92
4	7.00	1.96	7.05	8.35	7.03	10.96
5	6.99	2.23	7.04	9.50	7.02	9.50
6	6.98	2.13	7.12	8.30	7.03	10.59
平均值	6.99	2.06	7.10	8.72	7.05	10.98
RSD(%)	0.07	5.54	0.63	7.42	0.67	7.87

表 7 准确度考察结果

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
0.26			4.38	91.6
0.21	0.26	4.50	4.28	89.3
0.31			4.40	92.0
0.26			7.35	96.2
0.21	0.26	7.37	7.07	92.4
0.31			8.31	109.2
0.26			9.65	96.9
0.21	0.26	9.69	9.47	95.0
0.31			9.38	94.1

## 2.5 临床可报告范围

采用高浓度加标样本，用 30% 甲醇 - 水溶液，分别将其稀释 2、4 倍，稀释前与稀释后的病人样本分别平行处理 3 个，每个检测一次，以稀释前的浓度为参考靶值，计算各稀释后浓度样本的回收率，回收率在 85%~115% 之间则认为该稀释倍数可接受。检测结果如表 8 所示，维生素 K1 可接受的倍数至少为 4 倍，则维生素 K1 的临床可报告范围为 (CRR) 0.1~50 ng/mL，该范围足以满足临床检测的需求。

表 8 临床可报告范围考察结果

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
9.65			4.76	98.1
9.47	9.69	4.85	4.29	88.5
9.38			4.98	102.7
9.65			2.36	97.7
9.47	9.69	2.42	2.09	86.5
9.38			2.60	107.4

## 2.6 携带效应

取样本加标至高浓度曲线点附近，作为高浓度样本 ULOQ；取病人样本加标至低浓度曲线点附近，作为低浓度样本 LLOQ；C1=LLOQ，C2=ULOQ，C3=LLOQ；按照 C1-C2-C3 顺序检测，重复检测 3 次；(C3-C1)/C1 峰面积比值小于 20%；检测结果如表 9 所示，说明携带效应通过，满足检测要求。

表 9 携带效应考察结果 w

样品编号	K1	
	结果 (ng/mL)	(C3-C1)/C1 (%)
C1-1	0.93	
C2-1	6.21	4.93
C3-1	0.98	

C1-2	0.99	
C2-2	6.26	-2.83
C3-2	0.96	
C1-3	1.00	
C2-3	6.52	1.50
C3-3	1.02	

## 2.7 实际样本测定

表 10 实际样本测定结果

	样本 1	样本 2
VK1 含量 (ng/mL)	0.25	1.07

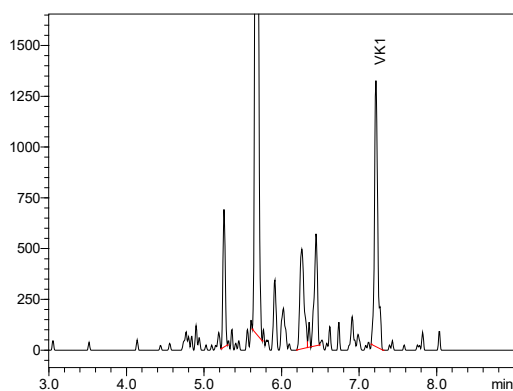


图 4 实际血清样本 1 色谱图

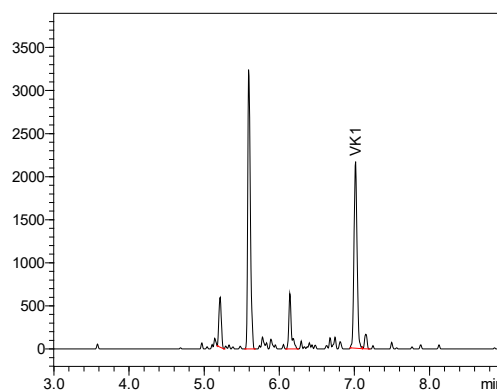


图 5 实际血清样本 2 色谱图

## 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用检测血清中 VK1 的检测方法。此方法经过验证，无携带效应，VK1 在 0.1~12.5 ng/mL 内线性良好，线性相关系数大于 0.995；低，中，高三个浓度水平的加标回收率在 85% ~ 113% 之间，保留时间和含量相对标准偏差分别在 0.07 ~ 0.67% 和 5.54 ~ 7.87% 之间，仪器和方法的精密度良好。同时经过基质效应的验证，可使用纯溶剂替代生物基质进行校准曲线的配制和使用，该方法验证均能满足临床检测的需求，可为临床检测维生素 K1 提供参考。LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统可满足临床检测维生素 K1 的需求。