

LC-MS/MS 法检测血清中维生素 K2

LCMSMS-714

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪，建立了血清中维生素 K2 测定方法，对方法的线性范围、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，质控品测定准确度结果与理论值接近，该方法前处理简便、分析速度快、灵敏度高，可用于血清中维生素 K2 含量测定。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 维生素 K2 血清

维生素 K2 (menaquinones, 甲萘醌) 是由人体肠道有益菌群产生的微量脂溶性维生素，具有叶绿醌生物活性的萘醌基团的衍生物，是人体中不可缺少的重要维生素之一。维生素 K2 共有 14 种形式，通常用英文字母 MK 来表示，分别是 MK-4、MK-7、MK-8、MK-9 等。其中最常见的是合成的 MK-4 和天然的 MK-7，对骨骼健康及心血管健康有重要作用。据文献报道，MK-4 正常参考值范围为 0.07~2.68 ng/mL，

MK-7 正常参考值范围为 0.33~4.48 ng/mL^[1]。目前，维生素 K2 已经受到全世界的广泛关注并成为研究热点。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050，建立了血清中维生素 K2 测定方法，该方法前处理简便、分析速度快、灵敏度高，可供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。配置信息如下：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

脱气机：DGU-405

检测器：LCMS-8050

输液泵：LC-40B X3

工作站：Labsolutions Ver. 5.99

柱温箱：CTO-40C

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：BEH C18 (50 mm L. × 2.1 mm I.D., 1.7 μm)

流动相：A 相 -0.2% 甲酸水溶液，B 相 -0.2% 甲酸甲醇溶液

流速：0.5 mL/min

柱温：50°C

进样体积：20 μL

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 80%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	85
4.00	泵	B.Conc	90
5.00	泵	B.Conc	100
7.50	泵	B.Conc	100
7.51	泵	B.Conc	80
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

 分析仪器: LCMS-8050
 离子源: APCI (+)
 雾化气流速: 3.0 L/min
 干燥气流速: 3.0 L/min
 碰撞气: 氦气

 DL 温度: 250°C
 加热模块温度: 200°C
 接口温度: 350°C
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	MK-4	445.3	187.1*	-22.0	-25.0	-19.0
			227.1	-22.0	-21.0	-21.0
2	MK-4 D7	452.3	194.1	-22.0	-25.0	-19.0
3	MK-7	649.5	187.1*	-32.0	-34.0	-19.0
			227.1	-32.0	-28.0	-14.0
4	MK-7 D7	656.5	194.1	-32.0	-34.0	-19.0

* 表示定量离子

1.3 标准品配制

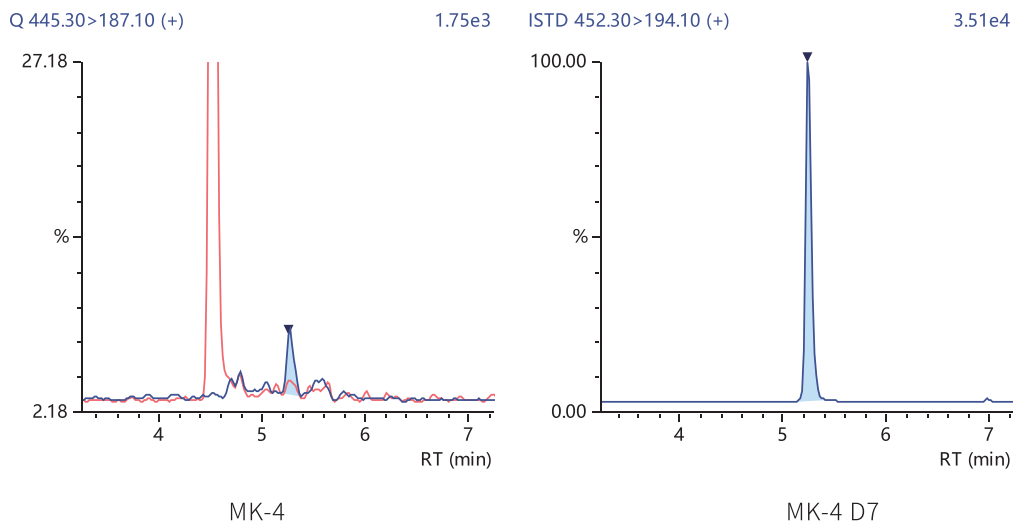
标准样品: 精密称取 MK-4 和 MK-7 适量, 用乙醇溶解配制成 100 µg/mL 储备液。用 4%BSA 溶液逐级稀释成浓度为 10、5、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05 ng/mL 的标准样品溶液;

内标溶液: 精密称取 MK-4 D7 和 MK-7 D7 适量, 用乙醇溶解配制成 100 µg/mL 储备液。用 50% 乙醇水溶液稀释为 20 ng/mL 内标溶液。

样品制备: 取 200 µL 标准样品或血清样本, 加入 20 µL 内标溶液及 400 µL 乙醇, 涡旋混匀 1 min, 加入 1 mL 正己烷, 涡旋混匀 3 min, 12000 rpm 离心 10 min, 取 850 µL 上清液, 室温氮气吹干, 复溶后上机测定。

结果讨论

2.1 MRM 色谱图



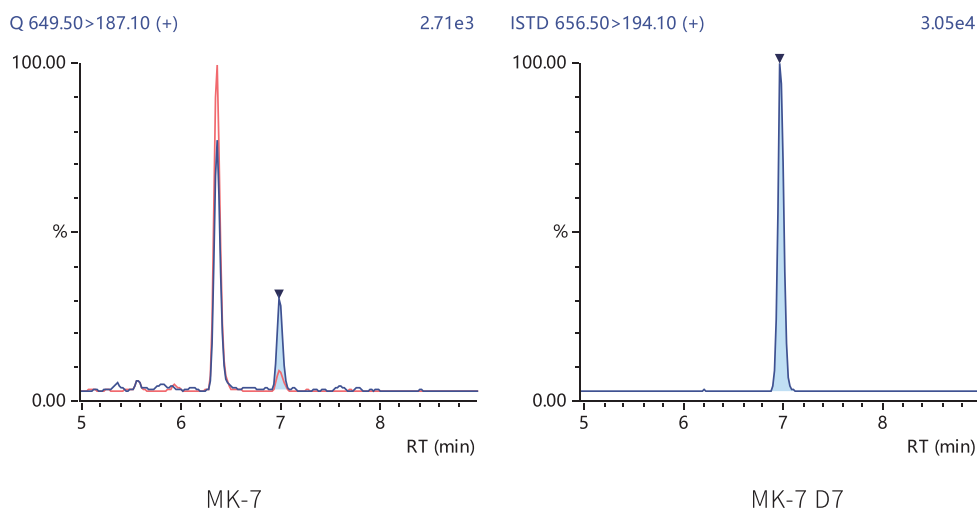


图1 标准曲线最低点色谱图

2.2 校准曲线

对标准曲线溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线结果见图 2 及表 3，MK-4 和 MK-7 在校准曲线浓度范围内线性良好，相关系数分别为 0.9993 和 0.9997，准确度分别在 95.5%~105.0% 和 97.2%~103.1% 之间。

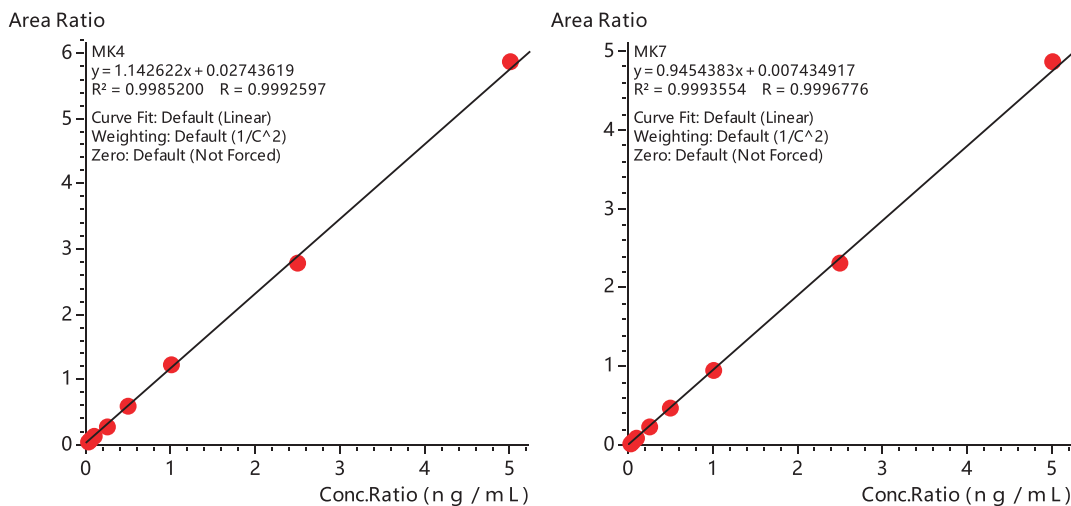


图2 校准曲线图谱

表3 校准曲线信息

化合物	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
MK-4	$Y = (1.142622)X + (0.02743619)$	0.05~10.0	0.9993	95.5~105.0
MK-7	$Y = (0.9993554)X + (0.00743492)$	0.05~10.0	0.9997	97.2~103.1

2.3 准确度及精密度

分别取处理后且已知浓度的低、中、高三个浓度的质控样品，每个浓度平行制备六份质控样品，按 1.3 所述前处理方法处理后进样分析，准确度及精密度结果如表 4 所示。结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，MK-4 平均回收率在 98.8%~105.2% 之间，RSD 在 0.58%~2.36% 之间；MK-7 平均回收率在 98.5%~104.1% 之间，RSD 在 1.13%~3.35% 之间。

表 4 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

化合物	项目	LQC	MQC	HQC
MK-4	理论浓度	0.50	2.00	5.00
	测定浓度	0.49	2.10	4.94
	回收率 %	99.8	105.2	98.8
	RSD%	2.36	2.02	0.58
MK-7	理论浓度	1.80	3.30	6.30
	测定浓度	1.87	3.36	6.21
	回收率 %	104.1	101.9	98.5
	RSD%	1.13	3.35	1.72

2.4 样品测定

取 2 批次血清样品, 按 1.3 进行前处理后分别进行测定, 结果如下。

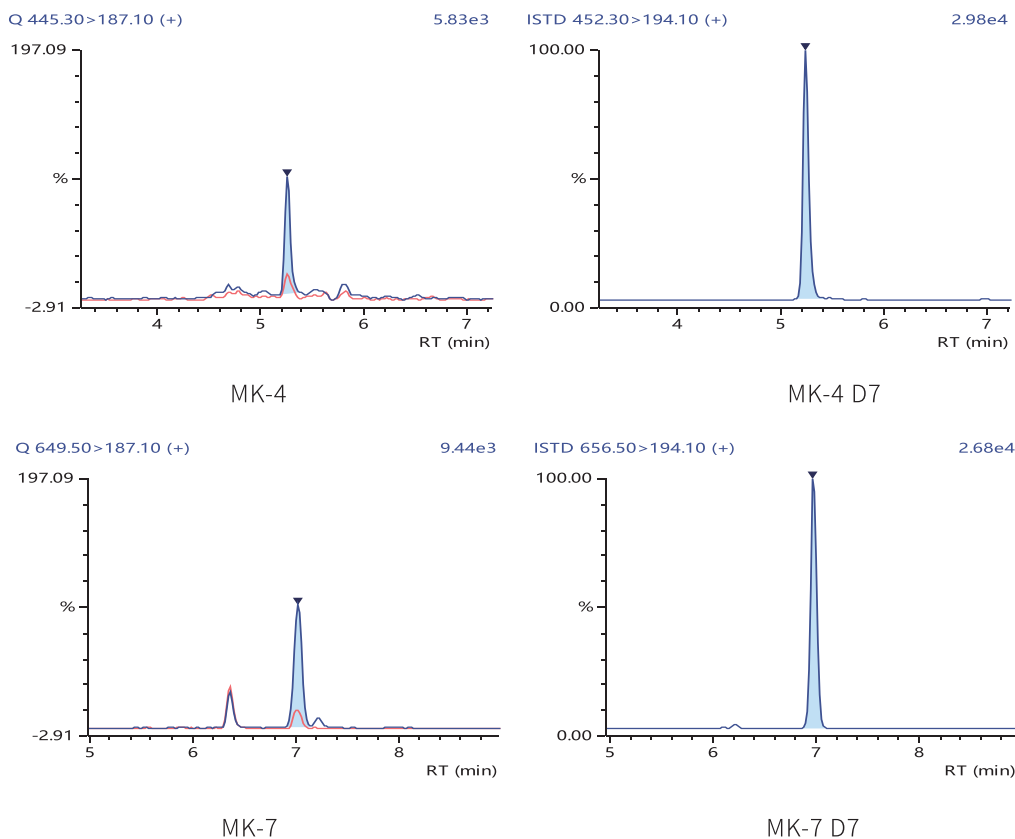


图 3 血清样品色谱图

表 3 校准曲线信息

编号	MK-4	MK-7
样品 1	0.27	0.94
样品 2	0.46	0.92

■ 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050, 建立了血清中维生素 K2 测定方法。该方法采用内标法定量, 在 0.05~10.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999; 质控品测定准确度结果与理论

值接近，平均回收率在 98.5%~105.2% 之间，RSD 在 0.58%~3.35% 之间。该方法操作简单且灵敏可靠，可供相关行业人员参考使用。

参考文献

[1] Fusaro M, Noale M, Viola V, Galli F, Tripepi G, Vajente N, et al. Vitamin K, vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality: Vitamin K Italian (VIKI) dialysis study. J Bone Miner Res 2012;27:2271-8.

岛津应用云

