

LC-MS/MS 法检测血清中维生素 K2(MK-4)

LCMSMS-660

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（MK-4）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 MK-4 含量测定。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 维生素 K2(MK-4) 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 (MK-4) 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

柱温箱：CTO-40C

输液泵：LC-40B X3

脱气机：DGU-405

工作站：Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox C18 (100 mm L.×2.1 mm I.D., 2.7 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-32009-03)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液，B 相 -0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：0.5 mL/min

柱温：40°C

进样体积：30 μL

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 85%，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	95
7.00	泵	B.Conc	95
7.01	泵	B.Conc	10
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050

DL 温度：200°C

离子源：APCI (+)

加热模块温度：200°C

雾化气流速: 3.0 L/min
干燥气流速: 5.0 L/min
碰撞气: 氩气

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

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
MK-4	445.3	187.1*	-22.0	-25.0	-19.0
		227.1	-22.0	-21.0	-21.0
MK-4 D7	452.3	194.1	-22.0	-25.0	-19.0

* 表示定量离子

1.3 标准品及样品制备

标准工作溶液: 精密称取 MK-4 适量, 用乙醇溶解配制成 100 µg/mL 储备液。用 50% 乙醇水溶液逐级稀释成浓度为 100、50、20、10、5、2、1、0.5 ng/mL 的标准工作溶液;

内标溶液: 精密称取 MK-4 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 10 ng/mL 内标溶液。

标准曲线: 分别取标准工作溶液各浓度点 10 µL, 加入 10 µL 内标溶液, 再加入 80 µL 初始比例流动相, 依次配制成 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL 标准曲线溶液。

样品制备: 取 200 µL 血清样本, 加入 10 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

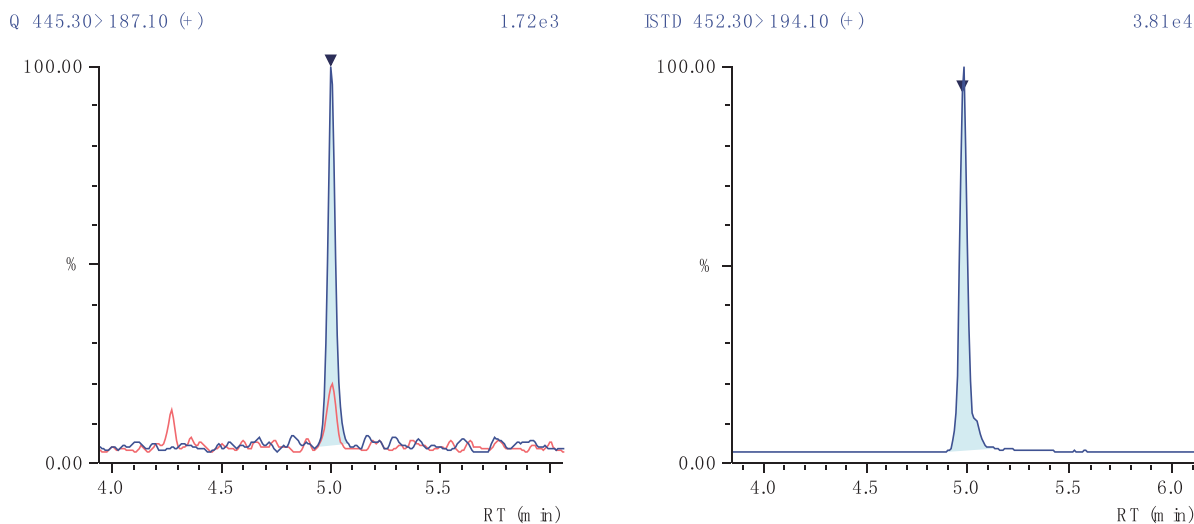


图 1 标准曲线最低点色谱图

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 在校准曲线浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9982, 准确度在 94.3%~108.6% 之间。

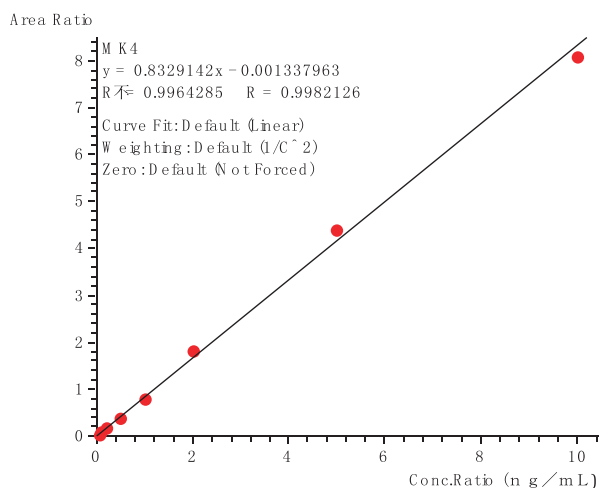


图 2 校准曲线图谱

表 3 校准曲线信息

名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
MK-4	$Y = (0.832914)X + (-0.00133796)$	0.05~10.0	0.9982	94.3~108.6

2.3 准确度及精密度

分别取处理后且已知浓度的低、中、高三浓度的质控样品，LQC 为 0.25 ng/mL、MQC 为 1.0 ng/mL、HQC 为 5.0 ng/mL，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，平均回收率在 92.7%~100.8% 之间，RSD 在 4.55%~7.65% 之间。

表 4 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

项目	LQC	MQC	HQC
理论浓度	0.25	1.00	5.00
测定浓度	0.23	1.01	4.70
回收率 %	92.7	100.8	93.9
RSD%	7.65	4.55	4.95

2.4 样品测定

取 2 批次血清样品，经前处理后分别进行测定，结果如下。

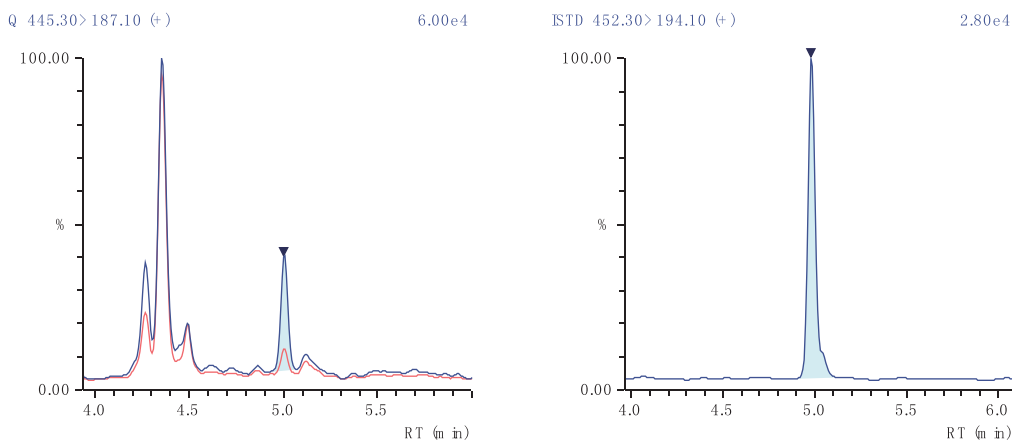


图 3 血清样品色谱图

表 5 样品检测结果

编号	MK-4 (ng/mL)
样品 1	0.43
样品 2	0.16

■ 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（MK-4）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 0.998；质控品测定准确度结果与理论值接近，平均回收率在 92.7%~100.8% 之间，RSD 在 4.55%~7.65% 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

